

**Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”
Instituto de Química**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Análise estrutural e funcional de eIF5A selvagem e mutadas

Camila Arnaldo Olhê Dias

**Orientador: Prof. Dr. Sandro R. Valentini
Co-orientador: Prof. Dr. Cleslei F. Zanelli**

Janeiro/2010

Dedico este trabalho aos meus pais, os grandes orientadores da minha vida; ao meu esposo, que nesta caminhada fez dos meus sonhos os sonhos dele também; e aos meus irmãos, dos quais fisicamente pareço estar longe, mas que carrego em meus pensamentos todos os dias da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo amor e carinho incondicionais, por cada conselho e cada palavra de incentivo, e por juntos acreditarem que a educação é o maior bem que eles poderiam me dar.

Ao meu esposo Mauricio, por ser o meu melhor amigo e confidente, por estar comigo em todos os momentos, me incentivando a crescer como profissional e me ensinando que o melhor sempre está por vir.

Ao meu irmão Lucas, o herói da minha infância, por uma vez ter me dito que se orgulha de mim.

Ao meu irmão Enrico, cujo sorriso e simplicidade em lidar com a vida me ensinam que tudo tem sua hora. Nunca irei me esquecer dele, aos oito anos mais ou menos, perguntando ao me encontrar aflita, estudando para o vestibular: “Está estudando? Direitinho? Está aprendendo? Eu fico quietinho!”

À amiga Roberta, por participar intensamente da minha vida, vibrando e sorrindo com as minhas conquistas e me acalutando nos meus tropeços.

Às sete mulheres da minha vida: Vó Sunta, Tia Cila, Bernadete, Joana, Sandra, Eliana e Renata, pelas orações, pela torcida calorosa, pelas alegres tardes de sábado e, principalmente, por nesta caminhada compreenderem a minha ausência sem cobranças.

Ao professor Sandro, por me apresentar os caminhos possíveis e me deixar escolher qual deles seguir, pelo incentivo de sempre ir além, pela liberdade de expressão, pela paciência e pelas oportunidades que me fizeram amadurecer como cientista e pessoa.

Ao amigo Luciano, por ter sido extremamente rigoroso no acompanhamento dos meus primeiros passos como cientista, mas também por ser um amigo para todas as horas, doce e gentil como ele sabe ser.

À amiga Veridiana, por me mostrar que tudo é possível quando realmente se quer.

Ao Cleslei, pela grande contribuição a esse trabalho, inicialmente palpitando como meu colega de laboratório e mais tarde como meu co-orientador.

À Mariana, por me ensinar que a paciência é uma virtude que deve ser alimentada todos os dias.

Aos colegas de laboratório Rogério, Ana Paula, Suzana, Wagner, Danuza, Daniella, Tatiana, Carlos Eduardo, Fábio, Juliana, Alan, Ana Beatriz, Malu, Marcus, Paulo, Diana, Hermano, Éric, Laura e Rodolfo pelo aprendizado constante no convívio em grupo e pelas sugestões nesse trabalho.

À Dra. Myung Hee Park, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório nos EUA.

À amiga Edith, pela receptividade, amizade e ajuda na adaptação a outro laboratório e outra cultura.

Ao Paul e a Andrea, pelo carinho com que cuidaram de mim quando estive longe da minha família.

Aos colaboradores desse trabalho: Dr. Francisco J. M. Martin, Dr. Mário Sanches, Dr. Beatriz G. Guimarães, Dr. Wanius Garcia, Dr. João R. C. Muniz e Dr. Richard C. Garratt.

Ao Instituto de Química e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, à FAPESP e ao CNPq, pelo apoio institucional e financeiro para a realização desse trabalho.

A Deus, por tudo e todos.

“A principal descoberta deste século de pesquisa e de ciência é, provavelmente, a profundidade de nossa ignorância da natureza. Quanto mais aprendemos, mais percebemos a extensão dessa ignorância. Isso é em si uma grande novidade. Uma novidade que teria espantado nossos avós dos séculos XVIII e XIX. Pela primeira vez, podemos contemplar de frente nossa ignorância. Por muito tempo, fingimos compreender como funcionavam as coisas. Ou simplesmente contamos histórias para tapar buracos. Agora que começamos a estudar seriamente a natureza, começamos a perceber a amplitude das perguntas; a medir a distância a ser percorrida para tentar respondê-las. O grande perigo para a humanidade não é desenvolver o conhecimento. É a ignorância.”

François Jacob, 1997

Prêmio Nobel em Medicina de 1965

[Ada Yonath] “Oh, sim, gostei muito de receber o prêmio Nobel. Eu acredito que esse é o maior reconhecimento que existe... Eu acho que existe algo de especial com esse prêmio!”

[Adam Smith] “Sim. Talvez, particularmente especial por ser uma mulher que o recebe?”

[Ada Yonath] “Desculpe-me. Desculpe-me, mas eu não posso. Eu não posso pensar isso por causa do meu sexo. Eu não acho que eu fiz algo mais especial por ser mulher, ou o oposto. Durante minha caminhada, eu tive alguns anos muito difíceis, de alta concorrência e sempre com homens. No entanto, eu não acho que isso é porque eu era uma mulher. Tenho certeza que se eu fosse um homem também iriam competir comigo. Eu acho que ser mulher não ajuda na ciência, mas também não atrapalha. Em minha opinião, posso estar errada, as mulheres tentam se explicar com todos os tipos de argumentos. Eu acho que as mulheres podem fazer... as mulheres precisam fazer. Na verdade, as mulheres têm muita sorte porque se elas não querem fazer ciência podem simplesmente se desculpar dizendo: - Eu quero estar com meus filhos. - Para a sociedade isso é compreensível, mas um homem não pode parar seu trabalho para cuidar dos filhos. Para mim, parar de trabalhar significaria parar a ciência. Então, acredito que devemos olhar esse assunto de outros pontos de vista.”

Ada E. Yonath

Junto com Venkatraman Ramakrishnan e Thomas A. Steitz
ganhou o Prêmio Nobel em Química de 2009

Também é mãe de Hagith Yonathe e avó de Noa

RESUMO

O fator de início de tradução 5A (eIF5A) é altamente conservado de arqueas a mamíferos e é essencial para a viabilidade celular. Este fator tem sido associado com o início da tradução, proliferação celular, transporte nucleocitoplasmático e decaimento de mRNA. Estudos recentes associam eIF5A com a elongação, ao invés do início da tradução. eIF5A é a única proteína conhecida que contém o aminoácido essencial hipusina, gerado pelas enzimas desoxihipusina sintase e desoxihipusina hidroxilase. O objetivo deste estudo foi a caracterização estrutural e funcional de eIF5A de *S. cerevisiae*. Primeiramente, a estrutura terciária de eIF5A foi determinada por cristalografia e foi demonstrada a sua dimerização em solução, independentemente do resíduo hipusina. Foram obtidos e caracterizados 40 mutantes novos de eIF5A, dos quais 19 não complementaram o nocaute do gene selvagem, 13 apresentaram fenótipo de termossensibilidade e 8 não apresentaram nenhuma alteração nos fenótipos investigados. A maioria dos mutantes novos tem seus fenótipos resultantes da degradação da proteína eIF5A. Curiosamente, este é o primeiro estudo que sugere que a α -hélice presente no C-terminal de eIF5A é essencial para a manutenção da sua estrutura. Descrevemos também, que a extensão N-terminal de eIF5A, presente apenas em eucariotos, não é essencial para estrutura e função dessa proteína. Além disso, os mutantes contendo substituições na alça onde está localizado o aminoácido hipusina são inviáveis ou termossensíveis. Embora estes mutantes produzam eIF5A, inclusive na temperatura não permissiva, a proteína produzida não é hipusinada. Finalmente, dois mutantes termossensíveis (*tif51A*^{K56A} e *tif51A*^{Q22H/L93F}) produzem a proteína eIF5A estável na temperatura não permissiva, no entanto, apresentam defeitos de crescimento e de síntese de proteínas, além de possuir defeito no perfil polissomal característico de mutantes de fatores envolvidos na elongação da tradução. Interessantemente, este estudo mostrou que a proteína mutada eIF5A^{Q22H/L93F} interage com o fator de elongação eEF2, independentemente de RNA e ribossomos. Estes dados sugerem pela primeira vez que a proteína eIF5A interage diretamente com eEF2 durante a tradução. Os resultados obtidos neste trabalho revelam características estruturais importantes de eIF5A para seu papel essencial na viabilidade celular e ainda ressaltam a função dessa proteína na tradução.

ABSTRACT

The translation initiation factor 5A (eIF5A) is highly conserved from archae to mammals and is essential for cell viability. This factor has been associated with translation initiation, cell proliferation, nucleocytoplasmatic transport and mRNA decay. Recent studies show eIF5A involved in elongation, rather than translation initiation. eIF5A is the only protein known to contain the essential amino acid residue hypusine, generated by the enzymes deoxyhypusine synthase and deoxyhypusine hydroxylase. The main goal of this study was the structural and functional characterization of *S. cerevisiae* eIF5A. First of all, the tertiary structure of eIF5A was determined by crystallography and this protein was defined as a dimer in solution, independently of the hypusine residue. We obtained and characterized 40 new mutants, which 19 cannot complement *tif51A* knockout cells, 13 are temperature-sensitive and 8 show no detectable phenotype. The phenotypes of most mutants are caused by protein folding defects. Interestingly, this is the first study suggesting that the C-terminal α -helix present in yeast eIF5A may be an essential structural element. Moreover, we describe that the eIF5A N-terminal extension present only in eukaryotic homologues is not essential in yeast. Furthermore, the mutants containing substitutions surrounding the hypusine modification site showed unviable or temperature-sensitive phenotypes. Although these mutant proteins were stable, they were defective in hypusine modification. Finally, two of the temperature-sensitive mutant strains (*tif51A*^{K56A} and *tif51A*^{Q22H/L93F}) produced stable eIF5A protein but showed defects in growth and protein synthesis and these mutants revealed polysome profile defect similar to that described for mutations in factors involved in translation elongation. It was also shown that the mutant eIF5A^{Q22H/L93F} interacts with the elongation factor eEF2 independently of RNA and ribosome, suggesting that eIF5A protein interacts directly with eEF2. Taken together, our data reveal important structural features of eIF5A for its essential role in cell viability and further underscore the essential function of eIF5A in the translation step of gene expression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Representação esquemática da tradução.....	30
Figura 2.	Esquema ilustrativo do mecanismo de elongação da tradução em eucariotos.....	31
Figura 3.	Via de biossíntese do resíduo de aminoácido hipusina no precursor de eIF5A.....	32
Figura 4.	Alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos de eIF5A de diferentes organismos.....	33
Figura 5.	Esquema representativo da evolução de eIF5A e suas enzimas modificadoras.....	34
Figura 6.	Mecanismo de ação da puromicina.....	35
Figura 7.	Produção e purificação de 6xHis-eIF5A de <i>S.cerevisiae</i> , a partir de bactéria, utilizando coluna de níquel.....	75
Figura 8.	Estrutura cristalográfica de eIF5A de <i>S. cerevisiae</i>	76
Figura 9.	Purificação de GST-Dys1 e avaliação do anticorpo policlonal anti-Dys1 produzido em coelho.....	77
Figura 10.	Esquema ilustrativo da construção do vetor de expressão policistrônico contendo os genes codificadores das proteínas eIF5A, DHS e DOHH de humano.....	83
Figura 11.	Determinação da expressão e modificação de eIF5A de humano, produzida em <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLys.....	84
Figura 12.	Otimização da expressão e modificação de eIF5A de humano, produzida em <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLys contendo a construção pST39 eIF5A DHS DOHH.....	85
Figura 13.	Purificação de heIF5A recombinante hipusinada por cromatografia de troca iônica utilizando a coluna DEAE Sephacel.....	86
Figura 14.	Purificação de heIF5A recombinante hipusinada por cromatografia de troca iônica utilizando a coluna SP-Sepharose.....	87
Figura 15.	Purificação de heIF5A recombinante hipusinada por cromatografia de troca iônica utilizando a coluna Q-	

	Sepharose.....	88
Figura 16	Análise do estado oligomérico de eIF5A de levedura em solução, purificada a partir da bactéria, por cromatografia de exclusão molecular.....	95
Figura 17.	Análise do estado oligomérico de eIF5A em solução, purificada a partir da levedura <i>S. cerevisiae</i> , por cromatografia de exclusão molecular.....	96
Figura 18.	Análise do estado oligomérico de 6xHis-eIF5A em solução, purificada a partir da levedura <i>S. cerevisiae</i> , por Espalhamento de raios-X em baixo ângulo (SAXS – “Small-angle X-ray scattering”).....	97
Figura 19.	Análise do estado oligomérico de 6xHis-eIF5A em solução, purificada a partir de bactéria, por crosslinking.....	98
Figura 20.	Análise do estado oligomérico de 6xHis-eIF5A por copurificação.....	99
Figura 21.	Localização de alguns dos resíduos mutados de eIF5A.....	109
Figura 22.	Avaliação da complementação do nocaute de <i>TIF51A</i> de alguns mutantes.....	114
Figura 23.	Análise da estabilidade da proteína mutada presente nos mutantes sensíveis à temperatura de <i>tif51A</i>	115
Figura 24.	Caracterização dos mutantes de eIF5A cujos resíduos modificados estão localizados na alça de hipusinação.....	117
Figura 25.	Caracterização dos mutantes de eIF5A cujos resíduos modificados estão localizados na α -hélice do C-terminal.....	120
Figura 26.	Mutantes de eIF5A com substituições na α -hélice do domínio C-terminal apresentam defeitos de estruturação protéica.....	121
Figura 27.	Caracterização dos dois mutantes de eIF5A que produzem a proteína estável na temperatura não permissiva.....	128
Figura 28.	Caracterização da interação física e funcional entre os dois mutantes de eIF5A que produzem a proteína estável na temperatura não permissiva e a enzima Dys1.....	129

Figura 29.	Localização subcelular dos dois mutantes de eIF5A que produzem a proteína estável na temperatura não permissiva.....	130
Figura 30.	Caracterização do defeito celular dos dois mutantes de eIF5A que produzem a proteína estável na temperatura não permissiva.....	131
Figura 31.	Perfil polissomal de eIF5A selvagem e mutadas.....	132
Figura 32.	Busca de parceiros físicos por copurificação de eIF5A ^{K56A} e eIF5A ^{Q22H/L93F}	133
Figura 33.	Identificação de parceiros físicos de eIF5A selvagem e mutadas por copurificação seguido de western blot.....	134
Figura 34.	Comparação das estruturas tridimensionais de aIF5A, eIF5A e EF-P.....	145
Figura 35.	Conservação dos resíduos mutados de eIF5A de arqueas à eucariotos.....	146

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Linhagens de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas neste estudo.....	60
Tabela 2.	Plasmídeos utilizados neste estudo.....	64
Tabela 3.	Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos de mutação sítio-dirigida.....	67
Tabela 4.	Oligonucleotídeos utilizados nas clonagens e nos sequenciamentos.....	68
Tabela 5.	Relação das mutações intragênicas geradas no alelo <i>tif51A-3</i> , durante rastreamento de letalidade sintética.....	106
Tabela 6.	Resumo dos resíduos de aminoácidos alterados existentes nos mutantes de eIF5A e seus respectivos fenótipos.....	107

ABREVIATÖES UTILIZADAS

Å	Angstron
°C	graus Celcius
λ	comprimento de onda
mCi	microCurie
μ g	micrograma
μ F	microFaraday
μ L	microlitro
mM	micromolar
Ω	Ohm
BSA	soroalbumina bovina
CD	“circular dichroism” (dicróismo circular)
cDNA	DNA complementar
cm	centímetro
C-terminal	carboxi-terminal
DAPI	4'-6-diamino-2-fenilindol
DIC	“differential interference contrast” (microscopia de contraste de fase)
DMSO	dimetilssulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTPs	mistura de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dATP, dCTP, dGTP e dTTP)
D.O.	densidade ótica
dpm	desintegrações por minuto
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
eIF5A-Lis	precursor inativo de eIF5A contendo o resíduo de lisina
eIF5A-Dhp	forma intermediária da proteína eIF5A contendo o resíduo de aminoácido desoxihipusina
eIF5A-Hpu	forma madura da proteína eIF5A contendo o resíduo de aminoácido hipusina
EMS	etilmetanossulfonato
5-FOA	ácido 5-flúor-orótico

FPLC	“fast performance liquid chromatography” (cromatografia líquida de rápida execução)
g	grama
heIF5A	proteína eIF5A de humano
heIF5A-Lis	precursor inativo de eIF5A de humano contendo o resíduo de lisina
heIF5A-Dhp	forma intermediária da proteína eIF5A de humano contendo o resíduo de aminoácido desoxihipusina
heIF5A-Hpu	forma madura da proteína eIF5A de humano contendo o resíduo de aminoácido hipusina
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
kb	quilobase
kDa	quilodalton
kV	quilovolt
L	litro
LB	meio Luria-Bertani
M	molar
mAU	miliabsorbância
mg	miligrama
min	minutos
mL	mililitro
mM	milimolar
mRNA	RNA mensageiro
NAD	“nicotinamide adenine dinucleotide” (nicotinamida adenina dinucleotídeo)
NES	sequência de exportação nuclear
ng	nanograma
nm	nanômetro
N-terminal	amino-terminal
ORF	“Open Reading Frame” (janela aberta de leitura)
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
pb	pares de bases
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PBST	PBS com Tween 20
PCI	fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (24:25:1)

PCR	“Polymerase Chain Reaction” (reação de polimerase em cadeia)
PDB	“Protein Data Bank”
PEG	polietilenoglicol
pH	potencial hidrogeniônico
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonila
pmol	picomol
Rg	raio de giro
RNA	ácido ribonucléico
RNase	ribonuclease
SAXS	“small-angle X-ray scattering”(espalhamento de raios-X em baixo ângulo)
SC	meio sintético completo para levedura
SDS	dodecil sulfato de sódio
S-SPO	“super-sporulation” (meio para esporulação de levedura)
TAE	Tris-acetato EDTA
TCA	ácido tricloroacético
TE	Tris-EDTA
Tris	tris-hidroximetilaminometano
Triton X-100	polietilenoglicol-terc-octilfenil éter
Tween 20	monolaurato de polioxietilenosorbitana
U	unidade enzimática
UTR	“untranslated region” (região não traduzida de mRNA)
UV	ultravioleta
V	volt
YNB	“yeast nitrogen base” (base nitrogenada para levedura)
YPD	“yeast extract, peptone, dextrose” (meio rico para levedura contendo extrato de levedura, peptona e glicose)
xg	aceleração gravitacional

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVOS.....	36
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1. Material.....	37
3.2. Métodos.....	37
3.2.1- Subclonagem de DNA.....	37
3.2.1.1- Digestão de plasmídeos.....	37
3.2.1.2- Desfosforilação do vetor.....	37
3.2.1.3- Purificação de inserto e vetor.....	37
3.2.1.4- Reação de ligação.....	38
3.2.2- Clonagem empregando a reação de polimerase em cadeia (PCR).....	38
3.2.2.1- Reação de PCR.....	38
3.2.2.2- Clonagem do produto de PCR.....	39
3.2.3- Transformação bacteriana por choque térmico.....	39
3.2.3.1- Competência.....	39
3.2.3.2- Transformação.....	39
3.2.4- Isolamento de DNA plasmidial a partir de bactéria em pequena escala – Miniprep.....	40
3.2.5- Transformação de leveduras.....	40
3.2.6- Preparo de DNA genômico de levedura.....	41
3.2.7- Sequenciamento de DNA.....	42
3.2.8- Produção em larga escala e purificação de proteína em fusão com GST.....	42
3.2.9- Produção em larga escala e purificação da proteína 6xHis-eIF5A recombinante de <i>S. cerevisiae</i>	43
3.2.10- Ensaios de cristalização.....	44
3.2.11- Western blot.....	44
3.2.12- Ensaio de hipusinação <i>in vivo</i> da proteína recombinante heIF5A.....	45

3.2.13- Cromatografia de troca iônica para purificação de hElF5A-Hpu.....	46
3.2.14. Expressão e purificação de proteínas em fusão com 6xHis “tag” a partir de levedura.....	47
3.2.15- Cromatografia de exclusão molecular.....	48
3.2.16- Espalhamento de raios-X em baixo ângulo (SAXS – “Small-angle X-ray scattering).....	49
3.2.17- Ensaio de crosslinking.....	49
3.2.18- Ensaio de copurificação.....	50
3.2.19- Produção de anticorpo policlonal em coelho.....	51
3.2.20- PCR mutagênica.....	52
3.2.21- Mutação Sítio-dirigida.....	53
3.2.22- Ensaio de complementação fenotípica de levedura.....	53
3.2.23- Análise do fenótipo de sensibilidade à temperatura.....	54
3.2.24- Ensaio de estabilidade de proteína	54
3.2.25- Ensaio de “pulse-chase”	54
3.2.26- Dicroísmo circular.....	55
3.2.27- Ensaio de hipusinação <i>in vivo</i>.....	56
3.2.28- Ensaio de síntese protéica.....	57
3.2.29- Localização subcelular de proteína.....	57
3.2.30- Perfil polissomal.....	58
4. RESULTADOS.....	69
4.1- Análise estrutural de eIF5A.....	69
4.1.1- <i>Determinação da estrutura cristalográfica de eIF5A de S. cerevisiae.....</i>	69
4.1.2- <i>Expressão e purificação da forma hipusinada de hElF5A de humano a partir de uma cultura bacteriana.....</i>	78
4.1.3- <i>Determinação do estado oligomérico de eIF5A de S. cerevisiae em solução.....</i>	89
4.1.3.1- <i>Cromatografia de exclusão molecular.....</i>	89
4.1.3.2- <i>Espalhamento de raios-X em baixo ângulo (SAXS).....</i>	91
4.1.3.3- <i>Ensaio de crosslinking.....</i>	92
4.1.3.4- <i>Ensaio de copurificação.....</i>	93

4.2- Obtenção de novos mutantes de eIF5A.....	100
4.2.1- <i>Mutagenese química.....</i>	100
4.2.2- <i>PCR mutagênica.....</i>	102
4.2.3- <i>Mutação Sítio-dirigida.....</i>	104
4.3- Caracterização inicial dos novos mutantes de eIF5A.....	110
4.3.1- <i>Complementação da levedura contendo o alelo nocauteado de TIF51A.....</i>	110
4.3.2- <i>Análise do fenótipo de sensibilidade à temperatura dos mutantes viáveis.....</i>	111
4.3.3- <i>Estabilidade da proteína mutada presente nos mutantes sensíveis à temperatura.....</i>	112
4.4- Caracterização dos mutantes de <i>tif51A</i> que apresentam alteração na alça de hipusinação.....	116
4.5- Caracterização dos mutantes de <i>tif51A</i> que apresentam alteração na α-hélice do C-terminal.....	118
4.6- Caracterização dos mutantes de <i>tif51A</i> que produzem a proteína eIF5A estável na temperatura não permissiva de crescimento.....	122
4.6.1- <i>Interação física e funcional entre os mutantes eIF5A^{K56A} e eIF5A^{Q22H/L93F} e suas enzimas modificadoras Dys1 e Lia1.....</i>	122
4.6.2- <i>Caracterização de outros fenótipos dos mutantes eIF5A^{K56A} e eIF5A^{Q22H/L93F}.....</i>	123
4.6.3- <i>Busca de parceiros físicos por copurificação de eIF5A^{K56A} e eIF5A^{Q22H/L93F}.....</i>	125
5. DISCUSSÃO.....	135
5.1- Análise estrutural de eIF5A	135
5.2- Análise funcional de eIF5A	143
6. CONCLUSÕES	147
REFERÊNCIAS	
ANEXO I	
ANEXO II	

1- INTRODUÇÃO

A tradução, decodificação de RNA mensageiro (mRNA) em proteína, é um processo complexo que envolve mRNA, ribossomos, e uma grande quantidade de fatores adicionais que não apenas promovem o alongamento polipeptídico mas também regulam este processo. O processo de tradução global pode ser dividido em três etapas principais: iniciação, elongação e terminação (Figura 1). Cada uma destas etapas pode ser regulada, resultando na síntese diferencial de determinadas proteínas e, conseqüentemente, em profundas mudanças na fisiologia celular.

1.1- O mecanismo de tradução

A maquinaria de síntese protéica é altamente conservada evolutivamente (Bult *et al.*, 1996; Kyrpides e Woese, 1998). A síntese de proteínas constitui um dos processos mais complexos do metabolismo celular, sendo além de um importante ponto de regulação da expressão gênica, o processo bioquímico que consome maior parte da energia celular sob a forma de ATP e GTP. Os componentes protéicos envolvidos na síntese de proteínas representam mais de 50% do total de proteínas celulares (Kozak, 1983; Merrick, 1992). Algumas características da tradução como translocação do ribossomo, formação de ligações peptídicas e as funções das subunidades maior e menor do ribossomo são praticamente idênticas em procariotos e eucariotos (Kozak, 1983).

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 regulada (Pestova *et al.*, 2001). Resumidamente, o início da tradução começa com a formação de um complexo ternário, composto por GTP, tRNA iniciador de metionina e o fator de iniciação eIF2 (Pestova *et al.*, 2007). Juntamente com fatores adicionais de iniciação (eIF3, eIF5, eIF1 e eIF1A), o complexo ternário forma o complexo multifatorial (MFC), o qual se associa com a subunidade ribossomal 40S para formar o complexo de pré-iniciação 43S (Chaudhuri *et al.*, 1999; Majumdar *et al.*, 2003). Em eucariotos, o mRNA é ativado pela ligação do eIF4F (eIF4E, eIF4G e eIF4A) ao “cap” e PABP à cauda de poli(A), circularizando o mRNA (Gingras *et al.*, 1999; Sonenberg e Hinnebusch, 2009). O complexo de pré-iniciação 43S é então recrutado pela extremidade 5' do mRNA através da interação dos fatores eIF3/eIF5

com eIF4G/eIF4B, formando o complexo 48S. Em seguida, complexo 48S desliza pelo mRNA na direção da extremidade 3' até encontrar o códon de iniciação AUG, geralmente o primeiro AUG da sequência, onde a subunidade 60S se acopla, formando o ribossomo 80S, para começar a elongação polipeptídica (Pisareva *et al.*, 2008; Pestova *et al.*, 1998; Pestova *et al.*, 2002).

Em contraste com o início, a elongação da tradução é um processo mais simples, mas não menos importante. O mecanismo de elongação é responsável por manter a janela correta de leitura do mRNA, selecionar e acoplar corretamente os aminoacil tRNAs ao ribossomo 80S e formar as ligações peptídicas entre os aminoácidos. Dois fatores de elongação são necessários para estas tarefas: eEF1A, que ajuda a acoplar os tRNAs ao ribossomo, e eEF2, que promove a translocação do ribossomo ao longo do mRNA (Taylor *et al.*, 2007). Com o tRNA iniciador acoplado ao sítio P do ribossomo 80S, ciclos repetitivos de adição de aminoacil-tRNAs começam. Existe considerável homologia entre os sistemas de procarioto e eucarioto com relação às seqüências primárias de eEF1A e EF-Tu, e eEF2 e EF-G; e uma forte semelhança funcional entre eEF1B α (β) γ e EF-Ts (Merrick, 1992). Dessa maneira, muito do que é conhecido e está apresentado neste resumo sobre elongação está centrado no que existe de mais conhecido no sistema bacteriano, incluindo o modelo proposto por Moazed e Noller apresentado na Figura 2 (Moazed e Noller, 1986).

Uma vez ligado a GTP, eEF1A direciona a ligação do aminoacil-tRNA ao códon do sítio A do ribossomo. Esse processo é provavelmente guiado pela interação entre eEF1A e o ribossomo. A correspondência correta entre códon e anti-códon desencadeia mudanças conformacionais no ribossomo e a hidrólise do GTP, o qual leva à liberação de eEF1A-GDP, conforme ilustrado na Figura 2 (Merrick, 1992). O tempo de permanência do aminoacil-tRNA no sítio A é muito curto pois quando existe a presença do aminoacil-tRNA (ou posteriormente chamado peptidil-tRNA) no sítio P, rapidamente, ocorre a formação de uma ligação peptídica, através da ação do centro da peptidil transferase localizada na subunidade maior do ribossomo, entre o aminoácido ligado ao aminoacil-tRNA localizado no sítio A e o aminoácido ligado ao peptidil-tRNA localizado no sítio P. Nessa reação, há o ataque nucleofílico pelo α -aminogruppo do aminoacil-tRNA localizado no sítio A ao grupo carbonil do aminoacil-tRNA (ou peptidil-tRNA) localizado no sítio P. Isso leva à transferência da metionina iniciadora (ou peptídeos) do tRNA localizado no sítio P para o aminoacil-tRNA

localizado no sítio A (Merrick, 1992).

De acordo com o modelo de Moazed e Noller apresentado na Figura 2 (Moazed e Noller, 1986), em seguida, a extremidade 3' do peptidil-tRNA em formação é deslocada para o sítio P, enquanto que o anti-códon permanece no sítio A. A extremidade 3' do tRNA não carregado (tRNA desacilado) é então deslocado para o sítio E, enquanto o seu anticódon não se move. A consequência dessa ação é que a cadeia do novo polipeptídeo alonga mas não se move. O próximo passo, a translocação, é realizado por eEF2, de maneira dependente de GTP. Este processo provoca o movimento do mRNA por três nucleotídeos, isto é, um códon, de modo que um novo códon fica livre no sítio A. Isto também significa que os anti-códons do tRNA não carregado e o novo peptidil-tRNA são deslocados. Dessa maneira, o tRNA não carregado preenche o sítio E e o novo peptidil-tRNA preenche o sítio P. É importante destacar que os sítios ribossomais que interagem com os fatores de elongação eEF1A e eEF2 se sobrepõem (Nygard e Nilsson, 1990).

Neste ponto, o ribossomo está disponível a submeter-se ao próximo ciclo de elongação. A maior parte da energia necessária para a síntese de proteína é usada durante a elongação. Essencialmente, são usados dois fosfatos de alta energia por ciclo (eEF1A e eEF2) e dois fosfatos de alta energia são usados para gerar cada aminoacil-tRNA ($AA + ATP + tRNA \rightarrow AMP + PP_i + AA-tRNA$ com a PP_i geralmente sendo dividido em duas moléculas de P_i). Assim, a formação de cada ligação peptídica tem um custo energético de quatro fosfatos de alta energia (Merrick, 1992).

Finalmente, a terminação da tradução é mediada pelo fator de liberação eRF1, que reconhece um dos três códons de parada (UAA, UGA e UAG) e se liga ao ribossomo no lugar de um tRNA. Esse evento, junto com a ligação de eRF3, estimula a hidrólise de GTP e a liberação da cadeia peptídica, como apresentado na Figura 1. (Fan-Minogue *et al.*, 2008; Ehrenberg *et al.*, 2007).

A complexidade de cada uma destas três etapas da tradução é proporcional à quantidade de regulação que ocorre em cada uma delas. Os mecanismos de controle traducional mais descritos afetam muito o início da tradução, embora não necessariamente uma fase específica de início (Raught e Gingras, 2007). Isso faz sentido uma vez que, energeticamente, é mais favorável controlar o primeiro passo de um processo metabólico. Relativamente, poucos exemplos de regulação da tradução na fase de elongação são conhecidos, embora alguns deles são determinados a partir do estado de fosforilação de eEF2 (Redpath *et al.*, 1993).

Finalmente, com a exceção da existência de stop códons prematuros, que leva à degradação do mRNA, há poucos exemplos claros de regulação da tradução na fase de terminação (Groppo e Richter, 2009).

1.2- A proteína eIF5A

O fator de início de tradução 5A de eucariotos (eIF5A – “eukaryotic translation initiation factor 5A”), inicialmente chamado de eIF4D, foi originalmente purificado a partir de ribossomos extraídos de lisados de reticulócitos de coelho (Benne e Hershey, 1978). A denominação dada a esta proteína decorreu da sua capacidade de estimular de 2 a 3 vezes a síntese de metionil-puromicina, um ensaio *in vitro* utilizado como modelo para avaliar fatores envolvidos na formação da primeira ligação peptídica durante a tradução (Benne e Hershey, 1978; Park *et al.* 1993).

Em *Saccharomyces cerevisiae*, dois genes homólogos codificam para eIF5A: *TIF51A* (*HYP2*) e *TIF51B* (*HYP1*). Estes genes estão localizados em cromossomos distintos (Wohl *et al.*, 1992) e são regulados reciprocamente por oxigênio ou heme (Mehta *et al.*, 1990; Zitomer e Lowry, 1992; Schwelberger *et al.*, 1993). Desta forma, este tipo de regulação gênica determina qual isoforma estará disponível na célula sob condições de alta ou baixa tensão de oxigênio. Leveduras em aerobiose expressam somente *TIF51A*, cuja atividade é essencial para o crescimento celular nestas condições (Schnier *et al.*, 1991; Wohl *et al.*, 1993; Valentini *et al.*, 2002). Em condições anaeróbicas, por sua vez, é observada a presença exclusiva do produto codificado por *TIF51B* (Kang *et al.*, 1992; Schnier *et al.*, 1991; Tome e Gerner, 1997). Como esperado, a deleção de *TIF51B* não influencia as taxas de crescimento de células haplóides em aerobiose (Wohl *et al.*, 1993).

Assim como em levedura, as células humanas também possuem duas isoformas de eIF5A, as quais são designadas eIF5A-1 e eIF5A-2. No entanto, a maioria destas células expressa constitutivamente apenas o gene da isoforma eIF5A-1. Recentemente, foi mostrado que o gene *Eif5a1*, que codifica eIF5A-1, é essencial para o desenvolvimento embrionário de camundongo, não sendo substituível pelo gene codificador de eIF5A-2 (Park *et al.*, 2009). Surpreendentemente, a superexpressão do mRNA de eIF5A-2 foi observada em certas linhagens de células cancerígenas, em contraste com a fraca e limitada produção desta isoforma apenas em testículos e cérebro. Diante deste dado foi

sugerido um papel hipotético de eIF5A-2 como um oncogene potencial (Guan *et al.*, 2001; Clement *et al.*, 2003).

As proteínas codificadas pelos dois genes de *S. cerevisiae* são altamente similares, compartilhando 90% de identidade, sendo que em relação à proteína de humano, esta identidade é de 63%, o que sugere sua importância em processos celulares comuns (Schnier *et al.*, 1991). A caracterização funcional das isoformas humanas eIF5A-1 e eIF5A-2, as quais compartilham 84% de identidade, revelou que ambas as proteínas podem garantir o crescimento de uma linhagem de levedura em que ambos os genes *TIF51A* e *TIF51B* foram deletados (Clement *et al.*, 2003). Este fato mostra que eIF5A humana e de levedura não são apenas conservadas, mas são funcionalmente intercambiáveis *in vivo*. Desta forma, a demonstração de a proteína humana substituir completamente a proteína de levedura reforça a importância de eIF5A em processos celulares básicos.

eIF5A sofre duas modificações pós-traducionais. A primeira delas consiste na fosforilação de um resíduo de serina acetilado no N-terminal (Kang *et al.*, 1993; Klier *et al.*, 1993). A remoção deste resíduo revelou que a forma não fosforilada deste fator é suficiente para promover o crescimento de células *tif51AΔ* haplóides (Klier *et al.*, 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 formação do resíduo de aminoácido hipusina a partir de um resíduo específico de lisina em eIF5A (Chen e Liu, 1997; Park *et al.*, 1997).

O aminoácido hipusina [N^ε-(4-amino-2-hidroxibutil)-lisina] foi descoberto a partir de extratos de cérebro bovino em 1971 por Shiba e colaboradores em sua busca por aminoácidos básicos e incomuns na célula. Após determinação de sua estrutura química, o nome hipusina foi proposto com base na relação estrutural desse aminoácido com porções dos compostos hidroxiputrescina e lisina (Shiba *et al.*, 1971). No entanto, a origem do grupamento 4-amino-2-hidroxibutil, o mecanismo de sua síntese e a fonte de hipusina eram totalmente desconhecidos. Em 1981, Park e colaboradores descobriram que a cadeia lateral do aminoácido hipusina era derivada da poliamina espermidina e que a síntese de hipusina tratava-se de uma modificação pós-traducional a ocorrer em uma única proteína da célula (Park *et al.*, 1981). Mais tarde, o fator eIF5A foi revelado como a única proteína a possuir o aminoácido hipusina na célula (Cooper *et al.*, 1983).

Não existe mecanismo conhecido para a síntese de hipusina como aminoácido

livre. Do contrário, a formação do aminoácido hipusina em eIF5A ocorre através da ação seqüencial de duas enzimas, desoxihipusina sintase e desoxihipusina hidroxilase (Park *et al.*, 1982; Murphey e Gerner, 2003; Park *et al.*, 1996). A enzima desoxihipusina sintase (Dys1 em levedura, DHS em humano) catalisa a transferência do grupo aminobutil da poliamina espermidina para o amino grupo livre de um resíduo específico de lisina no precursor de eIF5A (K51 em levedura, K50 em humano) para formar um intermediário contendo o resíduo desoxihipusina. O intermediário formado é então hidroxilado pela enzima desoxihipusina hidroxilase (Lia1 em levedura, DOHH em humanos) completando a síntese de hipusina e, conseqüentemente, a maturação de eIF5A (Abbruzzese *et al.*, 1986; Park *et al.*, 1997), como pode ser observado na Figura 3. De modo interessante, a primeira reação, catalizada pela desoxihipusina sintase é reversível (Park, 2006).

eIF5A e suas enzimas modificadoras foram preservadas ao longo da evolução. Em especial, a sequência de aminoácidos de eIF5A ao redor do sítio de hipusinação é extremamente conservada de arqueas a eucariotos superiores, revelando a importância desta modificação ao longo da evolução (sequência marcada por uma barra horizontal na Figura 4). Essa região conservada é formada por uma sequência invariável de doze resíduos de aminoácidos: STSKTG-hipusina-HGHAK (Magdolen *et al.*, 1994; Chen e Liu, 1997). A enzima desoxihipusina sintase, por sua vez, também apresenta uma sequência de aminoácidos altamente conservada, e as enzimas das diferentes espécies apresentam propriedades catalíticas similares (Kang *et al.*, 1995).

A hipusina é produzida imediatamente após a tradução do RNA mensageiro de eIF5A e não é alterada ou removida até que a proteína eIF5A seja degradada (Park *et al.*, 1993). Desta forma, a modificação é essencialmente irreversível. Ao contrário da maioria das outras modificações pós-traducionais que ocorrem em uma grande variedade de substratos, a síntese de hipusina envolve apenas um substrato protéico.

O fato de eIF5A ser a única proteína eucariótica que sofre hipusinação evidencia uma atividade biológica fundamental para este fator. A importância da hipusinação para a atividade da proteína eIF5A foi inicialmente mostrada a partir da observação de que eIF5A humana recombinante, não hipusinada, foi incapaz de estimular a síntese *in vitro* de metionil-puomicina (Smit-McBride *et al.*, 1989). Entretanto, quando este precursor foi modificado *in vitro* para a forma hipusinada, a

proteína resultante tornou-se ativa neste ensaio (Park *et al.*, 1989). Contudo, os dados mais convincentes da importância de eIF5A hipusina foram aqueles que demonstraram que o nocaute do gene codificador da enzima desoxihipusina sintase de camundongo leva à morte embrionária (Park *et al.*, 2009), e células de levedura nas quais a hipusinação foi bloqueada, por substituição da lisina alvo (K51R) ou deleção do gene que codifica para desoxihipusina sintase, também tornaram-se inviáveis (Schnier *et al.*, 1991).

Ainda, inibidores de DHS e DOHH exercem efeito antiproliferativo em células de mamífero, sugerindo a importância da proteína eIF5A hipusina na proliferação celular (Hanauske-Abel *et al.*, 1994; Park *et al.*, 1994). De modo interessante, embora o gene codificador da enzima desoxihipusina hidroxilase seja essencial em eucariotos superiores (multicelulares) como *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila melanogaster* (Maeda *et al.*, 2001; Spradling *et al.*, 1999; Patel *et al.*, 2009), este gene não é essencial em *S. cerevisiae*, sugerindo que a forma intermediária de eIF5A (eIF5A-Dhp) é funcional em levedura. Contudo, análise da proteína endógena de levedura indica a presença predominante da forma hipusina de eIF5A (Park *et al.*, 2009).

eIF5A, hipusina e as duas enzimas modificadoras são encontradas essencialmente em todas as células eucarióticas, de leveduras a mamíferos (Figura 5). Arqueas, por sua vez, possuem o homólogo denominado aIF5A (eIF5A de arqueas) e a primeira enzima modificadora desoxihipusina sintase. No entanto, nenhuma hidroxilase capaz de modificar especificamente aIF5A foi identificada até o momento no proteoma ou genoma dessas espécies (Park, 2006). Curiosamente, foi descrito que desoxihipusina, hipusina ou ambos ocorrem em algumas espécies (Bartig *et al.*, 1990), restando a dúvida de como hipusina pode ser então formada nestes organismos. Em contraste com eucariotos e arqueas, não existe evidência para a ocorrência dos componentes da via de formação da hipusina em bactérias, as quais possuem um homólogo distante de eIF5A, o fator de alongação EF-P (Hanawa-Suetsugu, 2004). Esses dados sugerem que eIF5A e suas enzimas modificadoras evoluíram sequencialmente, mas de forma independente (Figura 5).

eIF5A é uma proteína ácida (pI 5,4) com massa molecular de 18–21kDa, dependendo da espécie (Park *et al.*, 1997). A estrutura terciária de eIF5A foi determinada por cristalografia para as proteínas das arqueas *Methanococcus jannaschii* (Kim *et al.*, 1998), *Pyrobaculum aerophilum* (Peat *et al.*, 1998) e

Pyrococcus horikoshii (Yao *et al.*, 2003). Ainda, as estruturas de eIF5A de *Leishmania braziliensis* e *Leishmania mexicana* foram depositadas no “Protein Data Bank” (PDB ID 1XTD, 1X6O) e a de humano foi recentemente resolvida (Tong *et al.*, 2009). De acordo com estes estudos, os vários organismos apresentam estruturas com pequenas diferenças. eIF5A apresenta dois domínios: um domínio N-terminal básico que contém uma alça exposta onde se localiza a lisina alvo da hipusinação e um domínio C-terminal ácido. De modo interessante, a estrutura aIF5A é bastante semelhante à dois domínios de EF-P (Hanawa-Suetsugu *et al.*, 2004). Estas semelhanças estruturais sugerem a existência de uma certa conservação funcional entre as proteínas de bactéria, arquea e eucarioto. Outro dado molecular interessante é que eIF5A purificada de eritrócitos de humano apresentam-se como dímero em condições fisiológicas, o que sugere que essa proteína nativa possa ser dimérica (Chung *et al.*, 1991). Recentemente, um homólogo de eIF5A em arquea apresentou atividade ribonucleolítica específica *in vitro*, dependente do estado oligomérico da proteína (Wagner e Klug, 2007).

A estrutura cristalográfica da enzima desoxihipusina sintase humana recombinante complexada com seu cofator NAD (Liao *et al.*, 1998) ou com NAD e o inibidor N1-guanil-1,7-diaminoheptano - GC₇ (Umland *et al.*, 2004) foi determinada. Essa enzima é tetramérica, composta por quatro subunidades idênticas, e possui aproximadamente 40kDa na proteína humana e 43kDa na proteína de levedura. As enzimas desses dois organismos compartilham 68% de identidade na sequência de aminoácidos (Wolff *et al.*, 2007). A estequiometria do complexo enzima-eIF5A foi determinada como sendo de uma molécula de eIF5A para quatro de Dys1. A explicação para isso estaria no fato de que essa enzima está envolvida com mecanismos regulatórios e/ou estabilização da ligação enzima-substrato (Umland *et al.*, 2004). É sugerido também que essa modificação pós-traducional possa ser modulada por alterações estruturais de Dys1 (Liao *et al.*, 1998). Nosso laboratório mostrou que, *in vivo*, a porção N-terminal de Dys1 pode ser um regulador da interação dessa enzima com seu substrato eIF5A (Thompson *et al.*, 2003). A sequência de aminoácidos da proteína humana DOHH, codificada pelo gene *HLRC1*, é 48% idêntica e 61% similar à proteína codificada pelo gene *YJR070C* de levedura. Estudos de predição de estrutura secundária revelaram que DOHH pode assumir uma estrutura superhelicoidal consistindo de oito repetições “HEAT” organizadas em uma díade simétrica (Park, 2006).

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, geralmente AUG, interagindo com o anti-códon de um Met-tRNA_i no sítio ribossomal P. O antibiótico puromicina é um análogo estrutural da extremidade 3' de um aminoacil-tRNA e pode ocupar o sítio ribossomal A, possibilitando que seu radical amino primário interaja com o Met-tRNA_i, reproduzindo a formação de uma ligação peptídica (Figura 6). 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 e 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). Assim, apesar de eIF5A ter sido denominado inicialmente como um fator de início de tradução, a sua função como tal nunca foi claramente demonstrada.

A designação desta proteína como um fator geral do início da tradução também foi comprometida por ensaios de depleção *in vivo*. A análise da taxa de síntese protéica durante a rápida depleção de eIF5A em *S. cerevisiae* revelou uma redução de apenas 30% na taxa de síntese protéica total (Kang e Hershey, 1994). Diante deste dado, foi alternativamente sugerido que este fator poderia ser seletivamente requerido para a tradução de uma classe específica de RNA mensageiros, como por exemplo, aqueles envolvidos na transição G1/S do ciclo celular. Essa hipótese foi levantada, pois vários autores mostraram que o bloqueio de qualquer uma das etapas envolvidas na hipusinação de eIF5A leva a uma inibição da proliferação celular de diferentes linhagens tumorais de células de mamíferos (Chen *et al.*, 1996; Hanauske-Abel *et al.*, 1994; Park *et al.*, 1994; Shi *et al.*, 1996; Tome e Gerner, 1997). Ainda, a observação de que em *S. cerevisiae*, após a depleção de eIF5A, ocorre um aumento de células estacionadas na fase G1 do ciclo celular (Kang e Hershey, 1994), aliada ao fato de sua expressão estar aumentada em linfócitos T

ativados (Bevec *et al.*, 1994) reforçam o envolvimento de eIF5A na progressão do ciclo celular.

Apesar de ter sido proposta a participação de eIF5A no transporte nucleocitoplasmático da proteína Rev de HIV-1 (Ruhl *et al.*, 1993; Bevec *et al.*, 1996; Bevec e Hauber, 1997; Liu *et al.*, 1997; Hofmann *et al.*, 2001), outros estudos não concordam com a atribuição dessa função ao fator eIF5A (Henderson e Percipalle, 1997; Shi *et al.*, 1997; Lipowsky *et al.*, 2000; Valentini *et al.*, 2002). Dentre esses estudos, uma análise da localização subcelular de Rev utilizando diferentes linhagens de células de mamíferos, revelou que esta proteína, produzida transientemente, está localizada no núcleo, e que eIF5A apresenta uma localização citoplasmática que coincide com a do retículo endoplasmático (Shi *et al.*, 1996). Ainda, a localização de Rev é alterada completamente, em contraste com a de eIF5A que permanece inalterada, quando é realizado o tratamento com inibidores da transcrição. Entretanto, inibidores da tradução, alteram a localização subcelular de eIF5A, mas não de Rev. Esses dados sugerem que eIF5A não sofre translocação nucleocitoplasmática como ocorre com Rev (Shi *et al.*, 1997).

Também foi demonstrado que em levedura eIF5A apresenta uma localização citoplasmática com maior concentração perinuclear (Valentini *et al.*, 2002). Esta localização perinuclear não é alterada em leveduras contendo um alelo temperatura-sensível de *XPO1*, gene que codifica para CRM1/exportina1, na temperatura não permissiva. Assim como acontece em mamíferos, o bloqueio da ação de exportina1 em leveduras leva a um acúmulo de Rev no núcleo. Desta forma, esses dados associam eIF5A com o retículo endoplasmático e compromete o envolvimento de eIF5A com a exportação de proteínas contendo NES através do receptor CRM1/exportina1, como no caso da proteína Rev de HIV-1 (Valentini *et al.*, 2002).

Foi sugerido que o fator eIF5A pode estar envolvido no decaimento de RNA mensageiros, pois foi demonstrado que o mutante temperatura-sensível do gene *TIF51A*, *ts1159*, acumula mRNAs sem o capacete 7-metil-guanosina na temperatura não permissiva (Zuk e Jacobson, 1998). Assim como o mutante *ts1159*, os mutantes *tif51A-1*, *tif51A-2* e *tif51A-3* descritos por nosso laboratório (Valentini *et al.*, 2002) também acumulam mRNAs na temperatura não permissiva. Entretanto, os nossos resultados sugerem que esse possível papel de eIF5A seja secundário, pois o fenótipo de inibição do crescimento não se correlaciona diretamente com o defeito na degradação de RNA mensageiros (Valentini *et al.*, 2002).

Diversos genes foram isolados por nosso laboratório como supressores em alto número de cópias do fenótipo de sensibilidade à temperatura do mutante *tif51A-1*. Dentre os genes isolados, destacam-se *PKC1*, *GIC1* e *ZDS1* (Valentini *et al.*, 2002; Zanelli e Valentini, 2005). O encontro desses genes levou à sugestão de uma nova via de sinalização celular a partir de Pkc1. Esta proteína participa da resposta a choque hiposmótico desencadeada pelas proteínas Wsc1, 2 e 3, cujos genes também foram supressores de *tif51A-1*. Os supressores *PKC1*, *GIC1* e *ZDS1* são importantes para a polaridade celular em *S. cerevisiae*, um processo essencial para a progressão do ciclo celular deste organismo. De fato, os mutantes de eIF5A apresentaram defeitos na polarização do citoesqueleto de actina na temperatura não-permissiva, evidenciando a correlação de eIF5A com a progressão do ciclo celular, como já discutido anteriormente (Zanelli e Valentini, 2005).

Adicionalmente, um rastreamento de letalidade sintética foi realizado utilizando o mutante temperatura-sensível *tif51A-3* e revelou o gene *YPT1* como sendo sinteticamente letal com *TIF51A* (Frigieri *et al.*, 2007). O encontro da letalidade sintética entre *tif51A-3* e *ypt1* é interessante, pois passou a envolver direta ou indiretamente a proteína eIF5A com a via secretória, uma vez que a proteína Ypt1 trata-se de uma GTPase envolvida com o trânsito vesicular do retículo endoplasmático para o Golgi. O dado de que os genes supressores *PKC1*, *WSC1*, *WSC2* e *WSC3* estão relacionados ao correto funcionamento da via secretória (Gustin *et al.*, 1998) fortalece o envolvimento de eIF5A nesta via do metabolismo celular. De modo interessante, foi observado que mutações na via secretória direcionam a uma rápida e específica atenuação do início de tradução. Isto ocorre como resposta primária da célula para preservação de energia e prevenção de acúmulo de proteínas não localizadas adequadamente devido à inativação do transporte vesicular (Deloche *et al.*, 2004). Diante deste dado, foi sugerido por nosso laboratório que eIF5A e Ypt1 trabalhem juntas na célula para garantir a síntese protéica apropriada e a secreção das proteínas necessárias para a formação do novo broto durante a fase G1/S em levedura.

Em estudos mais recentes, empregando as técnicas de duplo-híbrido e copurificação, foram identificados vários componentes da maquinaria traducional como ligantes físicos de eIF5A, tais como proteínas ribossomais das subunidades 40S e 60S, além de fatores de alongação, dependentemente da interação com ribossomo (Schatz *et al.*, 1998; Zanelli *et al.*, 2006; Jao *et al.*, 2006). Essas

interações foram confirmadas por diferentes técnicas, em diferentes condições, as quais demonstraram que eIF5A liga-se à monossomos funcionalmente ativos (Zanelli *et al.*, 2006), na presença do aminoácido hipusina (Zanelli *et al.*, 2006; Jao *et al.*, 2006). Ainda, foi demonstrado que mutantes condicionais de eIF5A de levadura são sensíveis à antibióticos inibidores da síntese protéica (Zanelli *et al.*, 2006; Cano *et al.*, 2008; Gregio *et al.*, 2009; Saini *et al.*, 2009).

Um vez que análises iniciais do perfil polissomal de mutantes de eIF5A não evidenciaram o envolvimento desta proteína com o início da tradução (Kang e Hershey, 1994; Zuk e Jacobson, 1998), novos ensaios desse tipo foram realizados, desta vez utilizando diferentes mutantes temperatura-sensível de eIF5A. Estes estudos revelaram um aumento de polissomos em relação a monossomos na temperatura não permissiva, dados que sugerem defeito na elongação da tradução para esses mutantes (Zanelli *et al.*, 2006; Gregio *et al.*, 2009; Saini *et al.*, 2009). Ao verificar a velocidade do trânsito ribossomal nesses mesmos mutantes, foi constatado um atraso significativo na temperatura não permissiva (Gregio *et al.*, 2009; Saini *et al.*, 2009), resultado que sustenta a idéia do envolvimento da proteína eIF5A com a elongação da tradução. Ainda, mutantes de eIF5A não apresentaram formação do “P-bodies” (agregados de mRNA e proteínas, onde ocorre a degradação do mRNA) na temperatura não permissiva, característica semelhante à observada para células tratadas com cicloheximida, um inibidor da elongação da tradução. Este efeito sobre os “P-bodies” também é consistente com um papel de eIF5A na fase de elongação de tradução (Gregio *et al.*, 2009).

Finalmente, um mutante de eIF5A (*tif51A*^{D63V}) apresentou alteração na janela de leitura da elongação da tradução em +1 (“ribosomal programmed frame-shift”), de forma similar ao que acontece com a célula selvagem tratada com sordarina, um inibidor do fator de elongação eEF2. Esse resultado, aliado ao fato desse mutante ser sensível à sordarina, sugere uma interação funcional entre eIF5A e o fator de elongação eEF2 durante o ciclo celular (Saini *et al.*, 2009). De acordo com essa idéia, o mutante *tif51A-3* mostrou-se sinteticamente letal com o mutante dominante negativo do fator de elongação *eft2*^{H699K} (Gregio *et al.* 2009).

Assim, apesar de estimular a síntese *in vitro* de metionil-puomicina, não é certo se eIF5A funciona como um fator de início de tradução *in vivo* e se sua atividade celular é limitada a esse efeito. Ainda, através de diferentes estudos, eIF5A foi relacionado com proliferação celular, decaimento de mRNAs, integridade da

parede celular e polarização do citoesqueleto de actina. Embora a função de eIF5A como fator de início de tradução nunca ter sido claramente demonstrada, a comprovação recente de que eIF5A associa-se com ribossomos ativamente engajados na tradução trouxe esta proteína de volta ao cenário da tradução (Zanelli *et al.*, 2006; Jao e Chen, 2006). De modo interessante, os defeitos dos mutantes de eIF5A sensíveis à temperatura observados nos perfis polissomais, no trânsito ribossomal e na formação de “P-bodies” sugerem um papel para eIF5A no passo de alongação da tradução ao invés do início da tradução (Zanelli *et al.*, 2006; Jao e Chen 2006; Gregio *et al.*, 2009; Saini *et al.*, 2009). Entretanto, o mecanismo pelo qual eIF5A afeta a tradução e se o efeito ocorre na tradução global ou de um grupo específico de mRNAs são questões ainda em aberto.

Embora existam mutantes de eIF5A de *S. cerevisiae* descritos na literatura (Zuk e Jacobson, 1998; Valentini *et al.*, 2002; Chatterjee *et al.*, 2006; Saini *et al.*, 2009), nenhuma análise mutacional ampla de eIF5A foi descrita até o momento. Este trabalho promoveu a caracterização da relação estrutura-função da proteína eIF5A de eucarioto, através da determinação da estrutura cristalográfica dessa proteína de *S. cerevisiae* e da sua análise mutacional. Os mutantes descritos aqui contribuíram para o melhor entendimento dos fatores estruturais de eIF5A essenciais para a viabilidade celular, os quais incluem a alça de hipusinação e a α -hélice do C-terminal. De modo interessante, os fenótipos apresentados pelos mutantes eIF5A^{K56A} e eIF5A^{Q22H/L93F} reforçam o envolvimento de eIF5A com a etapa de alongação da tradução, e apresentam-se como importantes reagentes para futuros estudos funcionais de eIF5A, principalmente com relação a interação física e funcional entre eIF5A e o fator de alongação eEF2.

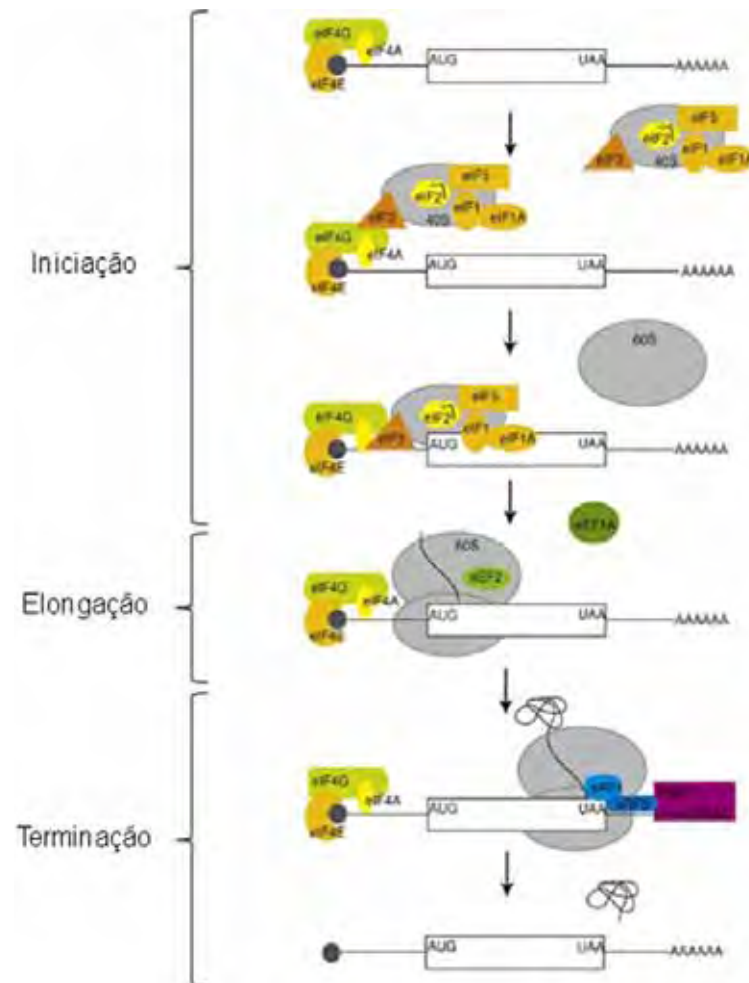


Figura 1. Representação esquemática da tradução. A tradução do mRNA ocorre em três fases: iniciação, elongação e terminação. Durante a fase de iniciação, o mRNA é vinculado ao complexo eIF4F, constituído por eIF4G, eIF4E e eIF4A, através da interação de eIF4E à terminação 5' do mRNA. O complexo de pré-iniciação 43S, composto pelo ribossomo 40S, eIF2-complexo ternário, eIF1, eIF1A, eIF5 e eIF3, é recrutado pelas interações entre eIF4G e eIF3, formando o complexo de pré-iniciação 48S. Esta aglomeração de proteínas e da subunidade 40S ribossomal varre o mRNA até que o codon de início AUG é atingido. A subunidade 60S junta-se e fatores de iniciação são liberados. A elongação da tradução começa quando a cadeia peptídica é sintetizada. O fator de elongação eEF1 α traz os tRNAs para o ribossomo e o fator eEF2 promove a translocação. Uma vez que o códon de terminação é atingido, o fator de liberação eRF1 se liga no lugar de tRNA. eRF3 estimula a hidrólise de GTP e a cadeia peptídeo é liberada juntamente com as subunidades 40S e 60S. (Figura adaptada de Groppo e Richter, 2009).

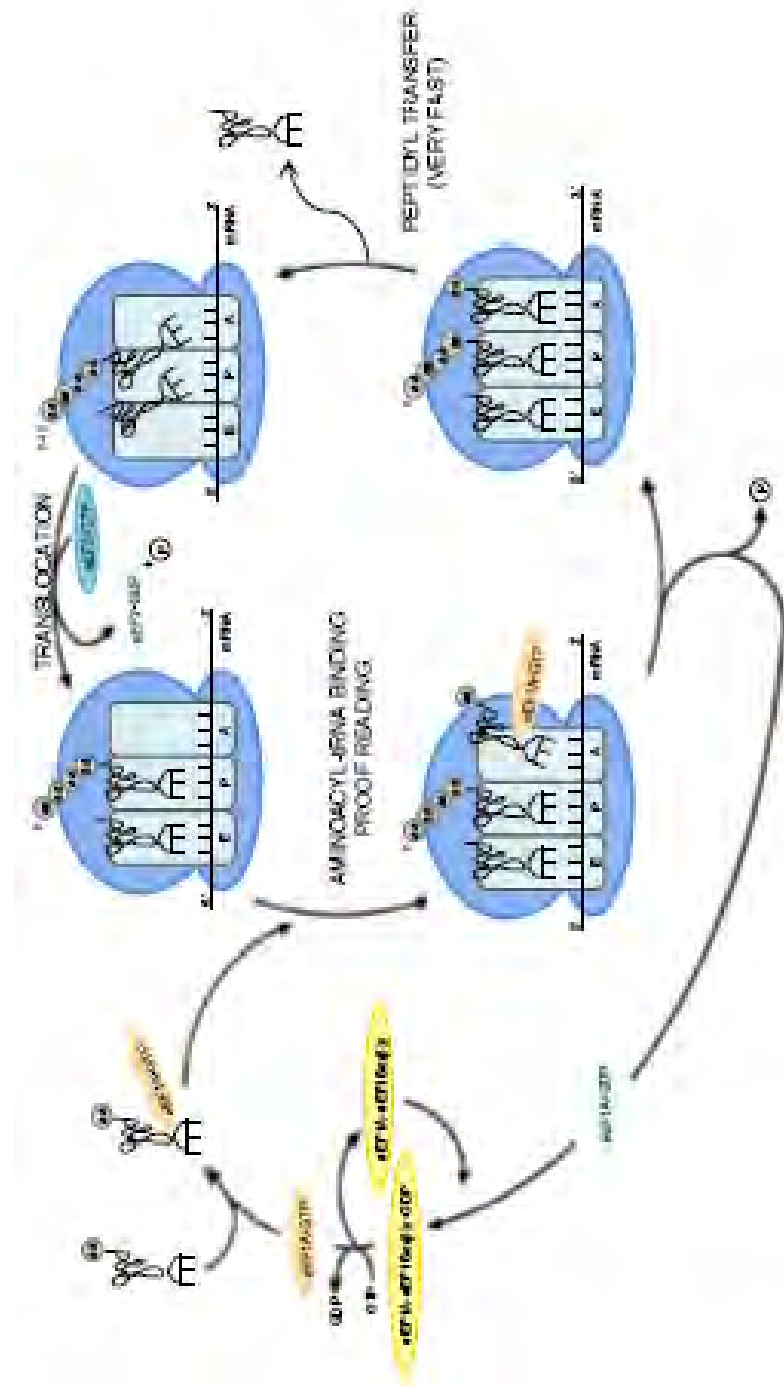


Figura 2. Esquema ilustrativo do mecanismo de elongação da tradução em eucariotos. Este modelo de elongação foi proposto por Moazed e Noller e está baseado na similaridade estrutural e funcional dos fatores de elongação eucarióticos e procarióticos. O sítio E é o local de saída, o posição P é o sítio do peptidil-tRNA, e o sítio A é o local para a ligação do aminoacil tRNA de entrada (Figura adaptada de Merrick, 1992).

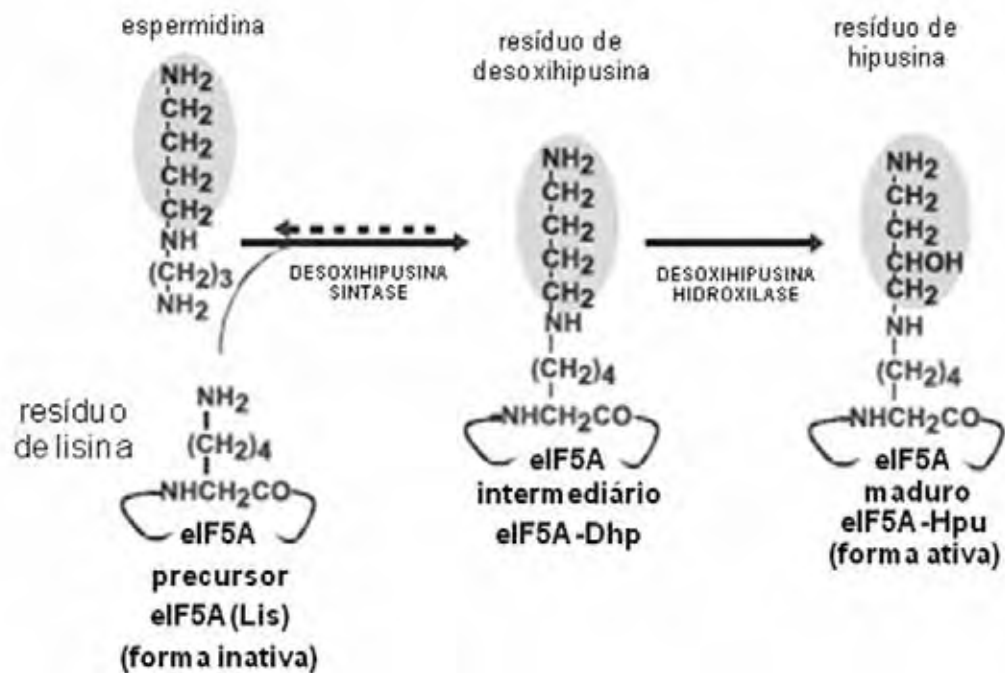


Figura 3. Via de biossíntese do resíduo de aminoácido hipusina no precursor de eIF5A. Esquema simplificado da modificação pós-traducional de eIF5A. A porção 4-aminobutil proveniente da poliamina espermidina está sombreada e é transferida ao resíduo de lisina do precursor inativo de eIF5A por meio da ação da enzima desoxihipusina sintase (Dys1 em levedura, DHS em humano). O intermediário resultante, agora contendo desoxihipusina, é posteriormente hidroxilado pela enzima desoxihipusina hidroxilase (Lia1 em levedura, DOHH em humano) o que resulta na ativação de eIF5A. As cadeias laterais da lisina, desoxihipusina e hipusina estão sendo mostradas (Figura adaptada de Park, 2006).

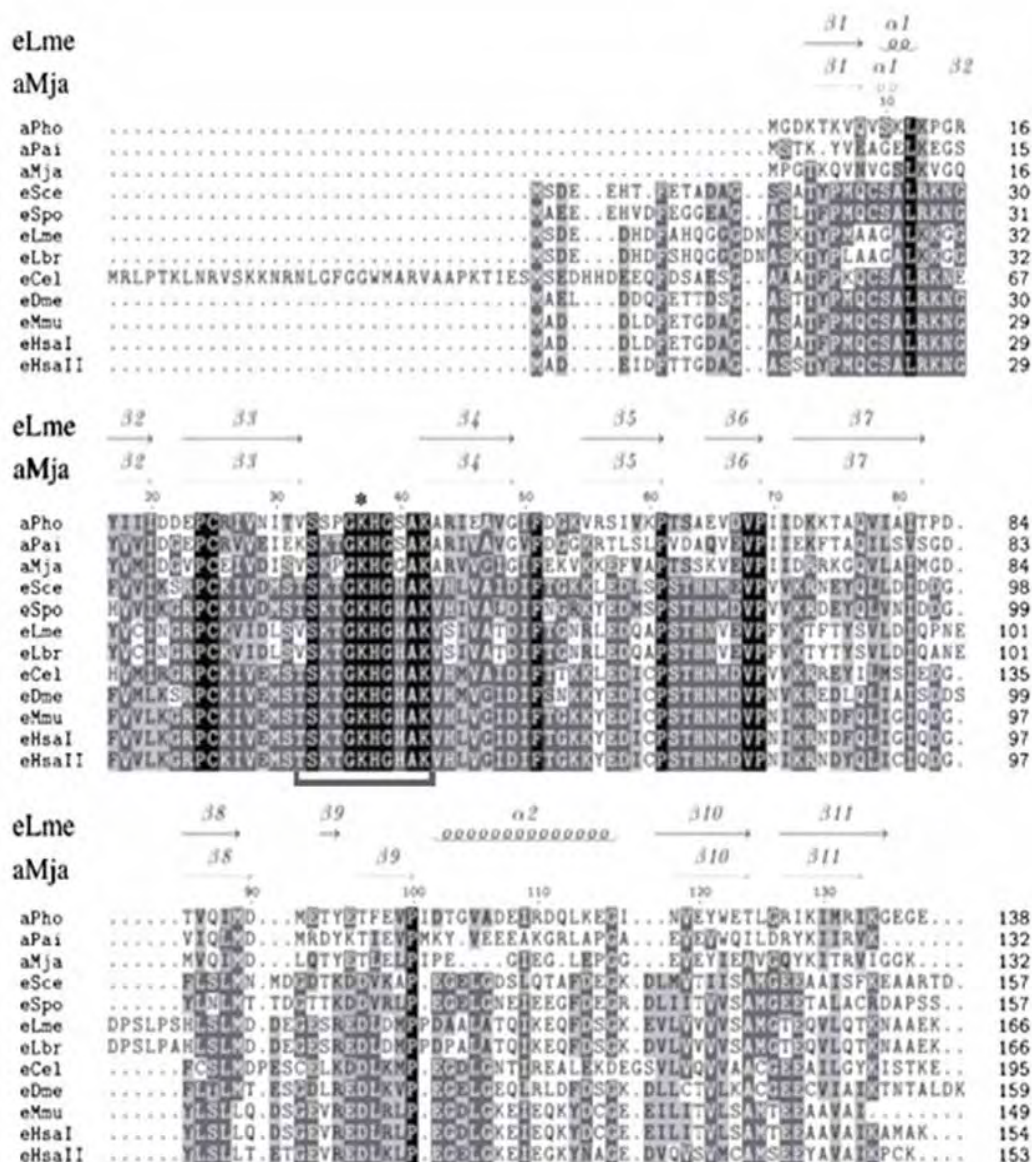


Figura 4. Alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos de eIF5A de diferentes organismos. As sequências de aPho (*Pyrococcus horikoshii*), aPai (*Pyrobaculum aerophilum*), aMja (*Methanococcus jannaschii*), eSce (*Saccharomyces cerevisiae*), eSpo (*Schizosaccharomyces pombe*), eLme (*Leishmania mexicana*), eLbr (*Leishmania braziliensis*), eCel (*Caenorhabditis elegans*), eDme (*Drosophila melanogaster*), eMmu (*Mus musculus*), eHsaI (*Homo sapiens* eIF5A-1) e eHsaII (*Homo sapiens* eIF5A-2) foram comparadas através do programa CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). As estruturas secundárias de eIF5A de eLme e aMja estão indicadas abaixo do alinhamento com setas para estruturas β e curvas para α -hélices. Os resíduos de aminoácidos completamente conservados em todos os organismos estão sublinhados em preto e aqueles que são parcialmente conservados estão marcados em cinza. A maior intensidade do cinza da marcação está associada a maior conservação do resíduo entre os organismos. A marcação horizontal, abaixo da sequência, indica os resíduos que fazem parte da região onde está localizada a hipusina e o sinal asterisco indica o resíduo de lisina modificado para hipusina.

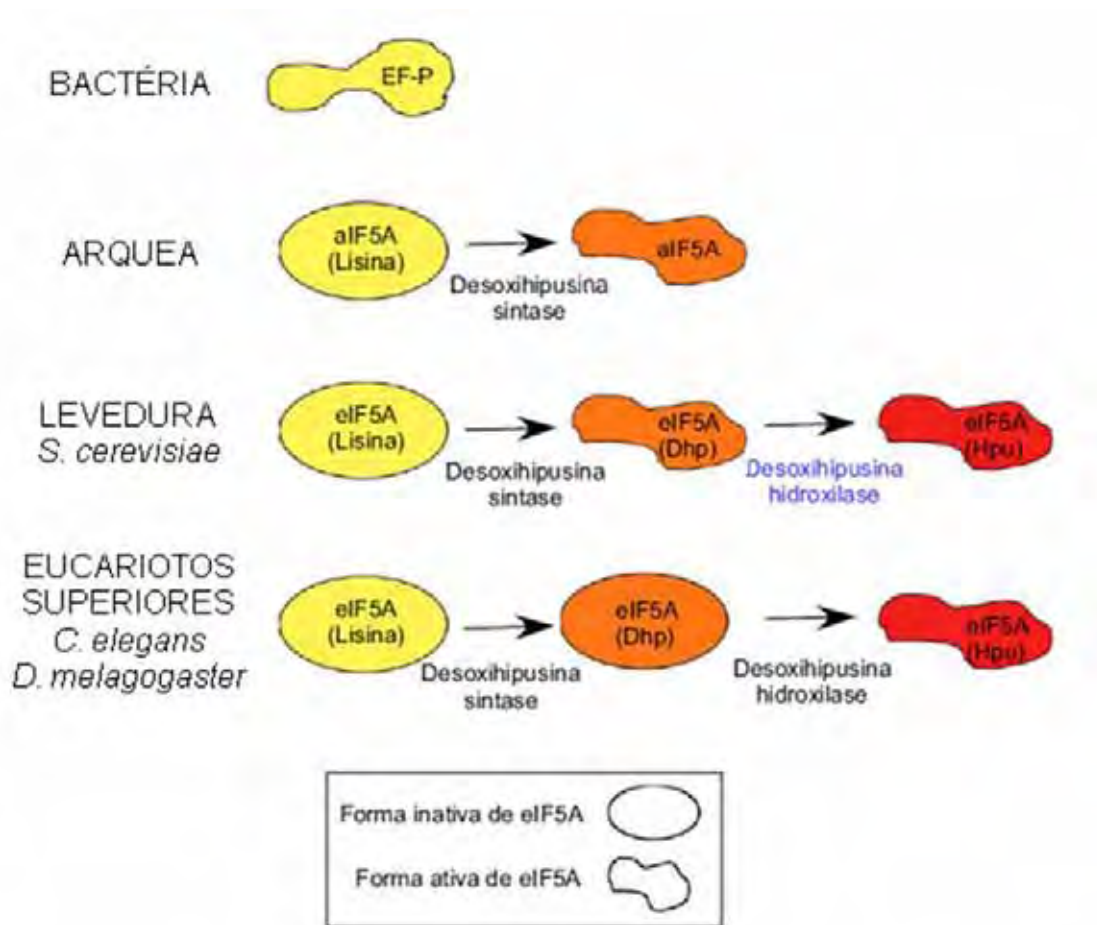


Figura 5. Esquema representativo da evolução de eIF5A e suas enzimas modificadoras. A proteína eIF5A é altamente conservada ao longo da evolução sendo encontrada de arqueas a eucariotos. No entanto, eIF5A não ocorre em bactérias, as quais contêm o homólogo distante, o fator de alongação EF-P. Ao contrário da desoxihipusina sintase, nenhuma hidroxilase é encontrada nas espécies de arqueas. Em levedura a etapa de hidroxilação não é essencial (azul). Em contraste, em organismos eucarióticos multicelulares, eIF5A não é capaz de desempenhar sua atividade biológica se não for totalmente convertido a hipusina (Figura adaptada de Cano, 2008).

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo geral a caracterização da relação estrutura-função da proteína eIF5A de eucarioto. Para isso a levedura *S. cerevisiae* foi utilizada como organismo modelo de estudo para a realização de análises estruturais e mutacionais de eIF5A, essencial para a viabilidade celular.

2.2- Objetivos específicos

- Determinação da estrutura cristalográfica de eIF5A de *S. cerevisiae*.
- Produção e purificação da forma recombinante hipusinada de eIF5A de humano.
- Determinação do estado oligomérico de eIF5A de *S. cerevisiae*, em solução.
- Obtenção e caracterização de novos mutantes de eIF5A.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Material

As linhagens de *S. cerevisiae* e os plasmídeos utilizados neste estudo estão apresentados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente. Da mesma forma, os oligonucleotídeos utilizados estão listados nas Tabelas 3 e 4. A manutenção e o cultivo das linhagens de levedura e de *E. coli*, bem como a composição e o preparo dos meios de cultura e soluções seguiram procedimentos padrões (Guthrie e Fink, 1991; Sambrook *et al.*, 2001; Ausubel *et al.*, 2004).

3.2- Métodos

Os diferentes métodos utilizados estão sendo apresentados de acordo com a ordem dos resultados.

3.2.1- Subclonagem de DNA

3.2.1.1- Digestão de plasmídeos

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

3.2.1.2- Desfosforilação do vetor

Após digestão do vetor, foram adicionadas 5-10 U da enzima fosfatase alcalina (CIAP – “Calf Intestinal Alkaline Phosphatase”) e a reação foi incubada a 37°C por 30 minutos. A reação foi interrompida por aquecimento a 75°C por 10 minutos.

3.2.1.3- Purificação de inserto e vetor

Após digestão dos plasmídeos e realização das modificações necessárias, os produtos obtidos foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8% em TAE

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

3.2.1.4- Reação de ligação

Os fragmentos (vetor e inserto) após a purificação, foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% para avaliar a pureza e estimar a concentração dos mesmos. A reação de ligação foi realizada utilizando um volume final de 20 µL, tampão apropriado, excesso de inserto em relação ao vetor (usualmente 10 vezes) e 200-400 U de T4 DNA ligase. A reação foi incubada a 16°C por 4-24 horas. A introdução dos produtos da reação de ligação em células de *E. coli* DH5α competentes foi realizada como descrito no item 3.2.3.2.

3.2.2- Clonagem empregando a reação de polimerase em cadeia (PCR)

3.2.2.1- Reação de PCR

As reações de PCR foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,5 mL contendo 1 µM de cada oligonucleotídeo, 1 µL de uma mistura de desoxirribonucleotídeos 100 µM cada (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 20 a 40 ng de DNA plasmidial, ou 1 µL de DNA genômico de levedura da preparação obtida no item 3.2.6, e 2 U da enzima HiFi Taq DNA polimerase (Invitrogen) num volume final de reação de 100 µL. As condições das reações foram estabelecidas de acordo com a temperatura de desnaturação dos oligonucleotídeos utilizados. Após o último ciclo, as reações foram mantidas a 72°C por 5 minutos. Os produtos das reações foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TAE (Tris 40 mM, ácido acético glacial 0,11% e EDTA 1 mM) e então purificados utilizando o kit “QIAquick PCR Purification” da QIAGEN.

3.2.2.2- Clonagem do produto de PCR

Os produtos amplificados e purificados foram submetidos à digestão com as enzimas de restrição requeridas, seguindo as condições recomendadas pelo fabricante (New England Biolabs). Os produtos de digestão foram purificados após eletroforese em gel de agarose 0,8%, utilizando o kit “QIAquick Gel Extraction” da QIAGEN. Os fragmentos (vetor e inserto) foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8-1% para avaliar a pureza e estimar a concentração dos mesmos. A reação de ligação e a introdução dos produtos da reação de ligação em células de *E. coli* DH5 α competentes foram realizadas como descrito nos itens 3.2.1.4 e 3.2.3.2, respectivamente.

3.2.3- Transformação bacteriana por choque térmico

3.2.3.1- Competência

Uma colônia de *E.coli* DH5 α foi inoculada em 10 mL de meio LB (extrato de levedura 5 g/L, NaCl 10 g/L e triptona 10 g/L) e incubada a 37°C sob agitação por uma noite. A cultura foi então diluída em 250 mL de meio SOB (triptona 20 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂.4H₂O 10 mM e MgSO₄.7H₂O 10 mM) até atingir D.O._{600nm}=0,6. A cultura foi incubada em banho de gelo por 10 minutos e centrifugada a 2.500xg a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram suspensas em 80 mL de solução TB (Pipes pH 7,0 10 mM, MnCl₂.4H₂O 55 mM, CaCl₂.2H₂O 15 mM e KCl 250 mM) gelada e incubadas no gelo por 10 minutos. As células foram centrifugadas e suspensas em 20 mL de TB gelado adicionado de 1,5 mL de DMSO. As células foram novamente incubadas em gelo por 10 minutos. Para armazenamento, 200 μ L de células foram alíquotados e congelados a -80°C.

3.2.3.2- Transformação

Células da linhagem de *E. coli* DH5 α competentes foram descongeladas em banho de gelo. Em um tubo de microcentrífuga foram adicionados 100 μ L das

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

3.2.4- Isolamento de DNA plasmidial a partir de bactéria em pequena escala – Miniprep

Células da linhagem de *E. coli* DH5α contendo os plasmídeos de interesse foram inoculadas em 3 mL de meio LB contendo 50 µg/mL de ampicilina, ou outro antibiótico na concentração recomendada, e incubadas a 37°C por aproximadamente 16 horas, sob agitação constante. A cultura foi centrifugada por 1 minuto a 12.000xg. As células foram suspensas em 200 µL de TE (Tris 10 mM pH 8,0 e EDTA 1 mM pH 8,0). Foram adicionados 200 µL de solução NaOH/SDS (NaOH 0,2 M e SDS 1%), incubando-se por 5 minutos a 37°C. Em seguida foram adicionados 150 µL de acetato de sódio 3 M pH 4,8 e o tubo foi invertido várias vezes. Após centrifugação por 6 minutos a 12.000xg, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. A seguir, foi adicionado isopropanol (3 vezes o volume da amostra). Após incubação de 5 minutos a 37°C, o tubo foi centrifugado por 10 minutos a 12.000xg. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado duas vezes com etanol 75%. Depois de seco, o DNA foi suspenso em 50 µL de TE pH 8,0.

3.2.5- Transformação de leveduras

Uma colônia da linhagem de levedura desejada foi inoculada em 5 mL de meio adequado e incubada a 30°C sob agitação por toda a noite. 1,5 mL da cultura foram centrifugados na velocidade máxima por 5 segundos. Após descarte do sobrenadante, as células foram lavadas com 1 mL de água estéril, suspensas em 1 mL de solução de acetato de lítio 100 mM e então incubadas por 5 minutos a 30°C.

As células foram coletadas por centrifugação e o sobrenadante foi removido. Foram adicionados, na seguinte ordem, 240 μL de PEG 50%, 36 μL de acetato de lítio 1 M, 25 μL de DNA de esperma de salmão, 5 μL de DNA plasmidial da preparação obtida no item 3.2.4, completando-se o volume de reação com 45 μL de água. O tubo foi então agitado vigorosamente (vortex) por 1 minuto e incubado a 42°C por 20 minutos. As células foram centrifugadas na velocidade máxima por 10 segundos. Após o sobrenadante ter sido removido, as células foram suspensas em 150 μL de água estéril e então plaqueadas em meio seletivo apropriado. As placas foram incubadas a 30°C até o aparecimento de colônias.

3.2.6- Preparo de DNA genômico de levedura

A linhagem de levedura de interesse foi crescida em 10 mL de YPD (extrato de levedura 10 g/L e peptona 20 g/L) até a saturação ($\text{D.O.}_{600\text{nm}} > 1$). A cultura foi centrifugada a 3.000xg por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante descartado e as células lavadas com 500 μL de água Milli-Q. As células foram suspensas em 200 μL de tampão de lise (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, Triton X100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM e EDTA 1 mM) e 200 μL de PCI (fenol/clorofórmio/álcool isoamílico), e foram adicionados aproximadamente 300 mg de pérolas de vidro. As células foram submetidas a agitação vigorosa por 3 a 4 minutos, adicionadas de 200 μL de TE pH 8,0 e novamente submetidas a agitação por mais 1 minuto. As células foram centrifugadas a 13.400xg por 5 minutos, e a fase aquosa foi transferida para um novo tubo. A extração com 200 μL de PCI foi repetida por 3 vezes. Os ácidos nucleicos foram então precipitados da fase aquosa com 1 mL de etanol absoluto gelado e submetidos à centrifugação a 13.400xg por 2 minutos a 4°C. O precipitado foi suspenso em 400 μL de TE pH 8,0, adicionado de 3 μL de RNase A (10 mg/ml) e incubado a 37°C por 30 minutos. A extração com PCI foi repetida mais uma vez e o DNA precipitado com 10 μL de acetato de amônio 4 M e 1 mL de etanol absoluto. O tubo foi centrifugado a 13.400xg por 2 minutos a 4°C e o precipitado lavado com 400 μL de etanol 75% gelado. O precipitado foi seco ao ar livre e suspenso em 50 μL de TE pH 8,0.

3.2.7- Sequenciamento de DNA

O sequenciamento foi realizado utilizando-se o kit “Big Dye Terminator” e o seqüenciador semi-automático ABI 377 (Applied Biosystems).

3.2.8- Produção em larga escala e purificação de proteína em fusão com GST

Uma colônia da linhagem de *E. coli* DH5 α transformada com o plasmídeo que permite a expressão do gene da proteína de fusão com GST foi inoculada e crescida em 100 mL de meio LB líquido, acrescido de ampicilina (100 μ g/mL), a 37°C durante uma noite sob agitação. Em seguida, a cultura foi diluída 1:10 em 1000 mL de meio de cultura fresco e crescida nas mesmas condições até atingir a D.O._{600nm}=0,6. Neste momento, a cultura foi induzida com IPTG e, após 3 horas de incubação, a cultura foi centrifugada a 4.000xg por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante foi desprezado. A seguir, as células foram lavadas em 250 mL de PBS 1X gelado e centrifugadas a 4.000xg por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e a lavagem repetida. As células foram armazenadas a -80°C. As células que produziram a proteína de fusão de interesse foram descongeladas em banho de gelo e suspensas em 10 mL de PBS 1X gelado contendo coquetel completo de inibidores de protease (Roche), PMSF 2 mM e DTT 1 mM. Posteriormente, as células foram submetidas à sonicação de 4 segundos de pulso e 9,9 segundos de repouso durante 4 minutos em uma amplitude de 60%. A seguir, adicionou-se 1mL de Triton X-100 e centrifugou-se a 20.000xg por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante contendo a proteína de fusão de interesse foi submetido ao processo de purificação por afinidade à resina de glutathiona-sepharose utilizando o sistema cromatográfico ÄKTA FPLC, de acordo com as recomendações do fabricante (G.E. Healthcare). Foi utilizado PBS 1X como tampão de lavagem e 100 mM Tris-HCl pH 8,0 contendo 10 mM de glutathiona reduzida como tampão de eluição. Alíquotas das frações obtidas foram analisadas por SDS-PAGE e coloração por Coomassie Blue. As frações obtidas da cromatografia anterior que continham a proteína de fusão foram reunidas e submetidas à diálise, realizada em membrana SpectraPor (Spectrum) com poro de

seleção de 12-14.000 Da contra tampão PBS 1X pH7,3 por uma noite a 4°C. O produto da diálise foi submetido a digestão com trombina (1 U/mg de proteína) por 3 horas a temperatura ambiente e novamente à mesma cromatografia de afinidade. As frações obtidas foram analisadas por SDS-PAGE e coloração por Coomassie Blue. Posteriormente, os eluatos obtidos foram quantificados pelo método de Bradford, utilizando o Kit “Bio Rad Protein Assay” da Bio Rad.

3.2.9- Produção em larga escala e purificação da proteína 6xHis-eIF5A recombinante de *S. cerevisiae*

Para produzir a proteína eIF5A em fusão com cauda de histidina, a região codificadora do gene *TIF51A* foi retirada do plasmídeo pSV36 com as enzimas *Bam*HI e *Pst*I e subclonada no vetor de expressão pQE30, gerando a construção plasmidial pSV727. Dessa maneira, uma colônia de *E. coli* M15 transformada com a construção plasmidial pSV727 foi crescida em 50mL de meio LB líquido com 100 µg/mL de ampicilina e 50 µg/mL de canamicina a 37°C por uma noite sob agitação. Em seguida, a cultura foi diluída para D.O._{600nm} = 0,1 em 2L de meio LB líquido com 100 µg/mL de ampicilina e 50 µg/mL de canamicina e crescida nas mesmas condições até D.O._{600nm} = 0,6. A expressão do gene que codifica a proteína de fusão foi induzida com 0,2 mM de IPTG a 25°C. Após 3 horas de crescimento, as células foram coletadas por centrifugação a 4.000xg por 20minutos a 4°C, lavadas com tampão PBS 1X e estocadas a -80°C. Para a purificação da proteína de interesse, as células foram descongeladas em gelo e lisadas em tampão de lise (50 mM NaH₂PO₄; 20 mM Imidazol; 300 mM NaCl; 2 mM DTT; 2 mM PMSF e coquetel de inibidores de proteases 1X - Roche). Para a lise, as células foram submetidas à sonicação em gelo com ciclos de 4,0 s de sonicação e 9,0 s de repouso, durante 4 minutos, numa amplitude de 60%. O lisado foi então centrifugado a 20.000xg por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante submetido aos passos cromatográficos de purificação. Todos os passos cromatográficos foram executados em cromatógrafo ÄKTA FPLC (G.E. Healthcare). O extrato bruto foi submetido a uma etapa cromatográfica de afinidade em coluna carregada de níquel NINTA (Qiagen) de 5 mL. Foi utilizado 50 mM NaH₂PO₄, 20 mM Imidazol e 300 mM NaCl como tampão de corrida e 50 mM NaH₂PO₄, 250 mM Imidazol e 300 mM NaCl como tampão de

eluição. Alíquotas das frações obtidas da cromatografia foram analisadas por SDS-PAGE e coloração por Coomassie Blue. As frações contendo a proteína de interesse purificada foram reunidas e submetidas à diálise em membrana SpectraPor (Spectrum) com poro de seleção de 12-14 kDa em 2 L de tampão 10 mM Tris-HCL pH 7,5 por uma noite a 4°C. A seguir, a amostra foi concentrada em concentrador de membrana vertical Centriplus (Amicon) até a concentração de desejada.

3.2.10- Ensaios de cristalização

A proteína recombinante purificada foi submetida a ensaios de cristalização utilizando os “kits fatoriais” Hampton Research (Crystal Screen I e II; PEG/Ion), Jena Bioscience (1 a 10) e Wizard (1 e 2). A cristalização se deu por difusão de vapor utilizando o sistema de “gota sentada”, nas diferentes condições permitidas pelos kits. Para cada condição foi utilizado 2 µL da amostra protéica concentrada e 2 µL da solução de análise. A partir da observação de indícios de cristalização da proteína em alguma condição do rastreamento, foram preparadas novas soluções para o refinamento das condições de cristalização com variações na temperatura, na concentração de proteína, no pH e/ou na concentração e natureza de precipitante ou aditivos.

3.2.11- Western blot

Amostras protéicas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) e transferidas para membrana de nitrocelulose utilizando tampão de transferência (24,8 mM Tris-HCl, 192 mM glicina) e tensão de 100 V por 60 minutos. A transferência foi avaliada por coloração com Ponceau-S. A membrana foi bloqueada a temperatura ambiente por 60 minutos em tampão PBST (PBS 1X, Tween-20 0.25%) contendo 5% de leite desnatado sob agitação. A membrana foi então incubada por 1 hora a temperatura ambiente com uma diluição adequada de soro imune em PBST contendo 5% de leite desnatado. Posteriormente, a membrana foi lavada 3 vezes por cinco minutos com PBST. A seguir, a membrana foi incubada por 45 minutos com anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (Sigma), em PBST contendo 5% de leite desnatado. Após três novas lavagens de cinco minutos com PBST, a membrana foi tratada com reagentes

quimioluminescentes (ECL) e exposta a filme de raios-X.

3.2.12- Ensaio de hipusinação *in vivo* da proteína recombinante helF5A

Uma colônia da linhagem de *E. coli* (BL21 pLys) transformada com a construção plasmidial pST39 helF5A DHS (pVZ1055) ou pST39 helF5A DHS DOHH (pVZ1011) foi crescida em 3 mL de meio LB líquido com 100 µg/mL de ampicilina e 25 µg/mL de cloranfenicol, a 37°C por uma noite sob agitação. Em seguida, a cultura foi diluída a D.O._{600nm} 0,1 em 5 mL de meio LB líquido contendo as mesmas concentrações de antibióticos e crescida nas mesmas condições até D.O._{600nm} 0,6. A expressão dos genes que codificam as proteínas recombinante foi induzida com 0,1 mM de IPTG. Foi acrescentado 5 uCi/mL de [³H]-espermidina no meio de cultura e as células foram crescidas a 37°C sob agitação. A cada hora de crescimento, 1 mL da cultura foi separado e as células foram coletadas por centrifugação a 4.000xg por 1 minuto a 4°C, lavadas com tampão PBS 1X e estocadas a -80°C. Alíquotas foram recolhidas com 1, 2, 4 e 6 horas de indução na presença de [³H]-espermidina.

Em seguida, 1 mL de ácido tricloroacético 10% contendo 1 mM de poliaminas (espermidina, espermina e putrescina) foi adicionado para a precipitação das proteínas. As amostras foram mantidas em gelo por 15 minutos e então submetidas a centrifugação a 14.000xg por 3 minutos a 4°C. Após remoção do TCA, o precipitado foi lavado três vezes com TCA 10% contendo 1mM de poliaminas. A radioatividade dos sobrenadantes obtidos na última etapa de lavagem foi então medida para avaliar a retirada do excesso de espermidina radioativa com as sucessivas lavagens.

Os precipitados foram então suspensos em 1 mL de TCA 10% acrescido de poliaminas, 100µL dessa suspensão foram separados, misturados à 5 µL de BSA (50 mg/mL) e mantidos em gelo por 15 minutos. Em seguida, a suspensão foi centrifugada por 1 minuto a 14.000xg, a 4°C. O sobrenadante foi descartado, o precipitado foi suspenso em 100 µL de NaOH 0.1 N e a radioatividade foi medida utilizando o cintilador LS6000IC (Beckman).

Para a análise de aminoácido por troca iônica, o precipitado referente a 300 µL de suspensão em TCA 10% foi então hidrolisados em 400 µL de 6 N HCl por 18 horas a 110°C. As amostras foram liofilizadas a vácuo sob aquecimento por 2 horas

para a retirada do HCl e suspensas em 100 µL de água. 50 µL do hidrolisado ácido contendo os aminoácidos desoxihipusina e/ou hipusina marcados radioativamente foram então separados por cromatografia líquida de troca-iônica no analisador de aminoácidos modelo D-400 (Durrum), e a radioatividade de cada fração foi medida utilizando o cintilador LS6000IC (Beckman).

3.2.13- Cromatografia de troca iônica para purificação de hclF5A-Hpu

Uma colônia de *E. coli* (BL21 pLys) transformada com a construção plasmidial pST39 hclF5A DHS DOHH (pVZ1011), e crescida em 200 mL de meio LB líquido contendo 100 µg/mL de ampicilina e 50 µg/mL de cloranfenicol, a 37°C por uma noite sob agitação. Em seguida, a cultura foi diluída a D.O._{600nm} 0,1 em 6 L de meio LB líquido contendo as mesmas concentrações de antibióticos e crescida nas mesmas condições até D.O._{600nm} 0,6. Nesse momento, a expressão dos genes que codificam as proteínas recombinantes foi induzida com 0,1mM de IPTG e as células foram crescidas a 37°C sob agitação. Após 4 horas de crescimento, as células foram coletadas por centrifugação a 4.000xg por 20 minutos a 4°C, lavadas com tampão PBS 1X e estocadas a -80°C. As células foram então descongeladas em gelo e lisadas em 100 mL de tampão A (50 mM de TrisAc pH 7,0, 0,1 mM de EDTA, 1 mM de DTT, 1 mM de PMSF e 1X inibidor de protease - Roche). Para a lise, as células foram submetidas à sonicação em gelo com ciclos de 4,0s de sonicação e 9,0s de repouso, durante 4 minutos, numa amplitude de 60%. O lisado foi então centrifugado a 20.000xg por 30 minutos a 4°C, e 0,8 µg de hclF5A-[³H]Hpu, o que corresponde à aproximadamente 1000,000 dpm, foi adicionado para servir de marcador durante os passos cromatográficos.

Inicialmente, o extrato bruto foi submetido à etapa cromatográfica de troca iônica em coluna aniônica DEAE-Sephacel de 70 mL, 2,6 cm x 14 cm (G.E. Healthcare). Foi utilizado tampão A para lavagem e gradiente de concentração de KCl (0,1 M, 0,2 M, 0,3 M, 0,4 M e 0,5 M), com 50 mL de cada concentração, para a eluição. Alíquotas das frações obtidas da cromatografia foram analisadas por SDS-PAGE seguido de coloração por Coomassie Blue. As frações contendo a proteína de interesse purificada foram reunidas, submetidas à diálise contra 2 L de tampão A por uma noite a 4°C, utilizando membrana SpectraPor (Spectrum) com poro de seleção

de 12-14 kDa. Após concentração da amostra em concentrador de membrana vertical Centriplus (Amicon), esta foi submetida à nova cromatografia de troca iônica, dessa vez utilizando a coluna catiônica SP-Sepharose de 20 mL, 1,3 cm x 13 cm (G.E. Healthcare). Tampão A foi novamente utilizado para lavagem e a eluição foi feita com diferentes concentrações de KCl (0,1 M, 0,15 M, 0,2 M, 0,25 M, 0,3 M, 0,35 M, 0,4 M e 0,5 M) com 25 mL de cada concentração. Novamente, as alíquotas das frações obtidas da cromatografia foram analisadas por SDS-PAGE seguido de coloração por Coomassie Blue e as frações que continham a proteína de interesse foram reunidas, submetidas a nova diálise contra tampão A para a retirada do KCl e, da mesma forma como foram feitas as duas últimas cromatografias, nova cromatografia foi realizada, desta vez utilizando a coluna aniônica Q-sepharose de 10 mL (G.E. Healthcare). Para eluição foi utilizado diferentes concentrações de KCl (0,1 M, 0,15 M, 0,2 M, 0,25 M, 0,3 M, 0,35 M, 0,4 M e 0,5 M) com 15 mL de cada concentração. Após análise por SDS-PAGE seguido de coloração por Coomassie Blue, as alíquotas que continham hElF5A-Hpu foram reunidas, dialisadas contra tampão Tris-HCl 20mM pH 7,5 e concentradas utilizando as mesmas técnicas já descritas.

3.2.14. Expressão e purificação de proteínas em fusão com 6xHis “tag” a partir de levedura

Inicialmente, as linhagens de *S. cerevisiae*, contendo as construções plasmidiais para expressão dos genes que codificam eIF5A e eIF5A^{K51R} em fusão com 6xHis “tag” (pVZ975 e pVZ976), foram incubadas em 50mL de meio SC-Ura, acrescido de glicose 2%, a 30°C por 24 horas. As culturas foram diluídas em 2L de meio SC-Ura contendo 2% de rafinose para obtenção da D.O._{600nm}=0,016 e, em seguida, incubadas a 30°C. O crescimento foi acompanhado até que atingisse D.O._{600nm}=0,4-0,5 e a produção de 6xHis-eIF5A ou 6xHis-eIF5A^{K51R} foi então induzida pela adição de galactose na concentração final de 2%. As culturas foram incubadas a 30°C por 15 horas e, em seguida, foram centrifugadas, os sobrenadantes removidos e as células congeladas.

As células foram descongeladas em gelo e lisadas em tampão de lise (50 mM NaH₂PO₄; 20 mM imidazol; 300 mM NaCl; 2 mM DTT; 2 mM PMSF e coquetel de

inibidores de proteases 1X - Roche). Para a lise, as células foram submetidas a sonicação em gelo com ciclos de 4,0 s de sonicação e 9,0 s de repouso, durante 4 minutos, numa amplitude de 80%. O lisado foi então centrifugado a 20.000xg por 15 min a 4°C e o sobrenadante submetido aos passos cromatográficos de purificação. Todos os passos cromatográficos foram executados em cromatógrafo ÄKTA FPLC (G.E. Healthcare).

O extrato bruto foi submetido a uma etapa cromatográfica de afinidade em coluna NINTA (Qiagen) de 5 mL. Foi utilizado 50 mM NaH₂PO₄, 20 mM imidazol e 300 mM NaCl como tampão de corrida e 50 mM NaH₂PO₄, 250 mM imidazol e 300 mM NaCl como tampão de eluição. Alíquotas das frações obtidas foram analisadas por SDS-PAGE e coloração por Coomassie Blue.

As frações obtidas da cromatografia que continham a proteína de fusão foram reunidas e submetidas a diálise, realizada em membrana SpectraPor (Spectrum) com poro de seleção de 12-14.000 Da contra tampão 100 mM Tris-HCl pH 7,5 e 100 mM NaCl por uma noite a 4°C. A seguir, a amostra foi concentrada em concentrador de membrana vertical Centriplus (Amicon) até a concentração de 2 mg/mL.

3.2.15- Cromatografia de exclusão molecular

A proteína 6xHis-eIF5A recombinante de *S. cerevisiae* foi inicialmente produzidas em *E. coli*, purificada por afinidade em coluna carregada com níquel e dialisadas em 20 mM de tampão Tris-HCl pH 7,5 de acordo com protocolo apresentado em 3.2.9. Em seguida, a proteína pura em três concentrações (10 mg/mL, 2 mg/mL e 0,5 mg/mL) foi submetida a cromatografia de exclusão molecular utilizando tampão Tris-HCl 20 mM pH7,5, coluna Superdex 75 de 25 mL e o aparelho AKTA FPLC (G.E. Healthcare). O volume da amostras foi de 0,25 mL, com fluxo de 0,5 mL/min. O espectro cromatográfico obtido com a proteína em estudo foi comparado com o espectro obtido com os dois padrões de massa molecular: quimiotripsinogênio A (25kDa), ovoalbumina (43kDa) e com o volume de eluição do Blue Dextran. Os resultados foram avaliados por SDS-PAGE seguido de coloração por Coomassie Blue.

Para a análise das proteínas recombinantes 6xHis-eIF5A e 6xHis-eIF5A^{K51R}, purificadas diretamente de *S. cerevisiae*, foi utilizada a coluna Superdex 200 de 90 mL, tampão 100 mM Tris-HCl pH 7,5 contendo 100 mM de NaCl e aparelho ÄKTA

FPLC (G.E. Healthcare). O volume das amostras foi de 1 mL, com fluxo de 0,5 mL/min. Os espectros cromatográficos obtidos com as proteínas em estudo foram comparados com o espectro obtido com os quatro padrões de massa molecular: ribonuclease A (13,4 kDa), quimiotripsinogênio A (25 kDa), ovoalbumina (43 kDa), albumina (67 kDa) e com o volume de eluição do Blue Dextran. As frações cromatográficas foram avaliadas por SDS-PAGE seguido de western blot.

3.2.16- Espalhamento de raios-X em baixo ângulo (SAXS – “Small-angle X-ray scattering”)

A proteína 6xHis-eIF5A recombinante de *S. cerevisiae* foi produzida em levedura e purificada por cromatografia de afinidade em coluna de níquel como descrito em 3.2.14. Amostra de 1 mg/mL da proteína pura em tampão contendo Tris-HCl 25 mM, pH 7.8 e NaCl 20 mM foi centrifugada por 10 minutos a 13000xg (4°C) e submetida ao ensaio de espalhamento de raios-x em baixo ângulo. Os experimentos de SAXS foram realizados na linha de luz D011A no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas), pelo Dr. Wanius Garcia, responsável pela coleta, análise e interpretação dos dados. Os dados foram coletados utilizando o detector MAR CCD 165 (MAR Research) e dez minutos de tempo de exposição para cada medida. O comprimento de onda utilizado foi de 1,488 Å. A distância entre a amostra e detector (1031.5 mm) foi ajustada para detectar a intensidade de espalhamento (q) entre 0.01 e 0.25 Å⁻¹. As medidas foram realizadas em temperatura ambiente. O tratamento dos dados foi realizado utilizando o programa FIT2D. Os dados de intensidade foram reduzidos a $I(q)$ versus q através de procedimentos padrões para corrigir a intensidade do feixe incidente, absorção da amostra e subtração do branco. O raio de giro (R_g) foi calculado utilizando a curva gerada com o programa GNOM, o qual também fornece a função de distância de distribuição $P(r)$ e a dimensão máxima das partículas espalhadas, definido como o ponto em que $P(r)$ torna-se zero.

3.2.17- Ensaio de crosslinking

A proteína 6xHis-eIF5A recombinante de *S. cerevisiae* foi produzida em bactéria, purificada por cromatografia de afinidade em coluna de níquel como

descrito em 3.2.9, e submetida ao ensaio de crosslinking utilizando o reagente dissuccinato de etileno glicol (EGS). Esse composto promove interações covalentes na região de oligomerização das proteínas, através da ligação entre o grupo N-hidroxisuccinimida (NHS) com aminas presentes nas proteínas (aminoácido lisina e, em menor proporção, NH₂ localizado no terminal de cadeias peptídicas). Essa reação ocorre em pH de 6.5 a 8,5 e é interrompida em pH maior. EGS é o único reagente homobifuncional que reage com SH via piridilditiol formando ponte dissulfeto, reação que pode ser revertida em condições reduzidas pela presença de DTT.

Foi utilizada uma solução 10 µM da proteína 6xHis-eIF5A em tampão contendo HEPES 20 mM e NaCl 20mM pH 8,0. A reação foi iniciada com a adição de 1 mM de EGS e continuada por 20 minutos a temperatura ambiente e, em seguida, foi interrompida com a adição de 100mM Tris-HCl, pH 9.0. O resultado foi avaliado por SDS-PAGE seguido de coloração por Coomassie Blue.

3.2.18- Ensaio de copurificação

Inicialmente, as construções plasmidiais que permitem a expressão de GST sozinho ou em fusão com a proteína a ser analisada foram introduzidas individualmente na levedura de interesse. O vetor de expressão utilizado (pYEX-4T) possui regulação de expressão por galactose, marca auxotrófica *URA3* e origem de replicação 2 µ. A seguir, as linhagens transformadas foram crescidas em meio sólido seletivo contendo glicose 2%. Então, pré-cultura destas leveduras foi feita em meio líquido seletivo contendo glicose 2%, a 30°C durante a noite. As culturas foram diluídas para D.O._{600nm}=0,016 em 500 mL de meio líquido seletivo contendo rafinose 2% e incubadas a 30°C até atingir D.O._{600nm}= 0,4-0,5. A indução da produção da proteína de fusão foi feita pela adição de 50 mL de galactose a 20%, por 3 horas. As células foram então centrifugadas a 2.500xg, por 7 minutos, a 4°C, lavadas duas vezes com PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10,1 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, pH 7,4) gelado, pesadas e congeladas a -80°C. Após o descongelamento em gelo, as células foram suspensas em tampão de lise (Acetato de Potássio – 100 mM, Acetato de magnésio – 2 mM, Tampão HEPES – 30 mM, PMSF - 1,0 mM, β-ME -7 mM) adicionado de inibidores de protease, em volume igual ao peso das células em gramas. Foram adicionadas contas de vidro na proporção de 10 g para cada 2 g de

células. Os tubos foram então agitados vigorosamente (vortex) cinco vezes, por 1 minuto, com intervalos de incubação em gelo de 1 minuto. Então foi feita centrifugação do lisado a 23.300xg, por 20 minutos a 4°C, com a recuperação do sobrenadante.

A seguir, a concentração protéica foi determinada pelo método Bradford (kit Bio-Rad). As proteínas de fusão foram purificadas por afinidade com Glutathione-Sepharose (G.E. Healthcare), segundo as recomendações do fabricante, a partir de um volume de lisado correspondente a 5 mg de proteínas totais. No final, a resina contendo as proteínas purificadas e copurificadas foram suspensas em 100 µL de tampão de carregamento 2X. As proteínas foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. A copurificação foi analisada por western blot utilizando anticorpos policlonais específicos para as proteínas a serem analisadas e anti-GST.

3.2.19- Produção de anticorpo policlonal em coelho

Os eluatos obtidos no processo de purificação da proteína a ser utilizada como imunógeno foram utilizados na imunização de coelhos, utilizando o seguinte esquema:

Primeira inoculação: Um volume de eluato contendo 300 µg de proteína foi homogeneizado com o mesmo volume de adjuvante completo de Freund. O antígeno foi vigorosamente agitado em vortex e na seringa para produção de emulsão. A emulsão foi então inoculada na região dorsal por via intradérmica, em quatro diferentes locais.

Segunda inoculação: Um volume de eluato contendo 300 µg de proteína foi homogeneizado com o mesmo volume de adjuvante incompleto de Freund. O antígeno foi vigorosamente agitado em vortex e na seringa para produção de emulsão. O material foi inoculado na região dorsal por via subcutânea, em diferentes locais. Esta inoculação foi realizada 21 dias após a primeira inoculação.

Primeira sangria: A primeira sangria foi realizada 11 dias após a segunda inoculação.

Terceira Inoculação: Esta inoculação foi realizada essencialmente como a segunda, 10 dias após a primeira sangria.

Segunda sangria: A segunda sangria foi realizada 11 dias após a terceira

inoculação.

Quarta Inoculação: Esta inoculação foi realizada essencialmente como a segunda, 10 dias após a segunda sangria.

Terceira sangria: A terceira sangria foi realizada 11 dias após a quarta inoculação.

Após cada sangria, os soros foram obtidos e cada um foi testado por western blot contra extrato total de levedura em diferentes diluições.

3.2.20- PCR mutagênica

As reações de PCR foram realizadas utilizando como DNA molde o plasmídeo contendo o gene a ser mutagenizado na concentração de 20 ng/ μ L e os oligonucleotídeos específicos na concentração de 1 μ M cada. As condições de reação foram: 1 μ g de DNA molde; 1x tampão de reação (concentrações finais: Tris-HCl 100 mM, pH 8,3, KCl 500 mM, BSA 0,1%); dCTP e dTTP 1 mM; dATP e dGTP 200 μ M; 2,5 U de Taq polimerase (New England Biolabs). Foi Adicionada à reação a concentração adequada de $MgCl_2$ (de 1,5 mM a 7 mM) e $MnCl_2$ (de 0,05 mM a 2 mM) e as reações de 50 μ L e foram submetidas a 30 ciclos de 1 minuto 94°C, 1 minuto 55°C e 2 minutos 72°C.

Em seguida, a transformação da levedura nocauteada contendo o alelo selvagem em plasmídeo *URA3/CEN* (SVL132) foi realizada com 0,3-0,5 μ g da reação de PCR mutagênica, juntamente com 0,06-0,1 μ g do plasmídeo pSV501, necessário para recombinação com o produto de PCR, na proporção 5:1 (fragmento:plasmídeo). O plasmídeo pSV501 possui o gene selvagem em vetor com marca diferente de *URA3* e é digerido previamente à transformação de levedura, mantendo extremidades homólogas com o produto de PCR mutagênica, para promover recombinação homóloga. As células transformadas foram plaqueadas em meio apropriado para seleção do plasmídeo restaurado pela recombinação. O “plasmid shuffle” (troca do plasmídeo) foi realizado em meio contendo 5-FOA para eliminação do plasmídeo *URA3/CEN*, contendo o alelo selvagem de *TIF51A*, e a sensibilidade a temperatura dos transformantes obtidos foi testada. Finalmente, as mutações presentes no gene em estudo foram identificadas por seqüenciamento.

3.2.21- Mutação Sítio-dirigida

Para as reações de mutagênese foi utilizado como molde um plasmídeo contendo o gene *TIF51A* selvagem, seguindo o protocolo sugerido no kit “QuickChange” (Stratagene), como descrito abaixo:

Realizar a reação de PCR utilizando como DNA molde o plasmídeo contendo o gene a ser mutagenizado na concentração de 5-50 ng/μL e os oligonucleotídeos específicos na quantidade de 125ng cada. Utilizar as seguintes condições: 1 μg de DNA molde; 1x tampão de reação (KCl 10 mM, (NH₄)₂SO₄ 10 mM; Tris-HCl 20 mM pH 8,8; MgSO₄ 2 mM; Triton X-100 0,1%; BSA (0,1 mg/ml); 1 μL de “dNTPs mix”. Completar o volume para 50 μL com água e submeter a reação a 16 ciclos de 30 segundos a 95°C, 1 minuto 55°C e 5 minutos a 68°C. Adicionar 1 μL de *Dpn* I (10 U/μL) diretamente em cada amplificação obtida pela PCR mutagênica. Gentilmente, misturar a reação pipetando algumas vezes, centrifugar por 1 minuto e imediatamente incubar a 37°C por 1 hora.

Descongelar as bactérias supercompetentes XL1-Blue (kit “QuickChange” – Stratagene) em gelo e alíquotas 50 μL em tubo de centrifuga, previamente esfriado. Transferir 1 μL do produto de PCR tratado com *Dpn* I para as bactérias e incubar em gelo por 30 minutos. Realizar o choque térmico das células por 45 segundos a 42°C e colocar as reações em gelo por 2 minutos. Adicionar 500 μL de meio NZY (10 g/L de NZ amina; 5 g/L de extrato de levedura; 5 g/L NaCl; 12,5 mL MgCl₂ 1 M; 12,5 mL MgSO₄ 1 M; 10 mL/L de glicose 2 M) pré-aquecido e incubar por 1 hora a 37°C sob agitação. Plaquear 175 μL em meio contendo antibiótico apropriado para a seleção do plasmídeo.

3.2.22- Ensaio de complementação fenotípica de levedura

A levedura nocaute de *TIF51A* (*tif51AΔ*), mantida com um plasmídeo *URA3/CEN* contendo *TIF51A* selvagem, foi transformada com plasmídeo *LEU2/CEN* ou *TRP1/CEN* contendo o novo alelo mutado de *TIF51A* e crescida em meio seletivo SC-leu-ura ou SC-trp-ura, respectivamente, na temperatura de 25°C. Em paralelo, a levedura também foi transformada com o vetor *LEU2/CEN* ou *TRP1/CEN* vazio ou a construção contendo o alelo selvagem em vetor *LEU2/CEN* ou *TRP1/CEN*, como

controles. Em seguida, os transformantes foram crescidos a 25°C em meio contendo 5-FOA para substituição do plasmídeo *URA3/CEN/TIF51A* pelos plasmídeos contendo o novo alelo mutado de *TIF51A*. O crescimento neste meio indicou complementação do alelo nocauteado.

3.2.23- Análise do fenótipo de sensibilidade a temperatura

As leveduras a serem analisadas foram crescidas a 25°C em 10 mL de meio seletivo até aproximadamente $1-2 \times 10^7$ células/mL. Após centrifugação a 3.000xg por 1 minuto e remoção do meio de cultura, as células foram suspensas na concentração de $2,5 \times 10^8$ células/mL. 200 µL da suspensão foram transferidos para um poço de microplaca. A suspensão foi diluída seriadamente (1:10) em meio líquido apropriado. Utilizando um pipetador multicanal, 4 µL da suspensão original e das diluições foram aplicados nos meios de cultura de interesse. A seguir, as placas foram incubadas nas temperaturas desejadas até a observação de crescimento em todas as diluições da levedura contendo o gene selvagem.

3.2.24- Ensaio de estabilidade de proteína

Inóculos das leveduras desejadas foram feitos em 5 mL de meio SC-leu ou SC-trp e crescidos a 25°C por 12-16 horas. As culturas foram normalizadas para D.O._{600nm}=0,2 em 50 mL e incubadas na temperatura permissiva por 4 horas. A seguir, a cultura foi dividida em volumes iguais e os frascos incubados nas temperaturas permissiva e não permissiva. As células foram coletadas por centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e as células foram lisadas em 250 µL de tampão (Tris HCl pH 7,5 20 mM; DTT 2 mM; PMSF 2 mM; coquetel de inibidor de protease; EDTA 2 mM e água q.s.p.). A concentração de proteína total foi medida pelo método de Bradford e 10 µg foram submetidos a ensaio de “western blot”.

3.2.25- Ensaio de “pulse-chase”

As linhagens de interesse foram diluídas em meio YPD e foram crescidas a 25°C até atingir D.O._{600nm} de 0,5. As células foram recolhidas por centrifugação a

3000xg por 4min, suspensas em 600 µL de meio de cultura sem metionina contendo 200 µCi de [³⁵S]metionina e incubadas a 25°C por 15 min. Em seguida, as células foram recolhidas, suspensas em meio de cultura contendo metionina não marcada (0,2 mg/mL) e ciclo-heximida (0,5 mg/mL), e incubadas a 25°C e 36°C. Nos tempos marcados, 100 µL de cultura foram misturados com 100 µL de ácido tricloroacético 10% (TCA) e incubados no gelo por 15min. As células foram lavadas com TCA 5% e lisadas em TCA 5%, utilizando contas de vidro e agitação vigorosa. Após centrifugação a 12000xg por 5min, o precipitado foi lavado com acetona, seco e suspenso em 10mM de tampão Tris-HCl pH8,0, contendo 1% de SDS. A incorporação de metionina radioativa foi determinada em cintilador e as amostras foram normalizadas. Uma porção do extrato de levedura correspondente a 1 000 000 c.p.m. foi diluída em 200 µL de tampão de imunoprecipitação (50 mM Hepes, pH7,5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0,5 mg/mL BSA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) contendo 5 µL de anti-eIF5A e incubada a 4°C por 2 h. As suspensões foram centrifugadas a 12000xg por 10 minutos e cada sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo 50 µL de proteína A – sepharose 50% em tampão de imunoprecipitação. Depois de incubadas por 1 h a 4°C, a proteína A – sepharose foi recolhida por centrifugação e lavada 3 vezes com o mesmo tampão. A análise foi feita por SDS-PAGE, seguida de exposição a filme radiográfico.

3.2.26- Dicroísmo circular

As proteínas eIF5A recombinante de *S. cerevisiae*, selvagem ou mutadas, purificadas por afinidade em resina de níquel, foram submetidas a ensaios de dicroísmo circular no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, com a colaboração do Dr. Francisco Javier Medrano Martin ou no Instituto de Física de São Carlos, sob a supervisão do Dr. Wanius Garcia, responsáveis pela coleta e análise dos dados. Os experimentos de dicroísmo circular foram realizados no espectropolarímetro Jasco J-715 equipado com controle de temperatura. Os espectros de dicroísmo circular na região do UV distante (190 - 250 nm) foram obtidos utilizando-se uma cubeta de quartzo de 0,1 cm de caminho ótico, a uma concentração de 0,2 mg/mL de proteína em tampão 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM NaCl. Todos os espectros de dicroísmo circular foram corrigidos pela contribuição do tampão utilizado e as elipticidades observadas foram transformadas em elipticidade molar por resíduo [θ].

3.2.27- Ensaio de hipusinação *in vivo*

Com a finalidade de analisar se os mutantes termosensíveis e estáveis de eIF5A, servem como substrato para Dys1 nas temperaturas permissiva e não permissiva de crescimento, as leveduras SVL599, SVL634 e SVL530, contendo um dos alelos mutados ou o gene selvagem, foram inoculadas e crescidas em 10 mL de YPD a 25°C durante uma noite sob agitação. Em seguida, as culturas foram diluídas para a D.O._{600nm}=0,1 em 20 mL de meio de cultura fresco e foram monitoradas até o crescimento atingir D.O._{600nm}=0,5. Nesse momento, 10 mCi/mL de ³H-espermidina foram imediatamente adicionados e o volume de cada cultura foi dividido em dois (10 mL cada), sendo um conjunto incubado a 25°C e outro a 38°C por mais quatro horas.

Decorrido o tempo da mudança para a temperatura não-permissiva, as células foram centrifugadas a 3.000xg por 10 minutos a 4°C e então congeladas a -80°C. As células foram descongeladas em gelo. Em seguida, foi realizada a lise celular em 200 µL de tampão de lise (Tris HCl 20 mM pH7,5, DTT 1 mM e coquetel completo de inibidor de proteases 1X). 1mL de ácido tricloroacético 10% (TCA) contendo 1mM de poliaminas (espermidina, espermina e putrescina) foi adicionado para a precipitação das proteínas. As amostras foram mantidas em gelo por 15 minutos e então submetidas a centrifugação a 14.000xg por 3 minutos a 4°C. Após remoção do TCA, o precipitado foi lavado três vezes com TCA 10% contendo 1 mM de poliaminas. A radioatividade dos sobrenadantes obtidos na última etapa de lavagem foi então medida para avaliar a retirada do excesso de espermidina radioativa com as sucessivas lavagens. Os precipitados foram então hidrolisados em 400 µL de 6N HCl por 18 horas a 110°C. As amostras foram liofilizadas a vácuo sob aquecimento por 2 horas para a retirada do HCl e suspensas em 100 µL de água. 50 µL do hidrolisado ácido foram então separados por cromatografia de troca-iônica e a radioatividade foi medida em cintilador.

No caso do ensaio de hipusinação com os mutantes inviáveis, a linhagem SVL731 foi transformada individualmente com os plasmídeos pSV146, pSV39, pSV771, pSV733, pSV785, pSV732, pSV775, pSV731, pSV786 ou pSV787, e o mesmo protocolo foi seguido. Depois da precipitação com ácido tricloroacético 10% contendo 1 mM de poliaminas (espermidina, espermina e putrescina), os

precipitados foram suspensos em 0,2 M de NaCl. Alíquotas foram analisadas por SDS-PAGE, o gel foi submetido a fluorografia, seco e exposto ao filme radiográfico.

3.2.28- Ensaio de síntese protéica

As linhagens de interesse foram crescidas até a fase logarítmica ($D.O_{600nm}$ 0,5) a 30°C em 10 mL de meio YPD líquido. Um volume correspondente a 20 μ Ci de [3H]leucina foi adicionado no meio, as células foram incubadas a 30°C por 1 hora com agitação e, a seguir, alíquotas de 1,5 mL foram recolhidas, centrifugadas a 4°C e congeladas a -80°C. Em seguida, as culturas foram transferidas para 38°C por 4 horas. Alíquotas de 1,5 mL foram recolhidas após 1, 2, 3 e 4 horas, centrifugadas a 4°C e congeladas a -80°C. Todas as amostras foram suspensas em 50 μ L de ácido tricloroacético 15% (TCA) e incubadas no gelo por 15 min. As amostras foram aquecidas a 100°C por 15 minutos e incubadas em gelo por 10 min. O precipitado foi recolhido por centrifugação (15000xg, 4°C, 10 minutos) e lavado duas vezes com TCA 10% para remover toda a leucina radioativa. Depois de lavado, o precipitado foi suspenso em 100 μ L de NaOH 0,2 M, e 50 μ L foram utilizados para determinar a radioatividade incorporada no extrato protéico em cintilador. A concentração total de proteína foi determinada por Bradford, utilizando 5 μ L das amostras.

3.2.29- Localização subcelular de proteína

Inicialmente, a linhagem de *S. cerevisiae* (SVL55) contendo individualmente as construções plasmidiais para expressão do gene de eIF5A selvagem e mutantes em fusão com GFP (pSV137, pVZ973 e pVZ974), foi incubada em 3mL de meio SC-Ura, acrescido de glicose 2%, a 30°C por 24 horas. A cultura foi diluída em 20 mL de meio SC-Ura contendo 2% de rafinose para obtenção da $D.O_{600nm}=0,016$ e, em seguida, incubada a 30°C. O crescimento foi acompanhado até que atingisse $D.O_{600nm}=0,4-0,5$ e nesse momento a expressão do gene da proteína de fusão com GFP foi induzida pela adição de galactose na concentração final de 2%. A cultura foi incubada a 30°C por 1 hora, glicose na concentração final de 2% foi acrescentada e o volume foi dividido em duas alíquotas de 10 mL, sendo que uma foi mantida a 30°C e a outra foi colocada a 38°C. Após 3 horas, as alíquotas foram centrifugadas e

os sobrenadantes removidos. As células produzindo as proteínas de fusão com GFP foram visualizadas em microscópio de fluorescência após fixação com formaldeído 3,7% por 30 minutos e coloração do núcleo com DAPI (0,5 µg/mL).

3.2.30- Perfil polissomal

3.2.30.1- Preparo do gradiente de sacarose

Os gradientes de sacarose foram preparados adicionando-se, subsequentemente, em tubo de polialômero (14x89 mm/13,2 mL - Beckman) 2,1 mL de soluções de sacarose 10%, 20%, 30%, 40% e 50% em tampão adequado (Tris - HCl 20 mM pH 7,5; CH₃COOK 50 mM; MgCl₂ 10 mM; ditioneitol (DTT) 1 mM; ciclo-heximida (CHX) 100 µg/mL e heparina 0,2 mg/mL), partindo-se da menor concentração e, em sentido crescente de concentração, utilizando-se uma seringa de 3 mL e agulha de extremidade não-perfurante de 15 cm. Em seguida, os gradientes foram incubados a 4°C durante a noite para permitir o equilíbrio entre as fases.

3.2.30.2- Preparo do extrato e centrifugação dos gradientes

Cada linhagem de interesse foi crescida em 100 mL de meio YPD até D.O._{600nm}=0,4-0,6 a 25°C e, em seguida, as culturas foram transferidas para um banho com agitação a 38°C por 3 horas. A maquinaria de tradução foi bloqueada adicionando-se ciclo-heximida para uma concentração final de 100 µg/mL de meio e as culturas foram incubadas a 38°C por 5 minutos. As culturas foram centrifugadas a 3.500xg, por 5 minutos a 4°C. Em seguida, as células foram lavadas, suspensas em 2,5 mL de tampão de lise (Tris-HCl 20 mM pH 7,5; KCl 50 mM; MgCl₂ 10 mM; DTT 1 mM; ciclo-heximida 100 µg/mL), transferidas para tubo cônico de 15 mL e centrifugadas a 3.500xg, por 5 minutos a 4°C. Para realizar a lise, o precipitado de células foi suspenso em 350 µL de tampão de lise adicionado de inibidores de protease ("EDTA-free, Complete Protease Inhibitors Cocktail" - Roche) e inibidor de RNase (1 µL/mL de "RNasin" - Promega). O lisado foi transferido para um microtubo de 1,5 mL, adicionado de 1 g de pérolas de vidro e as células foram quebradas em vórtex. Com uma agulha, o fundo do microtubo foi furado, encaixado em novo microtubo de 1,5 mL; ambos foram colocados em um tubo cônico de 15 mL e centrifugados momentaneamente a 3.000xg para transferir o lisado para o novo

microtubo. Em seguida, o lisado transferido foi centrifugado a 14.000xg por 15 minutos a 4°C, para clarificá-lo. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL e a D.O._{260nm} da amostra foi determinada.

3.2.30.3- Fracionamento dos gradientes e coleta das frações.

O volume de amostra equivalente a 25 D.O._{260nm} foi aplicado sobre o gradiente de sacarose do item 3.2.29.1e centrifugado a 39.000 rpm por 3 horas a 4°C em rotor SW41Ti, utilizando ultracentrífuga Beckman.

Para fracionamento e coleta dos gradientes de sacarose contendo o extrato de levedura separado por densidade, foi utilizado um sistema “Econo Gradient Pump Kit” (Bio-Rad Laboratories), utilizando um fluxo contínuo de 1 mL/min de solução de sacarose 60% para empurrar a amostra do gradiente. A análise das amostras levou em conta a leitura de absorbância a 254 nm, que deu origem aos traçados do perfil polissomal.

Tabela 1. Linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas neste estudo

Linhagem	Descrição	Referência
SVL55	<i>MAT α leu2 ura3 trp1</i> (Fy23)	Dra. Pamela Silver
SVL132	<i>MAT α trp1 ura3 leu2 his3 tif51AΔHIS3</i> [pSV138]	(Valentini <i>et al.</i> , 2002)
SVL248	<i>MAT α ade2-1 his3-11 15 leu2-3 112 trp1-1 ura3-1 can1-100 ssd1-d tif51A(ts1159)</i>	(Zanelli <i>et al.</i> , 2005)
SVL323	<i>MAT α ura3 trp1 leu2 his3 tif51AΔHIS3</i> [pSV139]	(Valentini <i>et al.</i> , 2002)
SVL512	<i>MAT α trp1 ura3 leu2 his3 tif51AΔHIS3</i> [pSV501]	este trabalho
SVL518	<i>MAT α leu2-3 ade2 ade3 ura3 trp1 his3 tif51A(C39Y/G118D/S140F)</i> [pSV99]	(Frigieri <i>et al.</i> , 2007)
SVL519	<i>MAT α leu2-3 ade2 ade3 ura3 trp1 his3 tif51A(C39Y/T66I/G118D)</i> [pSV99]	(Frigieri <i>et al.</i> , 2007)
SVL520	<i>MAT α leu2-3 ade2 ade3 ura3 trp1 his3 tif51A(C39Y/P116L/G118D)</i> [pSV99]	(Frigieri <i>et al.</i> , 2007)
SVL521	<i>MAT α leu2-3 ade2 ade3 ura3 trp1 his3 tif51A(C39Y/G50D/G118D)</i> [pSV99]	(Frigieri <i>et al.</i> , 2007)
SVL522	<i>MAT α leu2-3 ade2 ade3 ura3 trp1 his3 tif51A(C39Y/G53D/G118D)</i> [pSV99]	(Frigieri <i>et al.</i> , 2007)
SVL523	<i>MAT α leu2-3 ade2 ade3 ura3 trp1 his3 tif51A(C39Y/G118D/M142I)</i> [pSV99]	(Frigieri <i>et al.</i> , 2007)
SVL524	<i>MAT α leu2-3 ade2 ade3 ura3 trp1 his3 tif51A::HIS3</i> [pSV622]	este trabalho
SVL525	<i>MAT α leu2-3 ade2 ade3 ura3 trp1 his3 tif51A::HIS3</i> [pSV623]	este trabalho
SVL526	<i>MAT α leu2-3 ade2 ade3 ura3 trp1 his3 tif51A::HIS3</i> [pSV624]	este trabalho
SVL527	<i>MAT α leu2-3 ade2 ade3 ura3 trp1 his3 tif51A::HIS3</i> [pSV625]	este trabalho
SVL528	<i>MAT α leu2-3 ade2 ade3 ura3 trp1 his3 tif51A::HIS3</i> [pSV626]	este trabalho
SVL529	<i>MAT α leu2-3 ade2 ade3 ura3 trp1 his3 tif51A::HIS3</i> [pSV140]	este trabalho
SVL530	<i>MAT α leu2-3 ade2 ade3 ura3 trp1 his3 tif51A::HIS3</i> [pSV146]	este trabalho
SVL533	<i>MAT α leu2-3 ade2 ade3 ura3 trp1 his3 tif51A::HIS3</i> [pSV615]	este trabalho
SVL534	<i>MAT α leu2-3 ade2 ade3 ura3 trp1 his3 tif51A::HIS3</i> [pSV616]	este trabalho

SVL599	<i>MATα leu2-3 ade2 ade3 ura3 trp1 his3 tif51A::HIS3</i> [pSV708]	este trabalho
SVL601	<i>MATα leu2-3 ade2 ade3 ura3 trp1 his3 tif51A::HIS3</i> [pSV710]	este trabalho
SVL602	<i>MATα leu2-3 ade2 ade3 ura3 trp1 his3 tif51A::HIS3</i> [pSV711]	este trabalho
SVL603	<i>MATα leu2-3 ade2 ade3 ura3 trp1 his3 tif51A::HIS3</i> [pSV712]	este trabalho
SVL604	<i>MATα leu2-3 ade2 ade3 ura3 trp1 his3 tif51A::HIS3</i> [pSV713]	este trabalho
SVL631	<i>MATα leu2-3 ade2 ade3 ura3 trp1 his3 tif51A::HIS3</i> [pSV731] [pSV146]	este trabalho
SVL632	<i>MATα leu2-3 ade2 ade3 ura3 trp1 his3 tif51A::HIS3</i> [pSV732] [pSV146]	este trabalho
SVL633	<i>MATα leu2-3 ade2 ade3 ura3 trp1 his3 tif51A::HIS3</i> [pSV733] [pSV146]	este trabalho
SVL634	<i>MATα leu2-3 ade2 ade3 ura3 trp1 his3 tif51A::HIS3</i> [pSV734]	este trabalho
SVL636	<i>MATα leu2-3 ade2 ade3 ura3 trp1 his3 tif51A::HIS3</i> [pSV763]	este trabalho
SVL649	<i>MATα leu2-3 ade2 ade3 ura3 trp1 his3 tif51A::HIS3</i> [pSV767]	este trabalho
SVL650	<i>MATα leu2-3 ade2 ade3 ura3 trp1 his3 tif51A::HIS3</i> [pSV778]	este trabalho
SVL664	<i>MATα leu2-3 ade2 ade3 ura3 trp1 his3 tif51A::HIS3</i> [pSV783]	este trabalho
SVL665	<i>MATα leu2-3 ade2 ade3 ura3 trp1 his3 tif51A::HIS3</i> [pSV782]	este trabalho
SVL666	<i>MATα leu2-3 ade2 ade3 ura3 trp1 his3 tif51A::HIS3</i> [pSV793]	este trabalho
SVL667	<i>MATα leu2-3 ade2 ade3 ura3 trp1 his3 tif51A::HIS3</i> [pSV784]	este trabalho
SVL668	<i>MATα leu2-3 ade2 ade3 ura3 trp1 his3 tif51A::HIS3</i> [pSV781]	este trabalho
SVL671	<i>MATα leu2-3 ade2 ade3 ura3 trp1 his3 tif51A::HIS3</i> [pSV785] [pSV146]	este trabalho
SVL672	<i>MATα leu2-3 ade2 ade3 ura3 trp1 his3 tif51A::HIS3</i> [pSV786] [pSV146]	este trabalho
SVL673	<i>MATα leu2-3 ade2 ade3 ura3 trp1 his3 tif51A::HIS3</i>	este trabalho

	[pSV787] [pSV146]	
SVL704	<i>MATα leu2-3 ade2 ade3 ura3 trp1 his3 tif51A::HIS3</i> [pSV769] [pSV146]	este trabalho
SVL705	<i>MATα leu2-3 ade2 ade3 ura3 trp1 his3 tif51A::HIS3</i> [pSV771] [pSV146]	este trabalho
SVL706	<i>MATα leu2-3 ade2 ade3 ura3 trp1 his3 tif51A::HIS3</i> [pSV773] [pSV146]	este trabalho
SVL707	<i>MATα leu2-3 ade2 ade3 ura3 trp1 his3 tif51A::HIS3</i> [pSV775] [pSV146]	este trabalho
SVL708	<i>MATα leu2-3 ade2 ade3 ura3 trp1 his3 tif51A::HIS3</i> [pSV138] [pSV59]	este trabalho
SVL718	<i>MATα leu2-3 ade2 ade3 ura3 trp1 his3</i> <i>tif51A(C39Y/P83L/G118D)</i> [pSV99]	(Frigieri et al., 2007)
SVL720	<i>MATα leu2-3 ade2 ade3 ura3 trp1 his3 tif51A::HIS3</i> [pSV842] [pSV146]	este trabalho
SVL721	<i>MATα leu2-3 ade2 ade3 ura3 trp1 his3 tif51A::HIS3</i> [pSV843]	este trabalho
SVL722	<i>MATα leu2-3 ade2 ade3 ura3 trp1 his3 tif51A::HIS3</i> [pSV844]	este trabalho
SVL723	<i>MATα leu2-3 ade2 ade3 ura3 trp1 his3 tif51A::HIS3</i> [pSV845] [pSV146]	este trabalho
SVL727	<i>MATα leu2-3 ade2 ade3 ura3 trp1 his3 tif51A::HIS3</i> [pSV39] [pSV146]	este trabalho
SVL731	<i>MATα trp1 ura3 leu2 his3 ade2 tif51AΔHIS3 ProtA-TIF51A</i>	este trabalho
VZL737	<i>MATα trp1 ura3 leu2 his3 ade2 tif51AΔHIS3 ProtA-TIF51A</i> [pSV59]	este trabalho
VZL738	<i>MATα trp1 ura3 leu2 his3 ade2 tif51AΔHIS3 ProtA-TIF51A</i> [pSV146]	este trabalho
VZL739	<i>MATα trp1 ura3 leu2 his3 ade2 tif51AΔHIS3 ProtA-TIF51A</i> [pSV39]	este trabalho
VZL740	<i>MATα trp1 ura3 leu2 his3 ade2 tif51AΔHIS3 ProtA-TIF51A</i> [pSV731]	este trabalho
VZL741	<i>MATα trp1 ura3 leu2 his3 ade2 tif51AΔHIS3 ProtA-TIF51A</i> [pSV732]	este trabalho
VZL742	<i>MATα trp1 ura3 leu2 his3 ade2 tif51AΔHIS3 ProtA-TIF51A</i> [pSV733]	este trabalho
VZL743	<i>MATα trp1 ura3 leu2 his3 ade2 tif51AΔHIS3 ProtA-TIF51A</i> [pSV771]	este trabalho
VZL745	<i>MATα trp1 ura3 leu2 his3 ade2 tif51AΔHIS3 ProtA-TIF51A</i>	este trabalho

	[pSV775]	
VZL746	<i>MATa trp1 ura3 leu2 his3 ade2 tif51AΔHIS3 ProtA-TIF51A</i> [pSV785]	este trabalho
VZL747	<i>MATa trp1 ura3 leu2 his3 ade2 tif51AΔHIS3 ProtA-TIF51A</i> [pSV786]	este trabalho
VZL748	<i>MATa trp1 ura3 leu2 his3 ade2 tif51AΔHIS3 ProtA-TIF51A</i> [pSV787]	este trabalho
VZL749	<i>MATa trp1 ura3 leu2 his3 ade2 tif51AΔHIS3 ProtA-TIF51A</i> [pSV769]	este trabalho
VZL750	<i>MATa trp1 ura3 leu2 his3 ade2 tif51AΔHIS3 ProtA-TIF51A</i> [pSV773]	este trabalho
VZL751	<i>MATa trp1 ura3 leu2 his3 ade2 tif51AΔHIS3 ProtA-TIF51A</i> [pSV845]	este trabalho
VZL752	<i>MATa trp1 ura3 leu2 his3 ade2 tif51AΔHIS3 ProtA-TIF51A</i> [pSV842]	este trabalho
VZL810	<i>MAT α leu2 ura3 trp1 his3 tif51A::HIS3 tif51B::KanMX4</i> [pSV146]	este trabalho
VZL821	<i>MAT α leu2 ura3 trp1 his3 tif51A::HIS3 tif51B::KanMX4</i> [pVZ708]	este trabalho
VZL822	<i>MAT α leu2 ura3 trp1 his3 tif51A::HIS3 tif51B::KanMX4</i> [pVZ734]	este trabalho

Tabela 2. Plasmídeos utilizados neste estudo

Plasmídeo	Descrição	Referência
pYGEX-2T (pSV20)	Vetor <i>URA3</i> 2 μ para expressão de proteína de fusão GST (N-terminal) com promotor induzível por galactose	Dra. Pamela Silver
pGEX-4T1 (pSV43)	Vetor para expressão em bactéria da proteína de fusão GST	Invitrogen
pRS314 (pSV58)	<i>TRP1 CEN</i>	(Sikorski e Hieter, 1989)
pRS315 (pSV59)	<i>LEU2 CEN</i>	(Sikorski e Hieter, 1989)
pCGF-1A (pSV76)	Vetor <i>URA3</i> 2 μ para expressão de proteína de fusão GFP (N-terminal) com promotor induzível por galactose	Dra. Pamela Silver
pQE-30 (pSV255)	Vetor para expressão em bactéria da proteína de fusão 6xHis-tag	Qiagen
pUC18 (pSV303)	Cloning vector	G.E Helthcare
pET28a (pSV514)	Vetor para expressão em bactéria da proteína de fusão 6xHis-tag	Novagen
pYES2 (pSV550)	Vetor <i>URA3</i> 2 μ para expressão em levedura com promotor induzível por galactose	Invitrogen
pSV28	<i>ADE3</i> clonado em pRS426	Dra. Pamela A. Silver
pSV35	<i>TIF51A</i> em pGEX-4T1	Coleção do laboratório
pSV36	<i>TIF51A</i> em pYGEX-2T (<i>URA3</i> 2 μ)	Coleção do laboratório
pSV39	<i>tif51A(K51R)</i> em pRS425	(Stephen Buratowski)
pSV40	<i>tif51A^{K51R}</i> em pYGEX-2T(<i>URA3</i> 2 μ)	Coleção do laboratório
pSV99	<i>TIF51A</i> em pSV28	(Frigieri <i>et al.</i> , 2007)
pSV137	<i>TIF51A</i> em pCGF-1A	Coleção do laboratório
pSV138	<i>TIF51A</i> em pRS316	(Valentini <i>et al.</i> , 2002)
pSV139	<i>tif51A-1</i> em pRS315	(Valentini <i>et al.</i> , 2002)
pSV140	<i>tif51A-3</i> em pRS315	(Valentini <i>et al.</i> , 2002)
pSV141	<i>tif51A-2</i> em pRS315	(Valentini <i>et al.</i> , 2002)
pSV146	<i>TIF51A</i> em pRS315	(Valentini <i>et al.</i> , 2002)
pSV305	<i>TIF51A</i> em pUC18	este trabalho
pSV431	<i>DYS1</i> em pGEX-4T 1	Coleção do laboratório

pSV500	vetor pRS314 sem o sítio de restrição <i>SalI</i>	este trabalho
pSV501	<i>TIF51A</i> em pSV500	este trabalho
pSV615	<i>tif51A</i> (C39Y) em pRS315	este trabalho
pSV616	<i>tif51A</i> (G118D) em pRS315	este trabalho
pSV617	<i>tif51A</i> (T66I/G118D) em pUC18	este trabalho
pSV618	<i>tif51A</i> (G118D/M142I) em pUC18	este trabalho
pSV619	<i>tif51A</i> (G118D/S140F) em pUC18	este trabalho
pSV620	<i>tif51A</i> (M142I) em pUC18	este trabalho
pSV621	<i>tif51A</i> (S140F) em pUC18	este trabalho
pSV622	<i>tif51A</i> (T66I/G118D) em pRS315	este trabalho
pSV623	<i>tif51A</i> (G118D/M142I) em pRS315	este trabalho
pSV624	<i>tif51A</i> (G118D/S140F) em pRS315	este trabalho
pSV625	<i>tif51A</i> (M142I) em pRS315	este trabalho
pSV626	<i>tif51A</i> (S140F) em pRS315	este trabalho
pSV708	<i>tif51A</i> (Q22H/L93F) em pSV500	este trabalho
PSV710	<i>tif51A</i> (N29K/M44I/P83S) em pSV500	este trabalho
pSV711	<i>tif51A</i> (G14D/V57D) em pSV500	este trabalho
pSV712	<i>tif51A</i> (L93F) em pSV500	este trabalho
pSV713	<i>tif51A</i> (Q22H) em pSV500	este trabalho
pSV727	<i>TIF51A</i> em pQE-30	este trabalho
pSV731	<i>tif51A</i> (G53A) em pRS315	este trabalho
pSV732	<i>tif51A</i> (H52A) em pRS315	este trabalho
pSV733	<i>tif51A</i> (G50A) em pRS315	este trabalho
pSV734	<i>tif51A</i> (K56A) em pRS315	este trabalho
pSV735	<i>tif51A</i> (M1L) em pRS314	este trabalho
pSV736	<i>tif51A</i> (M1L/T10M) em pRS314	este trabalho
pSV766	<i>tif51A</i> (T66I) em pUC18	este trabalho
pSV767	<i>tif51A</i> (T66I) em pRS315	este trabalho
pSV768	<i>tif51A</i> (C39Y/G50D) em pUC18	este trabalho
pSV769	<i>tif51A</i> (C39Y/G50D) em pRS315	este trabalho
pSV770	<i>tif51A</i> (G50D) em pUC18	este trabalho
pSV771	<i>tif51A</i> (G50D) em pRS315	este trabalho
pSV772	<i>tif51A</i> (C39Y/G53D) em pUC18	este trabalho

pSV773	<i>tif51A</i> (C39Y/G53D) em pRS315	este trabalho
pSV774	<i>tif51A</i> (G53D) em pUC18	este trabalho
pSV775	<i>tif51A</i> (G53D) em pRS315	este trabalho
pSV777	<i>tif51A</i> (P116L/G118D) em pUC18	este trabalho
pSV778	<i>tif51A</i> (P116L/G118D) em pUC18	este trabalho
pSV780	<i>tif51A</i> (M44I/P83S) em pUC18	este trabalho
pSV781	<i>tif51A</i> (M44I/P83S) em pSV500	este trabalho
pSV782	<i>tif51A</i> (N29K) em pSV500	este trabalho
pSV783	<i>tif51A</i> (G14D) em pSV500	este trabalho
pSV784	<i>tif51A</i> (V57D) em pSV500	este trabalho
pSV785	<i>tif51A</i> (H52D) em pRS315	este trabalho
pSV786	<i>tif51A</i> (H54D) em pRS315	este trabalho
pSV787	<i>tif51A</i> (K56D) em pRS315	este trabalho
pSV793	<i>tif51A</i> (M44I) em pRS315	este trabalho
pSV794	<i>tif51A</i> (M44I) em pUC18	este trabalho
pSV809	<i>tif51A</i> (P116stop) em pQE-30	este trabalho
pSV810	<i>tif51A</i> (G118V/L120N/L124D) em pQE-30	este trabalho
pSV842	<i>tif51A</i> (P116stop) em pRS315	este trabalho
pSV843	<i>tif51A</i> (S24P) em pRS315	este trabalho
pSV844	<i>tif51A</i> (G118V/D122W) em pRS315	este trabalho
pSV845	<i>tif51A</i> (G118V/L120N/L124D) em pRS315	este trabalho
pVZ973	<i>tif51A</i> (K56A) em pCGF-1A	este trabalho
pVZ974	<i>tif51A</i> (Q22H/L93F) em pCGF-1A	este trabalho
pVZ975	6xHis- <i>TIF51A</i> em pYES2	este trabalho
pVZ976	6xHis- <i>tif51A</i> (K51R) em pYES2	este trabalho
pVZ1009	pST39	(Song Tan <i>et al.</i> , 2001)
pVZ1010	pET3aTR	(Song Tan <i>et al.</i> , 2001)
pVZ1011	pST39 helF5A DHS DOHH	este trabalho
pVZ1055	pST39 helF5A DHS	este trabalho
pVZ1056	pET3aTRm	este trabalho

Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos de mutação sítio-dirigida.

Oligo	Mutação	Sequência (5'-3') ^a
SVO210	M1L	5'- CCAACTCATATATACACTGTCTGACGAAGAAC – 3'
SVO211		5'- GGTTGAGTATATATGTGACAGACTGCTTCTTG – 3'
SVO212	T10M	5'- GAACATACCTTTGAAATGGCTGACGCTGGTTCC – 3'
SVO213		5'- CTTGTATGGAACTTTACCGACTGCGACCAAGG – 3'
SVO214	K56A	5'- GCACGGTCACGCTGCAGTCCATTTGGTTGCC – 3'
SVO215		5'- CGTGCCAGTGCGTCGTCAGGTAAACCAACGG – 3'
SVO216	G50A	5'- CCACTTCTAAGACTGCTAAGCACGGTCACGC – 3'
SVO217		5'- GGTGAAGATTCTGACGCGTGCCAGTGCG – 3'
SVO218	H52A	5'- CTAAGACTGGTAAGGCCGGTCACGCTAAAGTCC – 3'
SVO219		5'- GATTCTGACCATTCCGGCCAGTGCGATTTCAGG – 3'
SVO220	G53A	5'- GACTGGTAAGCACGCTCACGCTAAAGTCC – 3'
SVO221		5'- CTGACCATTCTGTGCGAGTGCGATTTCAGG – 3'
SVO387	H52D	5'- CATAGACTGGTAAGGACGGTCACGCTAAAGTCC – 3'
SVO388		5'- GGACTTTAGCGTGACCGTCCTTACCAGTCTTAG – 3'
SVO389	P116stop	5'-GATGTCAAGGCTTAAGAAGGTGAATTGGGTG– 3'
SVO390		5'-CACCCAATTCACCTTCATTAGCCTTGACATC– 3'
SVO393	K56D	5'- GCACGGTCACGCTGACGTCCATTTGGTTGCC – 3'
SVO394		5'- GGCAACCAAATGGACGTGACGTGACCTGC – 3'
SVO395	H54D	5'- ACTGGTAAGCACGGTGACGCTAAAGTCCATTG – 3'
SVO396		5'- CAAATGGACTTTAGCGTCACCGTGCTTACCAGT – 3'
SVO405	S24P	5'- CCCAATGCAATGTCTGCCTTGAGAAAGAACG-3'
SVO406		5'- CGTTCTTTCTCAAGGCAGGACATTGCATTGGG-3'
SVO425	G118V/L120N/ L124D	5'- GCTCCAGAAGGTGAAAACGGTGACAGTGACCAAAC-3'
SVO426		5'- AGTTTGGTCACTGTACCGTTTTTACCTTCTGGAGC-3'
SVO427	G118V/D122W	5'- TCAGAAAGTTGAATTGGGTGGAGTTTGCAAACGCT-3'
SVO428		5'- AGCAGTTTGCAAACCTCCAACCCAATTCACTTCTGG-3'

^a Os nucleotídeos substituídos para a geração das mutações sítio-dirigidas estão sublinhados.

Tabela 4. Oligonucleotídeos utilizados nas clonagens e nos sequenciamentos

Oligo	Sequência (5'-3')	Sítio^a
SVO49	5` - GCC AAT TAC TCA TAG ACT CC – 3`	_____
SVO50	5` - GCG AAG AGT ACA TGA TGT GA – 3`	_____
SVO51	5` - CGC <u>GGA TCC</u> TGT ATT CCG TAG CGT TAT ATC G – 3`	<i>Bam</i> HI
SVO52	5` - CGC <u>GGA TCC</u> GAA TTA CAC TGC CTG CAT AAG G – 3`	<i>Bam</i> HI
SVO58	5` - CGC <u>GGA TCC</u> ATT TTC TCT GAG GGG TGA GAA CAG C – 3`	<i>Bam</i> HI
SVO59	5` - CGC <u>GGA TCC</u> TTT CTT CTA CCG CCT CGA TCT GAC G – 3`	<i>Bam</i> HI

4- RESULTADOS

4.1- Análise estrutural de eIF5A

4.1.1- Determinação da estrutura cristalográfica de eIF5A de *S. cerevisiae*.

Com o objetivo de determinar a estrutura terciária da proteína eIF5A de *S. cerevisiae*, nosso laboratório associou-se à Rede de Biologia Molecular Estrutural (SmolBNet) e, com a colaboração dos doutores Luciano Henrique Apponi e Francisco Javier Medrano Martin, este trabalho contribuiu com as etapas de clonagem e expressão gênica, purificação da proteína eIF5A recombinante e rastreamento das condições de cristalização. Os passos seguintes de coleta e tratamento dos dados cristalográficos, bem como, de resolução da estrutura terciária de eIF5A, foram realizados pelo Dr. Mário Sanches, sob a supervisão da Dra. Beatriz G. Guimarães, no Laboratório Nacional de Luz Síncroton – Campinas (LNLS).

Para iniciar os ensaios de cristalização de eIF5A, optou-se por produzir a proteína recombinante em fusão com GST para, posteriormente, purificar a proteína sem “tag”. Para tanto, foi utilizada uma construção já existente no laboratório (pSV35), na qual o gene codificador de eIF5A (*TIF51A*) foi clonado no vetor de expressão pGEX-T4 1 (pSV43), para a produção de GST-eIF5A. Células de *E. coli* (DH5 α) contendo a construção pGEX-T4 1-*TIF51A* (pSV35) foram então submetidas à indução da expressão com IPTG (0,4mM). Após 3 horas de crescimento a 37°C, as células foram coletadas por centrifugação, lavadas com PBS 1X e estocadas a -80°C. A seguir, as células foram lisadas por sonicação e o sobrenadante, clarificado por centrifugação, foi submetido à cromatografia de afinidade utilizando coluna de glutationa-sepharose, PBS 1X como tampão de corrida e Tris-HCl 0,1M pH 8,0 contendo 0,31g de glutationa reduzida como tampão de eluição. As frações do cromatograma foram coletadas e analisadas por SDS-PAGE seguido de coloração por Coomassie Blue. Após combinação das frações que continham GST-eIF5A, diálise contra tampão PBS 1X para remoção da glutationa e digestão com trombina para separação de GST e eIF5A, a amostra foi novamente submetida à cromatografia de afinidade e a proteína eIF5A pôde ser purificada em quantidades suficientes para os ensaios de cristalização (resultados não mostrados).

Como não existe nenhum teste funcional *in vitro* para verificar a funcionalidade

de eIF5A, não é possível determinar se a proteína purificada mantém sua estrutura terciária funcional. A técnica de dicroísmo circular foi então utilizada na tentativa de verificar se a proteína purificada apresentava estruturas secundárias após a purificação, uma vez que o dado obtido por essa técnica fornece uma medida estimada do conteúdo de estruturas secundárias. As análises foram realizadas no LNLS pelo Dr. Francisco Javier Medrano Martin. Amostra da proteína eIF5A purificada (0,1mg/mL) foi submetida a análise em espectropolarímetro e o perfil de dicroísmo circular obtido para a proteína evidenciou um predomínio de estruturas secundárias irregulares e estruturas β (resultados não mostrados), confirmando dados anteriormente descritos para as proteínas de humano (Facchiano *et al.*, 2001) e de arqueas (Kim *et al.*, 1997; Peat *et al.*, 1998; Yao *et al.*, 2003). Foi realizado também um ensaio de estabilidade estrutural dessa proteína por dicroísmo circular, sob variação de temperatura de 20°C a 95°C, sendo possível verificar que analisando a estabilidade no comprimento de onda 222nm, a proteína sofre pouca modificação da estrutura secundária até 75°C (resultados não mostrados), o que indica que a proteína purificada é bastante estável.

A proteína eIF5A pura foi então submetida a diálise contra tampão Tris-HCL 20mM pH 7,5; concentrada a 15mg/mL e submetida ao rastreamento de condições de cristalização utilizando os Kits Hampton Research (Crystal Screen I e II; PEG/Ion), Jena Bioscience (1 e 2) e Wizard (1 e 2) a 18°C. Este rastreamento revelou algumas condições nas quais foi observada a formação de esferolitos. Testes posteriores de refinamento de tais condições, onde foram variadas a concentração da proteína, a concentração dos agentes precipitantes, o pH dos tampões e a temperatura de cristalização, continuaram a apresentar apenas esferolitos e o rastreamento foi então abandonado.

Como última tentativa de obter a estrutura de eIF5A de *S. cerevisiae* por cristalografia, foi realizada nova estratégia de expressão e purificação dessa proteína, desta vez em fusão a uma sequência de histidinas. Para isso, a região codificadora do gene *TIF51A* foi clonada no vetor de expressão pQE-30 (pSV255), gerando a construção pQE-30-*TIF51A* (pSV727), a qual foi introduzida em *E. coli* (M15). Após algumas tentativas de obter a proteína solúvel e em quantidades suficientes aos ensaios de cristalização, a indução de sua expressão foi realizada com 0,2mM de IPTG, a 25°C por três horas, como pode ser observado no painel A

da Figura 7. Após a lise celular por sonicação e clarificação do lisado por centrifugação, o extrato foi submetido a cromatografia de afinidade utilizando coluna NINTA (Qiagen). O painel B da Figura 7 apresenta as etapas dessa purificação e pode-se verificar que várias frações contêm a proteína 6xHis-eIF5A pura. Essas frações contendo a proteína purificada foram reunidas, submetidas a diálise em tampão Tris-HCl 20mM pH7,5 e concentradas.

A fim de verificar a manutenção das estruturas secundárias de 6xHis-eIF5A após a purificação, essa proteína também foi submetida ao ensaio de dicroísmo circular pelo Dr. Francisco Javier Medrano Martin, no LNLS. Como descrito anteriormente para a proteína eIF5A sem “tag”, o perfil obtido com a proteína 6xHis-eIF5A também evidenciou um predomínio de estruturas secundárias irregulares e estruturas β (resultados não mostrados), com estabilidade estrutural quando a proteína foi submetida ao dicroísmo circular sob variação de temperatura (resultados não mostrados).

A proteína 6xHis-eIF5A pura foi então concentrada a 15mg/mL e submetida ao rastreamento de cristalização utilizando os Kits Hampton Research (Crystal Screen I e II; PEG/Ion), Jena Bioscience (1 a 10) e Wizard (1 e 2) a 18°C. Em 24 horas, houve a formação de dois cristais com tamanho adequado para coleta de dados na condição 30% PEG 400; 0,1M NaMES pH6,5; 0,1M $MgCl_2$ (resultados não mostrados). Esses cristais foram submetidos a difração de raios-X, entretanto, a difração foi baixa (3,8Å), provavelmente devido à célula unitária que apresentou um dos parâmetros bastante grande (59,13Å, 59,13Å, 343,86Å, 90,00°, 90,00° e 120,00°). Apesar da baixa resolução, foi possível determinar o grupo espacial a que pertencem os cristais dessa proteína (Hexagonal - P6₅22). Em outras condições, houve formação em duas semanas de cristais compridos de diâmetro pequeno e agulhas. Essas condições de cristalização foram as seguintes:

- 20% PEG 4000; 5% isopropanol; 0,1M Citrato de Sódio.
- 22% PEG 4000; 0,2M Sulfato de Amônio; 0,1M Acetato de Sódio.
- 25% PEG 4000; 0,1M NaHEPES pH7,5; 0,2M Sulfato de Lítio; 0,1M Acetato de Sódio.
- 15% PEG 8000; 0,1M NaMES pH6,5; 0,2M Acetato de Sódio.

Novos lotes da proteína foram então produzidos e as condições que revelaram esses cristais foram refinadas variando a temperatura, a porcentagem do precipitante, o pH, o tampão e a concentração da proteína, entretanto, cristais semelhantes se formaram (resultados não mostrados). A condição contendo 20% PEG 4000; 5% isopropanol e 0,1M Citrato de Sódio foi refinada retirando o isopropanol e dois cristais iguais aos anteriores foram formados em duas semanas (resultados não mostrados). Todos esses cristais também foram submetidos a difração de raios-X mas não mostraram melhora na resolução.

Com o objetivo de aumentar o tempo de formação dos cristais e, assim, tentar melhorar sua resolução pelo melhor arranjo das moléculas protéicas, foi decidido adicionar diferentes proporções de óleo ao poço de baixo da condição 30% PEG 400; 0,1M NaMES pH6,5; 0,1M $MgCl_2$. Como esperado, com a adição do óleo a velocidade de difusão da água da gota para o poço diminuiu e a proteína, que antes cristalizava em 24 horas, demorou de uma a duas semanas para cristalizar. Além disso, esses cristais apresentaram-se maiores que aqueles obtidos anteriormente nessa condição. Entretanto, ao expor esses novos cristais ao feixe de raios-X o padrão de difração não mudou (resultados não mostrados).

Como última tentativa de conseguir cristais com boa resolução, a condição 30% PEG 400; 0,1M NaMES pH6,5; 0,1M $MgCl_2$ foi refinada utilizando os Kits 1, 2 e 3 de aditivos da Hampton Research (Additive Screen). Novos cristais com tamanho adequado à exposição ao feixe de raios-X formaram-se na presença dos seguintes aditivos: Cloreto de cálcio 0,01M; Cloreto de magnésio 0,01M; Glicerol 3%; Hexanodiol 3%; MPD 3%; Etileno glicol 3%; Uréia 3%; Dioxano 3%; Etanol 3%; Isopropanol 3%; Metanol 3%; L-cisteína 0,01M; EDTA 0,01M; Glicose 3%; Sucrose 3%; Xilitol 3%; Glicina 0,1M ou Fenol 0,01M (resultados não mostrados).

Todos os cristais foram analisados e a maioria apresentou resolução igual ou superior a 3,4 Å. Apenas nas condições com adição de glicerol 3% (painel A da Figura 8) ou glicina 0,1M (resultados não mostrados), a resolução foi um pouco melhor, mas os cristais formados ainda apresentaram células unitárias grandes. Dessa maneira, os dados de três cristais com resolução entre 49,447 - 3,352 Å e célula unitária de aproximadamente 59,13Å, 59,13Å, 343,86Å, 90,00°, 90,00° e 120,00° foram coletados (painel A da Figura 8). Esses cristais apresentaram duas moléculas de 6xHis-eIF5A na unidade assimétrica e o mesmo grupo estrutural dos cristais analisados previamente (Hexagonal - P6₅22).

Como dito anteriormente, todos os dados cristalográficos foram coletados e analisados pelo Dr. Mário Sanches, com a supervisão da Dra. Beatriz G. Guimarães. Da mesma forma, a estrutura de 6xHis-eIF5A de *S. cerevisiae* foi resolvida pelo método de substituição molecular a partir da proteína homóloga de *L. braziliensis* - PDB ID 1X6O (painel B da Figura 8). Apesar de não ter sido possível visualizar as cadeias laterais dos aminoácidos de algumas regiões da estrutura obtida, provavelmente devido a sua baixa resolução, foi possível determinar com precisão as estruturas secundárias que compõem a molécula de 6xHis-eIF5A. A estrutura cristalográfica de 6xHis-eIF5A de *S. cerevisiae* foi então depositada no “Protein Data Bank” (PDB ID 3ER0) e está apresentada no painel B da Figura 8.

Como descrito anteriormente, eIF5A é a única proteína conhecida que sofre a modificação pós-traducional de formação do aminoácido hipusina, pela ação das enzimas desoxihipusina sintase (Dys1 em *S. cerevisiae*) e desoxihipusina hidroxilase (Lia1 em *S. cerevisiae*), como está apresentado na Figura 3 (Park, 2006). Com o propósito de determinar as regiões estruturais importantes para a formação do complexo eIF5A-Dys1, foi proposto o estudo cristalográfico dessas duas proteínas complexadas. Para isso, inicialmente, a sequência codificadora da proteína Dys1 foi amplificada por PCR a partir de DNA genômico de *S. cerevisiae* e clonada nos vetores pQE30 e pET28a para a produção da proteína de fusão 6xHis-Dys1, porém, apesar de inúmeras tentativas, não foi possível determinar a condição de expressão de 6xHis-Dys1 (dados não mostrados). Dessa maneira, optou-se por clonar *DYS1* no vetor de expressão pGEX-4T 1, para produzir a proteína de fusão GST-Dys1 e, posteriormente, purificar Dys1 livre. Apesar da produção de GST-Dys1 ter sido suficiente para sua purificação (painel A da Figura 9), não foi possível separar GST de Dys1 devido a precipitação da proteína Dys1 livre no processo de digestão com trombina.

Sendo assim, diante da dificuldade em purificar a proteína desoxihipusina sintase, o objetivo de estudo cristalográfico do complexo protéico eIF5A-Dys1 foi abandonado. Entretanto, a proteína GST-Dys1 purificada foi utilizada para a imunização de um coelho segundo o protocolo descrito em 3.2.19. Dessa maneira, foi obtido o anticorpo policlonal anti-Dys1, reagente necessário para ensaios apresentados adiante. O painel B da Figura 9 apresenta o western blot contra extrato total de levedura, utilizando o soro obtido a partir de cada um dos sangramentos parciais do coelho. O soro anti-Dys1, obtido após a primeira etapa da

imunização (1ª sangria), foi testado nas diluições 1:500 e 1:1.000 (canaletas 3 e 4). Como pode ser observado, o soro anti-Dys1 já reconheceu a proteína de 43kDa a partir do extrato total de levedura selvagem. Entretanto, nota-se que o título do soro melhorou significativamente após a conclusão do esquema de imunização. As canaletas 5 e 6 mostram os resultados obtidos com a segunda sangria (diluições 1:1.000 e 1:2.000). Nas canaletas 7 e 8 estão apresentadas as diluições 1:2.000 e 1:5.000 referentes à terceira sangria. O soro do coelho proporcionou uma boa resposta imunológica, pois o mesmo permitiu em todas as sangrias a detecção da proteína Dys1. Sendo assim, para a detecção de Dys1 nos ensaios posteriores, foi utilizado o soro referente à 3ª sangria na diluição 1:5.000. A obtenção deste anticorpo foi realizada com a colaboração do bolsista de Iniciação Científica Wagner da Silva Silveira.

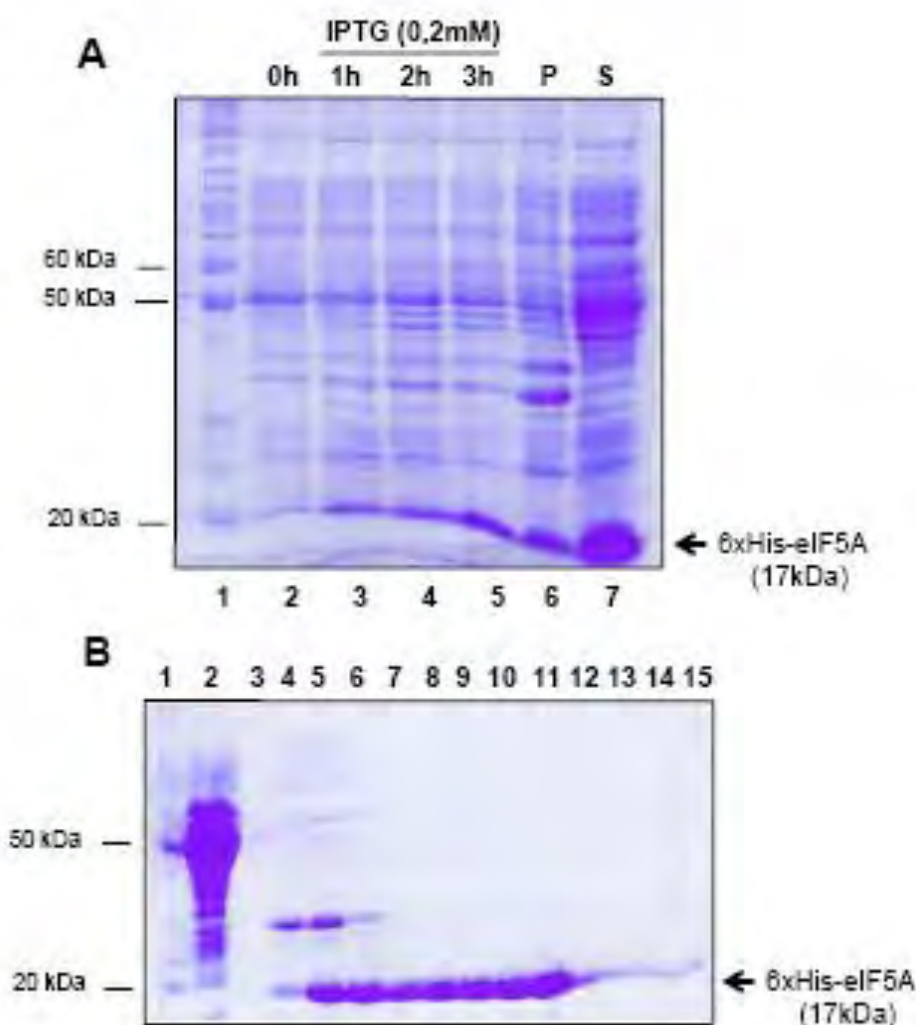


Figura 7. Produção e purificação de 6xHis-eIF5A de *S.cerevisiae* a partir de bactéria, utilizando coluna de níquel. Amostras referentes ao teste de expressão e às frações de purificação por cromatografia de afinidade foram separadas por SDS-PAGE e coradas por “Coomassie Blue”. (A) Indução da produção de 6xHis-eIF5A. Alíquotas da cultura bacteriana antes (canaleta 2) e após indução com 0,2mM IPTG (canaletas 3 a 5). As canaletas 6 e 7 apresentam a proteína no precipitado e no sobrenadante, respectivamente. A seta indica a proteína 6xHis-eIF5A. (B) Purificação de 6xHis-eIF5A por cromatografia de afinidade. A canaleta 2 contém proteínas não ligadas à coluna. A canaleta 3 contém amostra obtida durante a lavagem da coluna e as canaletas 4 a 15 contêm amostras coletadas durante a eluição. A seta indica 6xHis-eIF5A purificada. Observe que as canaletas 4 – 6 possuem contaminantes e essas frações foram descartadas. A canaleta 1 dos painéis contém o padrão de massa molecular 10kDa (Invitrogen).

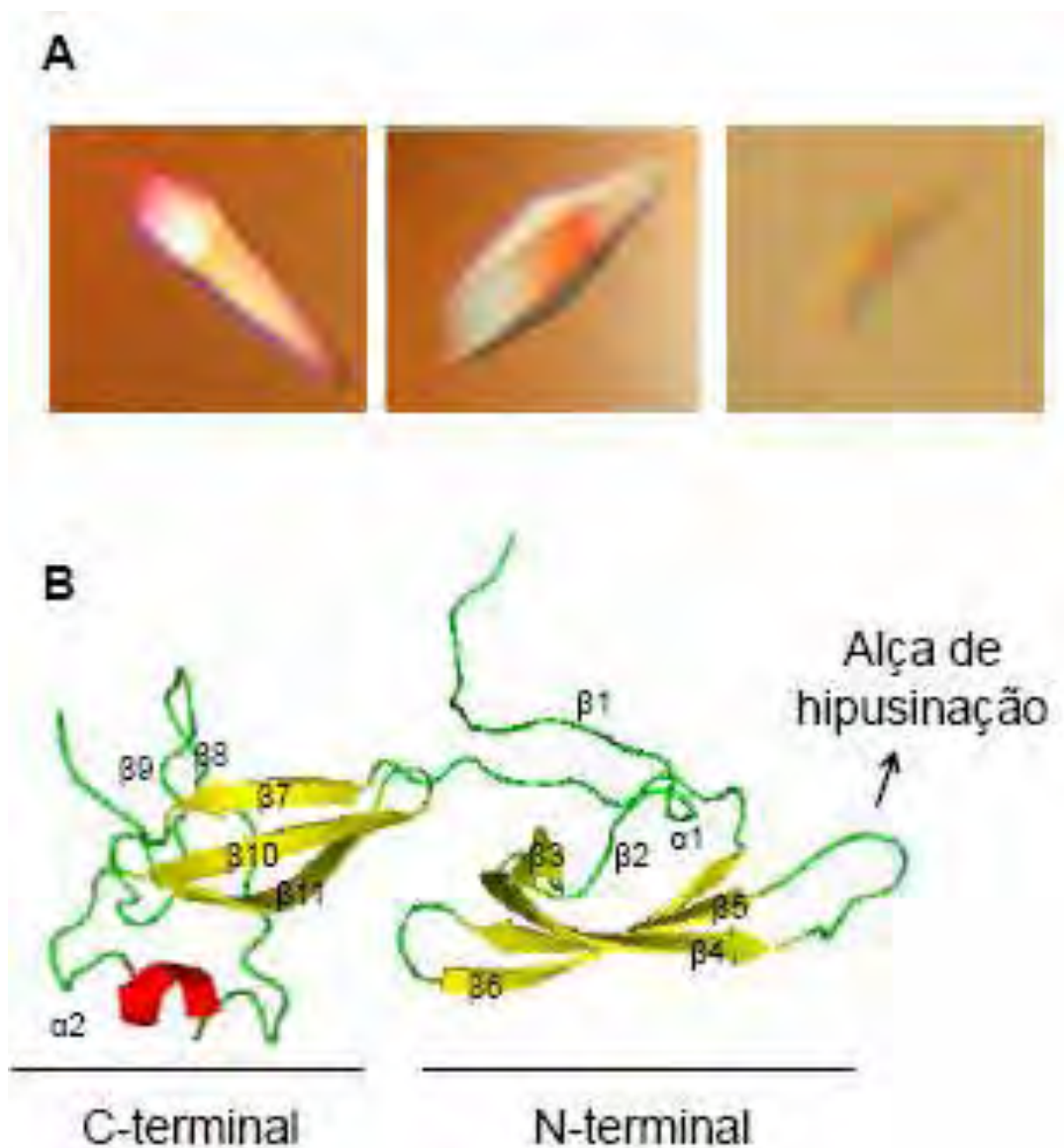


Figura 8. Estrutura cristalográfica de eIF5A de *S. cerevisiae*. (A) Três cristais da proteína 6xHis-eIF5A formados na condição na condição 30% PEG 400; 0,1M NaMES pH6,5 e 0,1M $MgCl_2$ com adição de glicerol 3%, foram analisados por difração de raios-x. A menor e a maior resolução da estrutura foram 49,447 - 3,352 Å e as dimensões da célula unitária foram 59,13Å, 59,13Å, 343,86Å, 90,00°, 90,00° e 120,00°. (B) Estrutura terciária de 6xHis-eIF5A resolvida por substituição molecular a partir da proteína homóloga de *L. brasilienses*. As duas barras horizontais indicam os domínios da proteína e a seta aponta a alça onde está localizada a lisina alvo da hipusinação. A estrutura foi depositada no PDB (ID-3ER0), onde os dados cristalográficos completos podem ser visualizados.

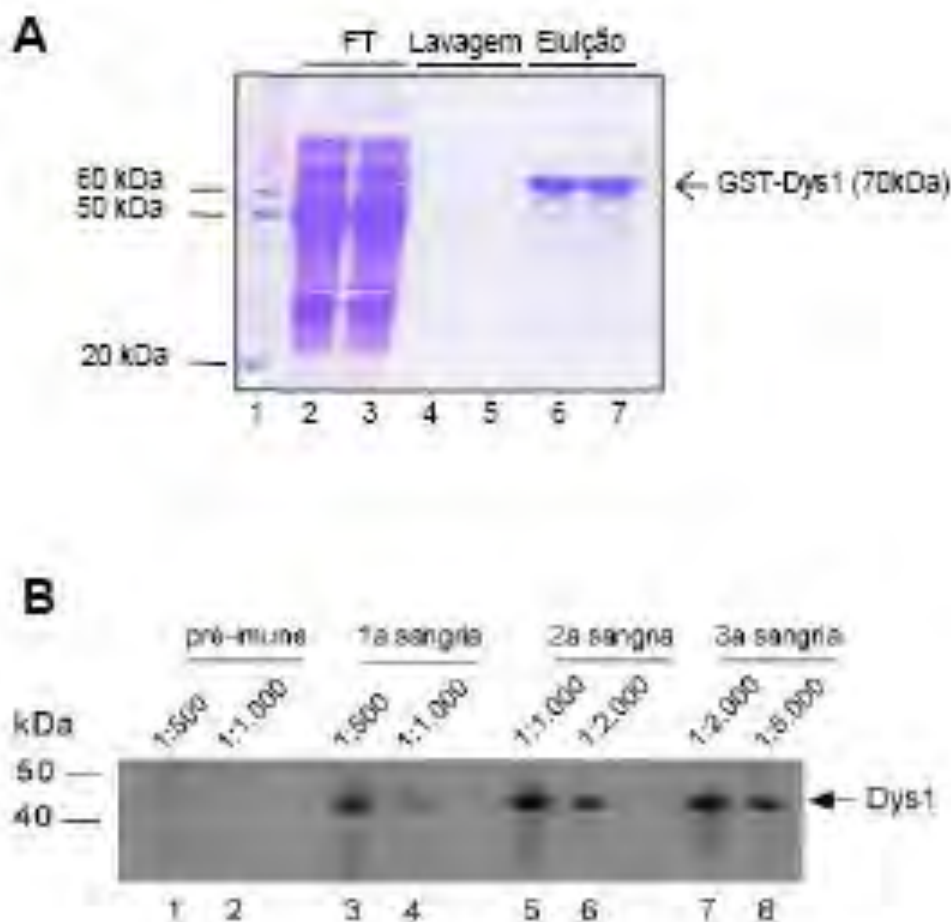


Figura 9. Purificação de GST-Dys1 e avaliação do anticorpo policlonal anti-Dys1 produzido em coelho. (A) Purificação de GST-Dys1. As canaletas 2 e 3 correspondem às frações contendo as proteínas que passam pela coluna (FT = “Flowthrough”), as canaletas 4 e 5 contêm as amostras obtidas durante a lavagem e as canaletas 6 e 7 correspondem à GST-Dys1 eluída da coluna cromatográfica. (B) Análise do anticorpo policlonal anti-Dys1. Ensaio de western blot com extrato total de leveduras, utilizando os soros obtidos após subseqüentes imunizações com a proteína GST-Dys1. O soro anti-Dys1, obtido com a 1ª sangria, foi testado nas diluições 1:500 e 1:1.000 (canaletas 3 e 4). As canaletas 5 e 6 mostram os resultados obtidos com a segunda sangria (diluições 1:1.000 e 1:2.000). Nas canaletas 7 e 8 estão apresentadas as diluições 1:2.000 e 1:5.000 referentes à terceira sangria. Para avaliar o estado prévio de imunização, o soro pré-imune do coelho foi utilizado nas diluições 1:500 e 1:1000 (canaletas 1 e 2). A proteína Dys1 está indicada na figura por seta.

4.1.2- Expressão e purificação da forma recombinante hipusinada de heIF5A

Como mencionado, a proteína eIF5A é bastante conservada de arqueas a eucariotos superiores, no entanto não está presente em bactérias (Figura 4, Park, 2006). Bactérias como a *E. coli* não possuem homólogos das enzimas desoxihipusina sintase e desoxihipusina hidroxilase, responsáveis pela modificação pós-traducional de eIF5A, essencial para sua atividade em eucariotos. Dessa maneira, eIF5A recombinante produzida em bactéria não possui o aminoácido hipusina. Devido ao baixo rendimento ao se purificar a proteína eIF5A diretamente de tecido ou de levedura, todas as estruturas cristalográficas de eIF5A publicadas até o momento são provenientes de proteínas recombinantes purificadas de bactéria e, conseqüentemente, não possuem o aminoácido hipusina. Dessa maneira, com o objetivo de produzir heIF5A recombinante de humano, hipusinada em bactéria, e assim obter quantidades suficientes da forma ativa dessa proteína para ensaios de cristalização, os genes codificadores de heIF5A, DHS e DOHH, foram clonados sequencialmente, sob o controle de um único promotor, no vetor policistronico pST39 (pVZ1009), especialmente desenvolvido para a expressão de complexos protéicos (Figura 10; Song, 2001).

Inicialmente, os sítios para as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII* que existiam fora do cassete de clonagem do vetor pET3aTr (pVZ1010) foram removidos por mutação sítio dirigida, gerando o vetor pET3aTRm (pVZ1056). Esses sítios tiveram que ser eliminados porque essas enzimas foram utilizadas para a clonagem do gene *DYS1*. Em seguida os genes codificadores de heIF5A (*Eif5a-1*), DHS e DOHH de humano foram individualmente amplificados por PCR e clonados nos sítios *NdeI/BamHI*, *NdeI/HindIII* e *NdeI/MluI*, respectivamente, de acordo com o esquema apresentado na Figura 10. Após checagem por sequenciamento, os genes codificadores de heIF5A, DHS e DOHH foram retirados do vetor pET3aTRm e subclonados no vetor pST39 (pVZ1009) nos sítios *XbaI/BamHI*, *EcoRI/HindIII* e *BspEI/MluI*, respectivamente (Figura 10). Dessa maneira, os três genes ficaram sob o controle de um único promotor presente no vetor pST39 (pVZ1009), mas com sinal individual de início de tradução.

Após o sequenciamento do clone obtido, este foi introduzido em *E.coli* (BL21 pLys) e a indução da produção de heIF5A, DHS e DOHH foi realizada com 0,1 mM

de IPTG, a 37°C por quatro horas. Como pode ser observado no painel A da Figura 11 (canaletas 3, 4 e 5), a proteína helf5A é bastante produzida, mas o mesmo não acontece com as proteínas DHS e DOHH. A produção protéica também foi checada por SDS-PAGE seguido de western blot e está apresentada no painel B da Figura 11, onde pode-se comprovar a produção de DHS e DOHH em pequena quantidade, detectável apenas por western blot.

Apesar das baixas concentrações de DHS e DOHH, esse clone foi submetido ao ensaio de hipusinação *in vivo* para verificar se helf5A estava sendo modificada. Para isso, no momento da indução da expressão protéica com 0,1mM de IPTG, foi adicionado ao meio de cultura 5µCi/mL de [³H]-espermidina. Após 4 horas de indução, as proteínas foram precipitadas com TCA 10% acrescido de 1mM de poliaminas e a incorporação de espermidina radioativa foi determinada por cintilografia. Como pode ser observado no painel C da Figura 11, na linhagem contendo o plasmídeo pST39 helf5A não há incorporação de [³H]-espermidina, enquanto que nas linhagens contendo os plasmídeos pST39 helf5A DHS (pVZ1055) ou pST39 helf5A DHS DOHH (pVZ1011) existe proteína marcada com espermidina radioativa, indicando que a proteína helf5A de humano foi modificada em bactéria e contém o aminoácido desoxihipusina e/ou hipusina.

As amostras protéicas precipitadas com TCA na presença de poliaminas foram também submetidas à hidrólise ácida seguida de cromatografia de troca iônica e análise das frações obtidas por cintilografia. Esta técnica permite a distinção entre os aminoácidos desoxihipusina e hipusina, sendo possível verificar quais formas da proteína modificada estão sendo produzidas na linhagem de *E. coli* contendo pST39 helf5A DHS ou pST39 helf5A DHS DOHH (painel D da Figura 11). Como esperado, a linhagem que expressa as duas enzimas modificadoras (DHS e DOHH) produz a forma hipusinada helf5A-Hpu, helf5A completamente modificada, enquanto que a linhagem que expressa apenas DHS produz helf5A-Dhp, a forma intermediária da proteína. Nos painéis C e D da Figura 11, pode-se verificar que a incorporação de espermidina radioativa pela célula que expressa as duas enzimas modificadoras é maior quando comparada com a célula que contém apenas os genes que codificam helf5A e DHS. Isso acontece porque a primeira etapa de modificação de helf5A é reversível enquanto que a segunda etapa, a etapa de hidroxilação, é irreversível (Figura 3; Park, 2006). Esses dados indicam que as enzimas modificadoras de helf5A, apesar de estarem em concentrações bastante reduzidas, foram capazes de

modificar hElF5A recombinante em bactéria. Além disso, verifica-se que quando as duas enzimas estão presentes, toda a proteína hElF5A produzida é hipusinada, o que está de acordo com a tese de que a hipusina é produzida imediatamente após a tradução do RNA mensageiro de eIF5A e não é alterada ou removida até que a proteína eIF5A seja degradada (Park *et al.*, 1993a).

Com o propósito de determinar a melhor condição de produção de hElF5A-Hpu, foi verificada a velocidade de expressão e hipusinação dessa proteína em bactéria. Para isso, a célula *E.coli* (BL21pLys) contendo a construção pST39 hElF5A DHS DOHH, foi induzida com 0,1mM de IPTG por 6 horas na presença de [³H]-espermidina, e alíquotas protéicas foram analisadas a cada 2 horas através SDS-PAGE seguido de coloração por Coomassie Blue, hipusinação *in vivo* e análise de aminoácido por cromatografia de troca iônica seguida de cintilografia. O painel A da Figura 12 apresenta o SDS-PAGE do extrato total celular, sendo possível observar que a produção máxima de hElF5A ocorre com 4 horas de indução (canaleta 5). Após 6 horas de indução foi verificada diminuição da proteína hElF5A. Os ensaios de hipusinação *in vivo* e de análise de aminoácido por cromatografia de troca iônica estão apresentados nos painéis B e C da Figura 12. Verifica-se que em 4 horas de indução há maior produção da proteína hElF5A-Hpu e em 6 horas de indução existe uma diminuição severa da quantidade de proteína hipusinada. Acredita-se que isso aconteça pois após 4 horas de indução as células começam a morrer devido a alta produção de proteínas recombinantes, estranhas à célula. Dessa maneira, para maior produção da proteína hElF5A-Hpu, foram padronizadas 4 horas de indução com 0,1mM de IPTG, a 37°C.

Uma vez determinada a melhor condição de produção da proteína hElF5A-Hpu, foram produzidos 6 litros de cultura, dos quais foram obtidos 20 gramas de células. A massa celular foi então coletada por centrifugação, lavada com PBS 1X e estocada a -80°C. A seguir, as células foram lisadas por sonicação, em tampão A (50mM de TrisAc pH 7,0, 0,1mM de EDTA, 1mM de DTT e 1X inibidor de protease - Roche) e o sobrenadante, clarificado por centrifugação, foi submetido à cromatografia de troca iônica utilizando a coluna DEAE Sephacel (G.E. - Healthcare), tampão A para lavagem e diferentes concentração de KCl como tampão de eluição. Antes de iniciar a cromatografia, 50pmol da proteína marcada hElF5A-[³H]Hpu, produzida por reação de hipusinação *in vitro*, foi acrescentada no extrato protéico para servir de marcador para a purificação. Frações desta cromatografia foram recolhidas e analisadas

quanto a concentração de proteína total e radioatividade (painel A da Figura 13). No painel B da Figura 13 está apresentado o SDS-PAGE referente às alíquotas do cromatograma. Pela medida de radioatividade, pode-se verificar que heIF5A-[³H]Hpu está presente em maior concentração na fração 9 da cromatografia e as análises de concentração protéica e SDS-PAGE demonstram que existe alta concentração de heIF5A junto com outras proteínas nessa mesma fração.

Dessa maneira, as frações de 8 a 10 da cromatografia anterior foram reunidas, dialisadas contra tampão A, concentradas e submetidas a nova cromatografia de troca iônica utilizando a coluna catiônica SP-Sepharose (G.E. - Healthcare), tampão A para lavagem e diferentes concentração de KCl para a eluição. As frações desta nova cromatografia também foram analisadas por radioatividade, dosagem protéica e SDS-PAGE, e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 14. São observados dois picos marcados radioativamente, um pico grande (frações de 22 a 31) que corresponde a eluição da proteína heIF5A-[³H]Hpu, e outro pico pequeno entre as frações de 15 à 19, que corresponde a forma intermediária heIF5A-[³H]Dhu. Isso acontece porque a reação de hipusinação *in vitro*, pela qual heIF5A-[³H]Hpu foi obtida, não é 100% eficiente, havendo a formação de pequena quantidade de heIF5A-[³H]Dhp. Sendo assim, pode-se observar que heIF5A foi eluída da coluna em duas regiões de concentração de KCl (Figura 14). A primeira região de eluição corresponde as proteínas heIF5A-Lis e/ou heIF5A-Dhp e a segunda, mais concentrada, corresponde a forma hipusinada da proteína pois é eluída junto com heIF5A-[³H]Hpu.

Através dos dois passos cromatográficos apresentados, utilizando as resinas DEAE-Sepharose e SP-Sepharose de troca iônica, foi possível purificar heIF5A-Hpu com mais de 95% de pureza. No entanto, para obter 100% de pureza, as frações de 22 a 27 da última cromatografia foram reunidas, dialisadas contra tampão A, concentradas e submetidas a nova cromatografia de troca iônica utilizando a coluna aniônica Q-Sepharose (G.E. - Helthcare). Novamente, foram utilizados tampão A para lavagem e diferentes concentração de KCl para a eluição. Da mesma forma, as frações cromatográficas também foram analisadas por radioatividade, dosagem protéica e SDS-PAGE seguido de coloração por Coomassie Blue. A Figura 15 apresenta os dados obtidos com a análise destas frações e pode-se verificar o alto grau de pureza da proteína heIF5A-Hpu obtida.

Todos os experimentos descritos, relacionados à obtenção da proteína heIF5A-

Hpu de humano, foram realizados durante meu Doutorado Sanduíche (Agosto 2008 – Janeiro 2009), sob supervisão da Dra. Myung Hee Park, no National Institute of Health, Bethesda – EUA. Uma vez estabelecido o procedimento de purificação da proteína hclF5A-Hpu, 50mg desta proteína pura foram produzidos e enviados para ensaios de cristalização, também no National Institute of Health, em colaboração com a Dr. Jessica K. Bell, no entanto, até o momento, ainda não foi estabelecida a condição de cristalização dessa proteína. Apesar dos resultados cristalográficos até agora negativos, a proteína hclF5A-Hpu apresenta-se como um reagente de grande importância para futuros ensaios de interação dessa proteína com o ribossomo e atividade dessa proteína *in vitro*.

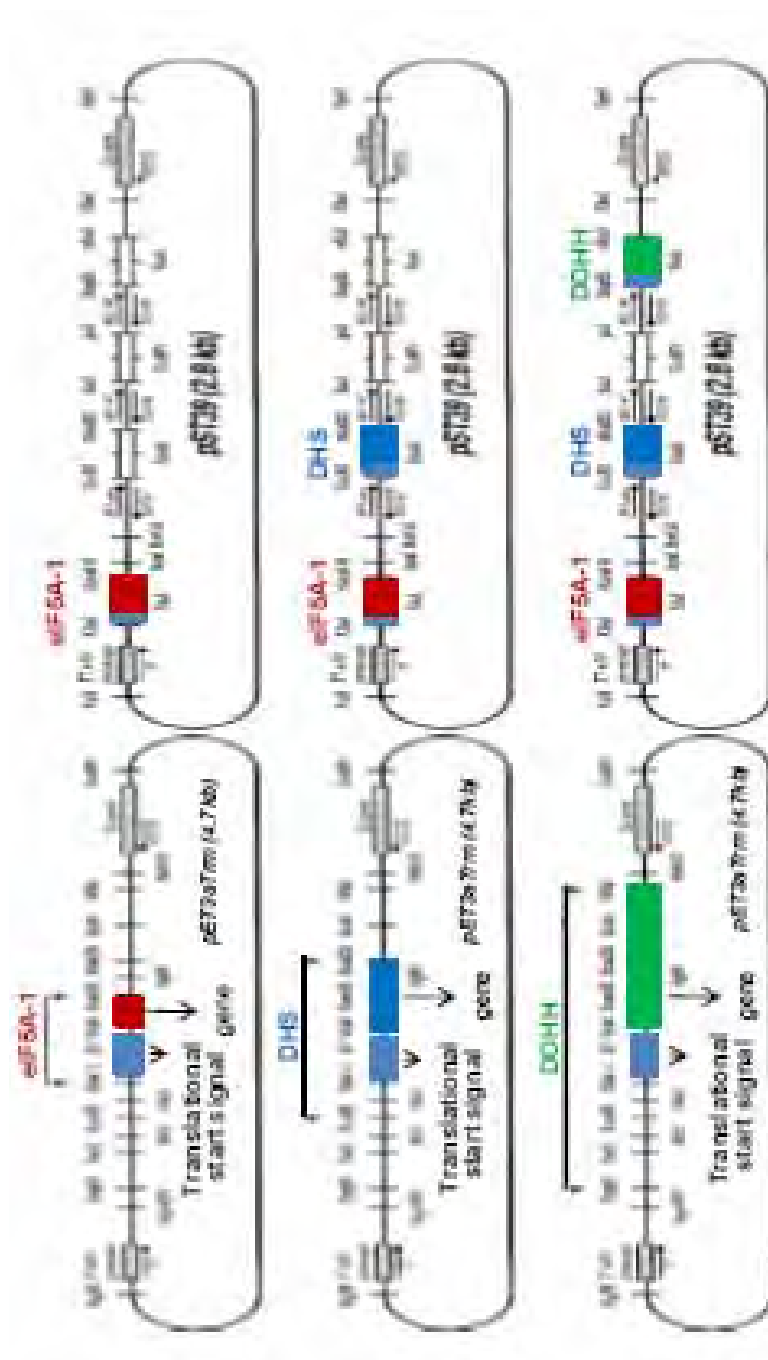


Figura 10. Esquema ilustrativo da construção do vetor de expressão policistrônico contendo os genes codificadores das proteínas heIF5A, DHS e DOHH de humano. A sequência completa dos genes codificadores de heIF5A-, DHS e DOHH de humano foram, individualmente, clonados no vetor de transição pET3aTrm e cada fragmento indicado pelas barras horizontais foram subclonados para o vetor policistrônico pST39 na seguinte ordem: heIF5A, DHS e DOHH. Cada vetor recombinante foi sequenciado antes de prosseguir para o próximo passo de subclonagem. (Figura adaptada de Song, 2001).

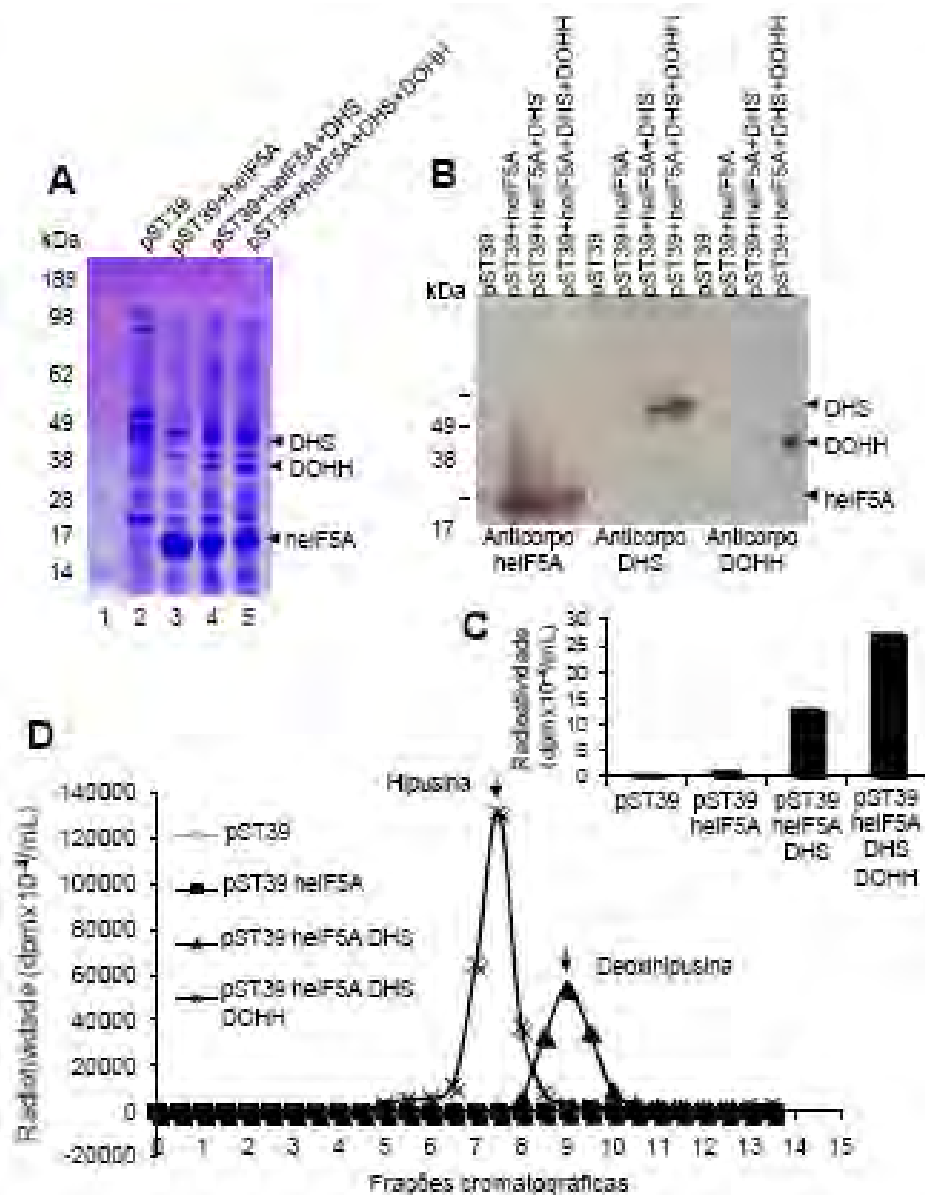


Figura 11. Determinação da expressão e modificação de eIF5A de humano, produzida em *E. coli* BL21(DE3)pLys. (A) Análise da produção das proteínas heIF5A, DHS e DOHH por SDS-PAGE seguido de coloração por Coomassie Blue. (B) Checagem da expressão de heIF5A, DHS e DOHH por SDS-PAGE do extrato protéico total seguido de western blotting. As setas indicam as proteínas heIF5A, DHS e DOHH sendo ou não produzidas em cada linhagem. (C) Ensaio de hipusinação *in vivo* no qual a modificação de heIF5A é determinada pela incorporação de espermidina radioativa em 1mL de cultura de células. (D) Determinação da forma de heIF5A modificada produzida a partir da análise dos aminoácidos desoxihipusina e hipusina, por cromatografia de troca iônica seguida de cintilografia.

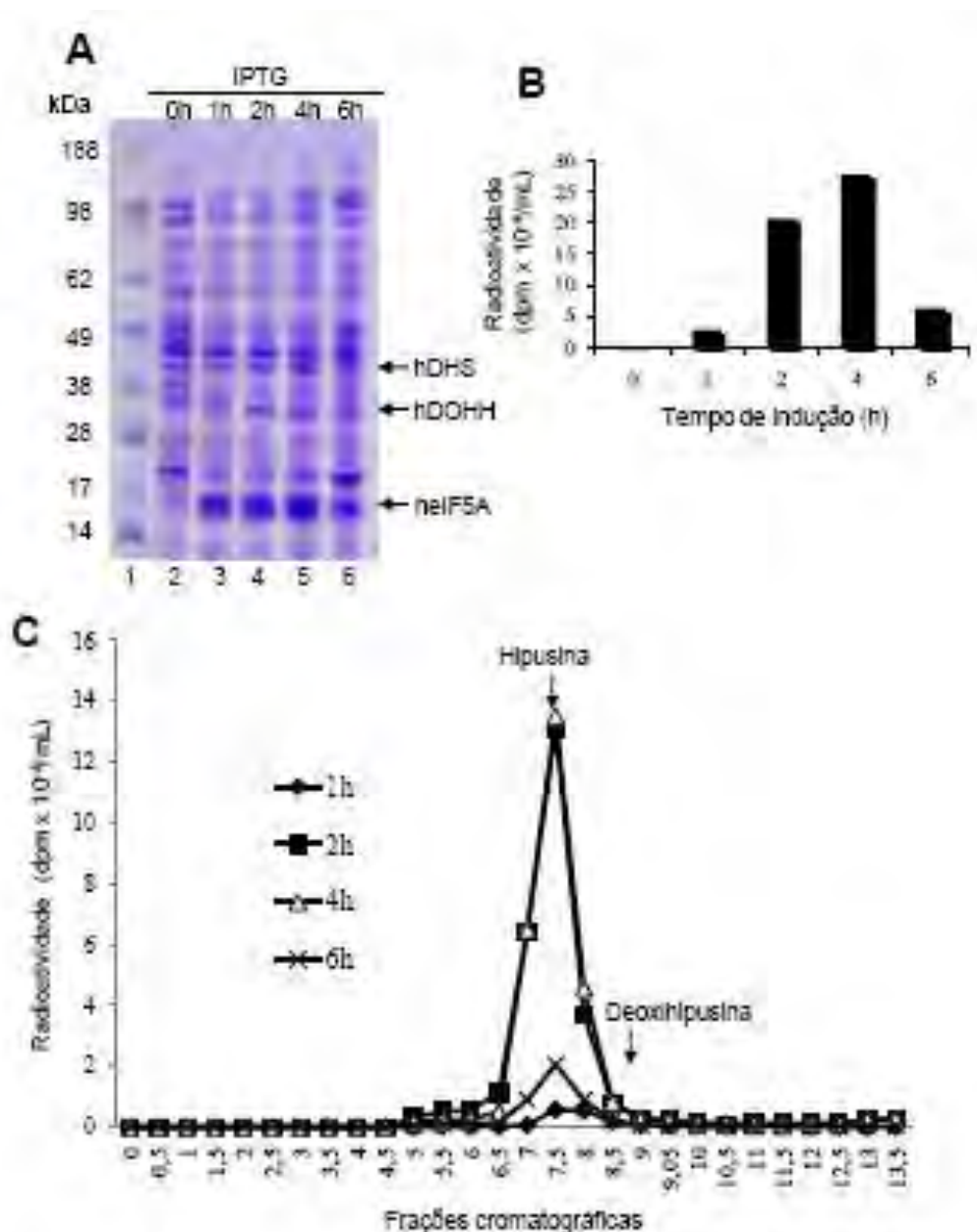


Figura 12. Otimização da expressão e modificação de heIF5A de humano, produzida em *E. coli* BL21(DE3)pLys contendo a construção pST39 heIF5A DHS DOHH. (A) Análise por SDS-PAGE seguido por coloração por Coomassie Blue. A primeira canaleta apresenta o padrão de massa molecular e nas canaletas seguintes a produção da proteína heIF5A-Hpu é verificada antes da indução (canaleta 2) e em 6 horas de indução com IPTG (canaletas 3 à 7). (B) Quantificação da produção de heIF5A-Hpu em relação ao tempo de indução, através do ensaio de hipusinação *in vivo*, no qual a quantidade de heIF5A-Hpu formada é relativa à incorporação de espermidina radioativa (D) Determinação da produção de heIF5A-Hpu em relação ao tempo de indução, através da quantificação do aminoácido ³H-hipusina, por cromatografia de troca iônica seguida de cintilografia.

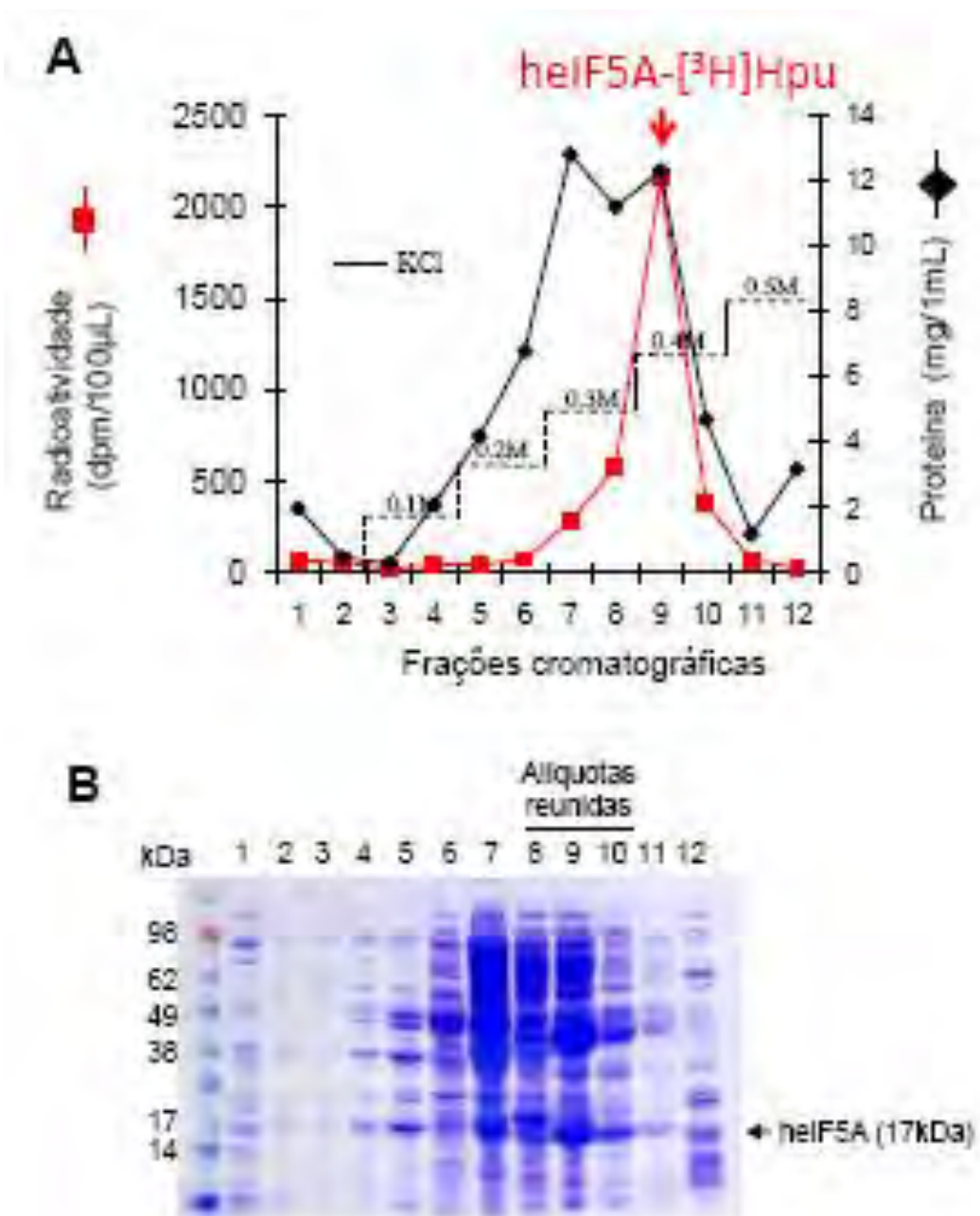


Figura 13. Purificação de helF5A recombinante hipusinada por cromatografia de troca iônica utilizando a coluna DEAE Sephacel. (A) Alíquotas da cromatografia foram analisadas por cintilografia para determinar a concentração de KCl necessária para a eluição de helF5A- ^{3}H Hpu) - marcado em vermelho, e por concentração de proteína a fim de determinar os picos de eluição protéica de acordo com a concentração de KCl – marcado em preto. (B) Análise por SDS-PAGE seguido de coloração por Coomassie Blue. A primeira canaleta apresenta o padrão de massa molecular e as seguintes as frações cromatográficas. A banda com tamanho esperado para helF5A está indicada por uma flecha e as alíquotas reunidas para a próxima cromatografia foram de 8 à 10.

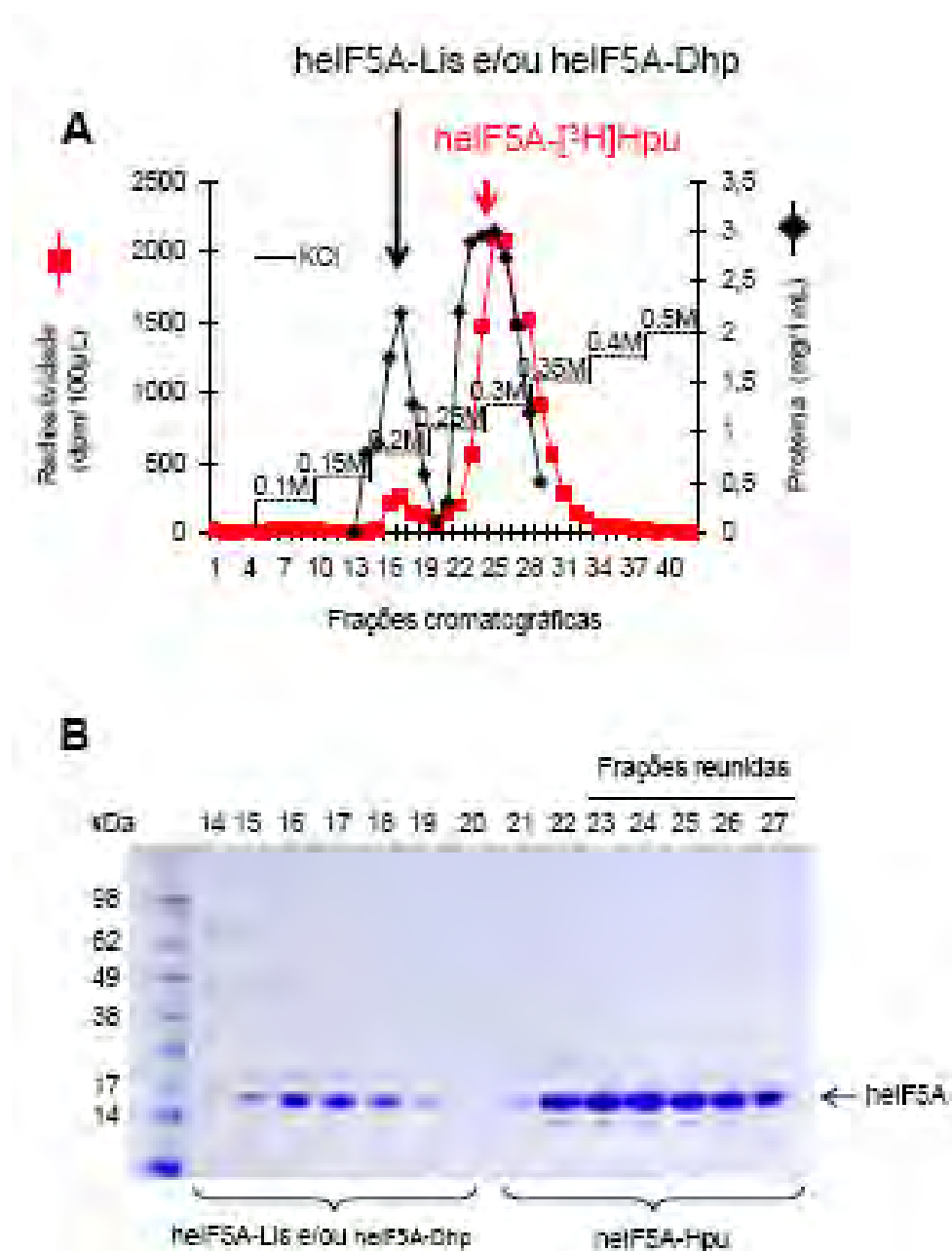


Figura 14. Purificação de hElF5A recombinante hipusinada por cromatografia de troca iônica utilizando a coluna SP-Sepharose. (A) Alíquotas da cromatografia foram analisadas por cintilografia para determinar a concentração de KCl necessária para a eluição de eIF5A-[³H]Dhp e eIF5A-[³H]Hpu - marcado em vermelho, e por concentração de proteína a fim de determinar os picos de eluição protéica de acordo com a concentração de KCl – marcado em preto. (B) Análise por SDS-PAGE seguido de coloração por Coomassie Blue. A primeira canaleta apresenta o padrão de massa molecular e as seguintes as frações cromatográficas. A banda com tamanho esperado para hElF5A está indicada por uma flecha e as alíquotas reunidas para a próxima cromatografia foram de 22 à 27.

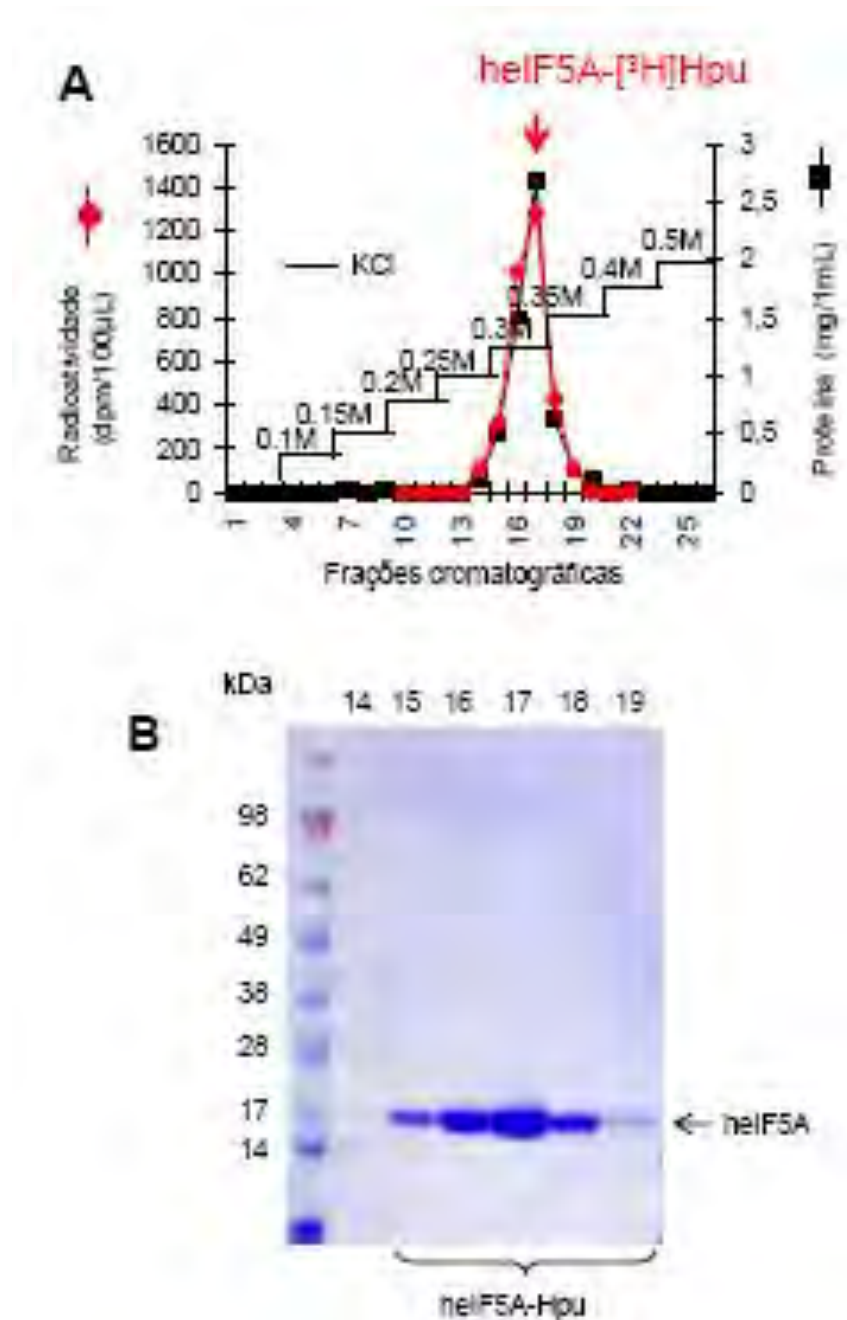


Figura 15. Purificação de heIF5A recombinante hipusinada por cromatografia de troca iônica utilizando a coluna Q-Sepharose. (A) Alíquotas da cromatografia foram analisadas por cintilografia para determinar a concentração de KCl necessária para a eluição de eIF5A- ^3H Hpu - marcado em vermelho, e por concentração de proteína a fim de determinar os picos de eluição protéica de acordo com a concentração de KCl – marcado em preto. (B) Análise por SDS-PAGE seguido de coloração por Coomassie Blue. A primeira canaleta apresenta o padrão de massa molecular e as seguintes as frações cromatográficas. A banda com tamanho esperado para heIF5A está indicada por uma flecha.

4.1.3- Determinação do estado oligomérico de eIF5A de *S. cerevisiae* em solução.

4.1.3.1- Cromatografia de exclusão molecular

Iniciando a análise do estado oligomérico de eIF5A de *S. cerevisiae* em solução, foi realizada cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 75 de 25 mL (G.E. - Healthcare), utilizando a mesma proteína recombinante 6xHis-eIF5A, previamente produzida e purificada de *E.coli* para os ensaios de cristalização (Figura 7). Foram analisadas três concentrações da proteína (10mg/mL, 5mg/mL e 2,5 mg/mL), em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, e as curvas cromatográficas obtidas foram comparadas com a curva padrão das proteínas quimiotripsinogênio A (25 KDa) e ovoalbumina (43 KDa).

O painel A da Figura 16 apresenta o cromatograma obtido com a proteína 6xHis-eIF5A – 10 mg/mL (marcado em vermelho) e com os padrões (marcado em azul). O primeiro pico do cromatograma azul corresponde ao corante Blue Dextran, o qual foi utilizado para colorir a amostra protéica e facilitar sua aplicação no FPLC (G.E. - Healthcare). O pico seguinte representa a proteína ovoalbumina e os três picos finais correspondem a proteína quimiotripsinogênio A. Como a proteína 6xHis-eIF5A não possui nenhum triptofano em sua molécula, seu espectro de absorção a D.O._{280nm} possui valores bastante baixos quando comparados com os valores da curva padrão. Mesmo assim, foi possível verificar que existe um pico de 6xHis-eIF5A localizado na mesma região que o pico correspondente a proteína ovoalbumina (43 KDa) e nenhum pico na região da proteína quimiotripsinogênio A (25 KDa). As amostras referentes a esses picos foram analisadas por SDS-PAGE seguido de coloração por Coomassie Blue para confirmação dos tamanhos protéicos, no caso dos padrões, e da presença de 6xHis-eIF5A (painel B da Figura 16).

A massa molecular apresentada pela proteína 6xHis-eIF5A está de acordo com a massa de duas moléculas de 6xHis-eIF5A, uma vez que já foi determinado que uma molécula de eIF5A possui massa molecular de 18-21 kDa, dependendo da espécie (Park *et al.*, 1997). Esses dados indicam que, nesse tampão, 6xHis-eIF5A recombinante, purificada a partir de *E.coli*, não hipusinada, está presente apenas na forma de dímero. O mesmo resultado foi obtido para as outras concentrações de 6xHis-eIF5A (resultados não mostrados), o que demonstra que o estado oligomérico de 6xHis-eIF5A não depende da sua concentração.

Embora os resultados obtidos com a proteína recombinante estejam de acordo com os resultados já publicados para eIF5A de outros organismos (Chung *et al.*, 1991; Wagner e Klug, 2007), é sabido que podem existir diferenças estruturais entre uma proteína purificada do seu organismo de origem e a mesma proteína recombinante purificada de bactéria, especialmente neste caso em que eIF5A purificada a partir de bactéria não apresenta o aminoácido hipusina, que por sua vez pode influenciar no estado oligomérico da proteína. Dessa maneira, com o objetivo de confirmar o dado obtido anteriormente e ainda determinar se o aminoácido hipusina altera a formação dimérica de eIF5A, as proteínas selvagem (6xHis-eIF5A) e mutada (6xHis-eIF5A^{K51R}), a qual não contém o aminoácido hipusina, foram purificadas de levedura e submetidas a técnica de cromatografia de exclusão molecular.

Para isso, os genes codificadores das proteínas 6xHis-eIF5A e 6xHis-eIF5A^{K51R} foram clonados em vetor pYES2 (Invitrogen), gerando as construções pVZ975 (pYES2-*TIF51A*) e pVZ976 (pYES2-*tif51A*^{K51R}) e, em seguida, os plasmídeos foram inseridos individualmente na levedura SVL55. Depois de produzidas, as proteínas 6xHis-eIF5A e 6xHis-eIF5A^{K51R} foram purificadas por cromatografia de afinidade utilizando coluna NINTA (Qiagen) (resultados não mostrados). As proteínas puras foram submetidas a diálise contra tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,5; NaCl 100 mM, concentradas a 1 mg/mL e submetidas a cromatografia de exclusão molecular. Desta vez foi utilizada a coluna Superdex 200 de 90 mL (G.E. - Healthcare), que nos permite separar moléculas com massa molecular entre 10 e 600 kDa. Essa cromatografia de exclusão molecular foi realizada no Instituto de Física de São Carlos - USP, em colaboração com o Prof. Dr. Richard Charles Garratt.

O painel A da Figura 17 apresenta o cromatograma obtido com os padrões de tamanho molecular ribonuclease A (13,4 kDa), quimiotripsinogênio A (25 kDa), ovoalbumina (43 kDa) e albumina (67 kDa), onde os picos referentes a cada tamanho molecular está indicado com seu respectivo volume de eluição da coluna. Em seguida, foram obtidas as curvas cromatográficas das proteínas 6xHis-eIF5A e 6xHis-eIF5A^{K51R} (painéis B e C da Figura 17), as quais foram comparadas com a curva dos padrões. As amostras referentes a todos os picos foram analisadas por SDS-PAGE seguido de western blot utilizando anticorpo anti-eIF5A, para verificar a presença de eIF5A nos respectivos volumes de eluição. Como apresentado nos painéis B e C da Figura 17, tanto eIF5A como eIF5A^{K51R} são eluídos entre 82 e

87mL, volumes de eluição que correspondem a proteínas de aproximadamente 40 kDa (painel A da Figura 17), indicando que, nesse tampão, eIF5A está presente apenas na forma de dímero e que seu estado de oligomerização é independente do aminoácido hipusina. Uma vez que o aminoácido hipusina não é necessário e também não impede a formação do dímero de eIF5A, esse ensaio sugere que a modificação pós-traducional que eIF5A sofre, essencial para sua atividade em eucarioto, não faz parte da superfície de contato entre as duas moléculas da proteína em solução.

4.1.3.2- Espalhamento de raios-X em baixo ângulo (SAXS – “Small-angle X-ray scattering”)

Para avaliar o raio de giro de eIF5A de *S. cerevisiae* em solução e, por sua vez, confirmar se esta proteína pode apresentar-se como dímero, o presente estudo lançou mão da técnica de espalhamento de raios-x em baixo ângulo (SAXS). Através deste método, informações estruturais de macromoléculas presentes em solução podem ser obtidas e então utilizadas para avaliar o arranjo adquirido pela molécula ou pela composição de duas ou mais estruturas protéicas, no caso da formação de complexos ou oligômeros, por exemplo.

Para isso, alíquota da mesma proteína 6xHis-eIF5A, purificada a partir de levedura e utilizada no ensaio de cromatografia de exclusão molecular, foi dialisada contra tampão Tris-HCl 25mM, pH 7,8, contendo NaCl 20mM, concentrada a 1mg/mL e submetida ao ensaio de SAXS. Esse experimento foi realizado no LNLS pelo Dr. Wanius Garcia, responsável pela coleta, análise e interpretação dos dados.

A partir da transformação Fourier, as funções de distribuição par, a qual fornece informação direta sobre a forma e o tamanho das moléculas em solução, foram calculadas e apresentadas no painel A da Figura 18. Na mesma figura, está apresentado o gráfico Kratky para o espalhamento obtido com a amostra. A partir dos gráficos gerados foi possível determinar o raio de giro da espécie analisada e criar um modelo estrutural para esta proteína. O modelo apresentado no painel B da Figura 18 foi gerado com base na estrutura cristalográfica de 6xHis-eIF5A de *S. cerevisiae* (PDB ID 3ER0).

Analisando as dimensões do envelope protéico obtido (painel B da Figura 18), verifica-se que é impossível existir apenas uma molécula de 6xHis-eIF5A nesta

estrutura. Os resultados indicam claramente que a proteína 6xHis-eIF5A purificada a partir de levedura e, por sua vez, contendo o aminoácido hipusina, está presente no tampão descrito como um dímero, dado que confirma o pico único obtido na cromatografia por exclusão molecular em coluna Superdex 200 (Painel B da Figura 17). Com o objetivo simples de mostrar, visualmente e não por gráficos, que duas moléculas de eIF5A juntas têm tamanho correspondente ao envelope gerado por SAXS, as duas estruturas que compõem a unidade assimétrica do cristal de 6xHis-eIF5A foram alinhadas com o envelope obtido por SAXS (painel B da Figura 18). Isto não significa que as duas moléculas de eIF5A interagem dessa maneira, mesmo porque não existe o aminoácido hipusina na estrutura cristalizada. O alinhamento foi realizado apenas para facilitar a comparação das dimensões do envelope protéico obtido por SAXS e o tamanho correspondente a duas moléculas de 6xHis-eIF5A juntas.

4.1.3.3- Ensaio de crosslinking

Com o objetivo de confirmar que a proteína eIF5A não contendo o aminoácido hipusina é capaz de se oligomerizar, a mesma amostra protéica utilizada anteriormente nos ensaios de cristalização (6xHis-eIF5A produzida em *E. coli*.) foi submetida ao tratamento com dissuccinato de etileno glicol (EGS), substância capaz de ligar covalentemente moléculas de proteínas na região de contato. Também foi verificado se o estado oligomérico de eIF5A se mantém na presença do agente redutor DTT. Em seguida, o resultado foi analisado por SDS-PAGE e está apresentado na Figura 19.

As canaletas 2 a 4 contêm a proteína 6xHis-eIF5A não tratada, tratada com EGS e tratada com EGS na presença de DTT, respectivamente. Pode-se observar que nas canaletas 2 e 4 aparece apenas uma banda na altura de aproximadamente 20kDa, tamanho próximo ao esperado para monômeros de 6xHis-eIF5A (18-20kDa) ou oligômeros desnaturados pelo SDS. Por outro lado, a canaleta 3 apresenta várias bandas, uma de aproximadamente 20kDa, outra de 40 kDa e outras maiores e em menor intensidade, o que demonstra que 6xHis-eIF5A apresenta-se como monômero, dímero e até mesmo como oligômeros com mais de duas moléculas da proteína ou aglomerados devido a precipitação protéica. Outros trabalhos também mostram eIF5A como aglomerados protéicos (Chung *et al.*, 1991; Jao e Chen, 2006;

Gentz *et al.*, 2008).

Por esse experimento, em que são mostrados mais de um tamanho para a proteína após o tratamento com EGS, não é possível afirmar se 6xHis-eIF5A apresenta-se em solução como uma única forma oligomérica (dímero) ou como uma mistura (dímero, monômero ou aglomerados), uma vez que a existência de mais de uma banda pode ser decorrente da não otimização da condição de formação de ligações covalentes entre apenas duas moléculas de eIF5A através do agente químico EGS. No entanto, fica claro que a falta do aminoácido hipusina não impede eIF5A de interagir com outra molécula. Como controle desse experimentos foi utilizada a proteína desoxihipusina sintase de humano (canaletas 5 a 7) que, conhecidamente, forma dímero e tetrâmero na presença de EGS, os quais são desfeitos na presença do agente redutor DTT. Esta proteína DHS de humano já existia previamente purificada no laboratório. Esse experimento também foi realizado durante meu Doutorado Sanduíche (Agosto 2008 – Janeiro 2009).

4.1.3.4- Ensaio de copurificação

Com o objetivo de verificar se a proteína eIF5A também se apresenta como oligômero no extrato celular e não apenas completamente purificada, foi realizado o ensaio de copurificação entre GST-eIF5A e eIF5A, bem como entre GST-eIF5A^{K51R} e eIF5A^{K51R}. Para isso, inicialmente a linhagem SVL731, contendo o gene codificador de eIF5A selvagem em fusão com proteína A (ProtA-eIF5A), foi transformada com as construções plasmidiais pSV36 e pSV146, as quais codificam as proteínas GST-eIF5A e eIF5A respectivamente, ou com pSV40 e pSV39, as quais na mesma ordem, codificam as proteínas GST-eIF5A^{K51R} e eIF5A^{K51R}. Em seguida, a expressão das proteínas em fusão com GST foi induzida por galactose e essas linhagens foram submetidas ao ensaio de copurificação, apresentado na Figura 20. Este ensaio foi realizado na presença e ausência de RNase e EDTA, com o propósito de investigar se RNA mensageiro e/ou ribossomo inteiro (80S) são necessários para a formação oligomérica de eIF5A no extrato celular. Como controle negativo do ensaio de copurificação, foi utilizada a mesma levedura transformada com pSV20 (GST) e pSV146 (eIF5A).

Na Figura 20, observa-se claramente no controle negativo que a proteína GST sozinha não é capaz de interagir com eIF5A. Por outro lado, pode-se verificar que as

proteínas eIF5A é copurificada por GST-eIF5A e eIF5A^{K51R} é copurificada por GST-eIF5A^{K51R}, resultado que demonstra que eIF5A forma oligômeros no extrato protéico, independentemente da presença do aminoácido hipusina, comprovando os dados anteriormente obtidos neste trabalho. Da mesma forma como ocorre no ensaios de crosslinking, não é possível determinar por copurificação qual a forma oligomérica assumida por eIF5A (dímero ou oligômeros maiores), no entanto, este resultado oferece suporte adicional à idéia de que eIF5A oligomeriza-se *in vivo*.

De modo interessante, GST-eIF5A não copurifica eIF5A na presença de RNase, o que sugere que a formação oligomérica de eIF5A *in vivo* seja dependente de RNA mensageiro. Por outro lado, a presença de EDTA, reagente que provoca o desacoplamento das subunidades ribossomais 40S e 60S, não desfez a interação entre GST-eIF5A e eIF5A, o que indica que o estado oligômero de eIF5A não depende do ribossomo como um todo.

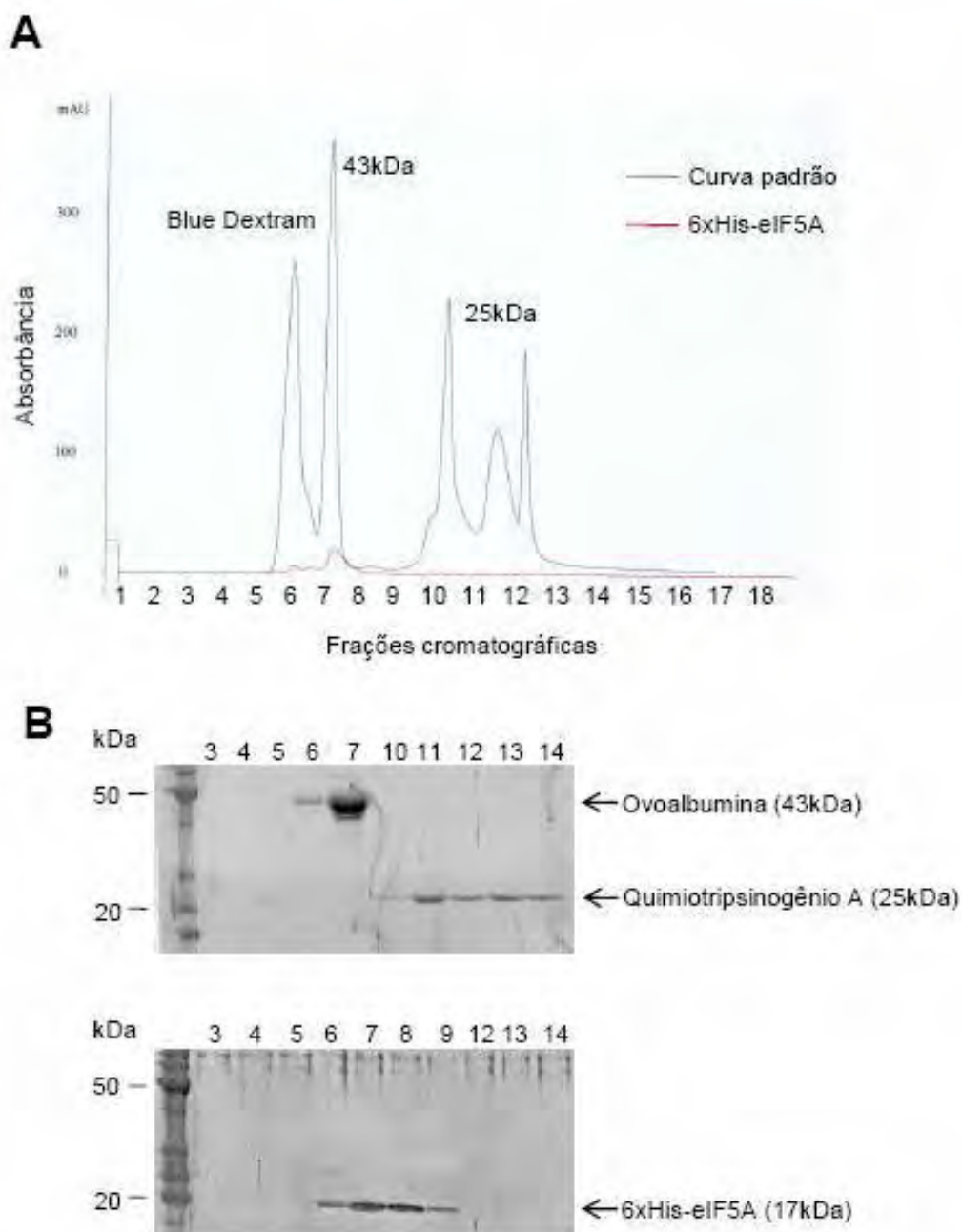


Figura 16. Análise do estado oligomérico de eIF5A de levedura em solução, purificada a partir da bactéria, por cromatografia de exclusão molecular. (A) Curva cromatográfica obtida com a proteína His-eIF5A (indicada em vermelho) e com os padrões de massa molecular quimiotripsinogênio A (25Kda, representada aqui por 3 picos devido a degradação) e ovoalbumina (43KDa) (indicada em azul). **(B)** SDS-PAGE após coloração com Coomassie Blue relativo as alíquotas obtidas da cromatografia apresentada acima. As primeiras canaletas contêm o padrão de massa molecular (Invitrogen). As proteínas His-eIF5A, quimiotripsinogênio e ovoalbumina estão indicadas por setas.

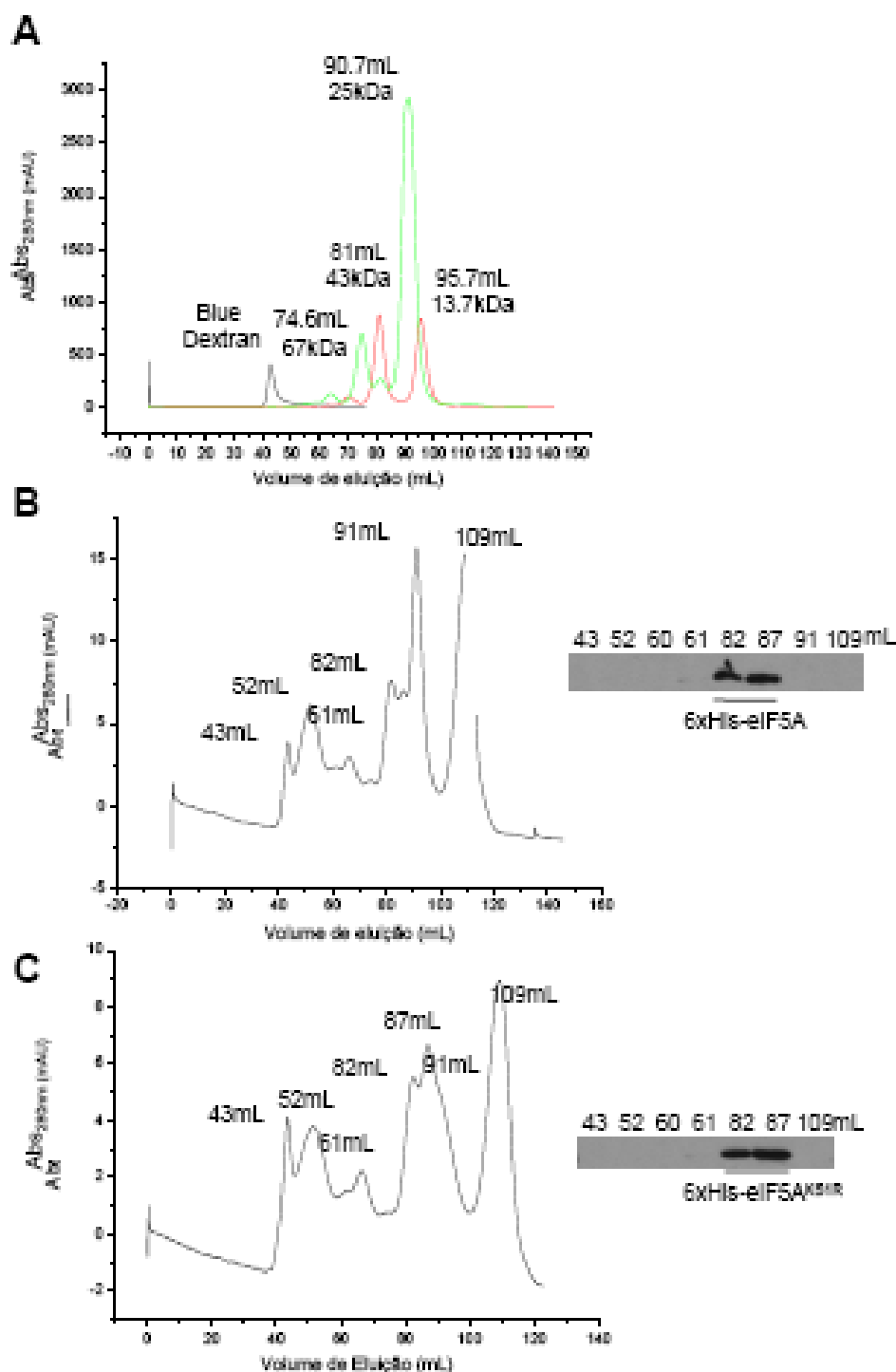
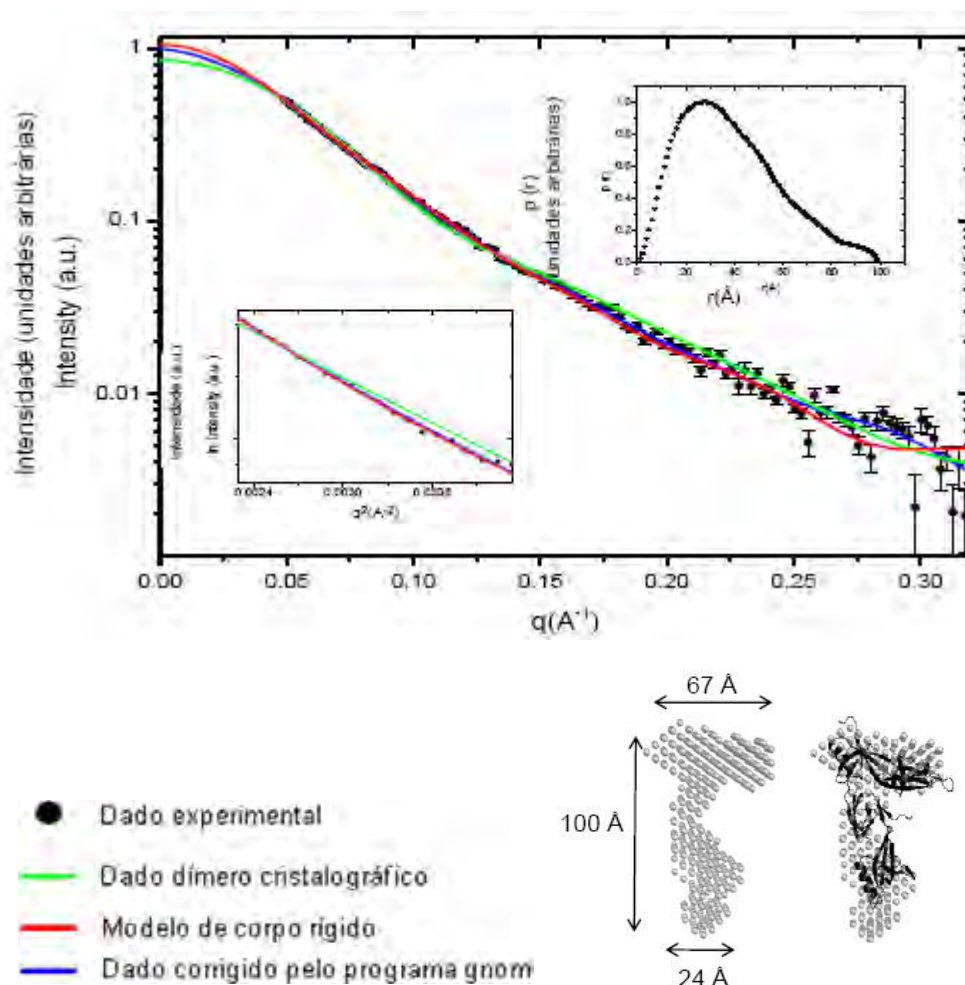


Figura 17. Análise do estado oligomérico de eIF5A em solução, purificada a partir da levedura *S. cerevisiae*, por cromatografia de exclusão molecular. (A) Curva cromatográfica obtida com os padrões de massa molecular Blue Dextran, ribonuclease A (13,4kDa), quimiotripsinogênio A (25KDa), ovoalbumina (43KDa) e albumina (67kDa). Cromatograma e western blot das frações obtidas contendo as proteínas 6xHis–eIF5A **(B)** e 6xHis–eIF5A^{K51R} **(C)**, o volume no qual as proteínas foram eluídas está indicado pela barra horizontal.



Parâmetros	Dado experimental	Dímero Cristalográfico	Modelo de corpo rígido
Dmax (Å)	100.0 +/- 10.0	92.6	111.5
Rg (Å)	30.6 +/- 0.2	25.2	30.0
Discrepância x	-	4.5	2.1
Resolução (nm)	19.43		

Figura 18. Análise do estado oligomérico de 6xHis-eIF5A em solução, purificada a partir da levedura *S. cerevisiae*, por Espalhamento de raios-X em baixo ângulo (SAXS – “Small-angle X-ray scattering). (A) Funções de distribuição par de distância, obtidas a partir da transformação Fourier e gráficos de Kratky e Guinier para o espalhamento obtido com a amostra protéica. (B) Reconstrução tridimensional da proteína 6xHis-yelF5A a partir das medidas obtidas por SAXS. O arranjo existente na célula unitária do cristal de 6xHis-yelF5A PDB (ID-3ER0) foi alinhado com o envelope dessa proteína obtida por SAXS através do programa subcomp.

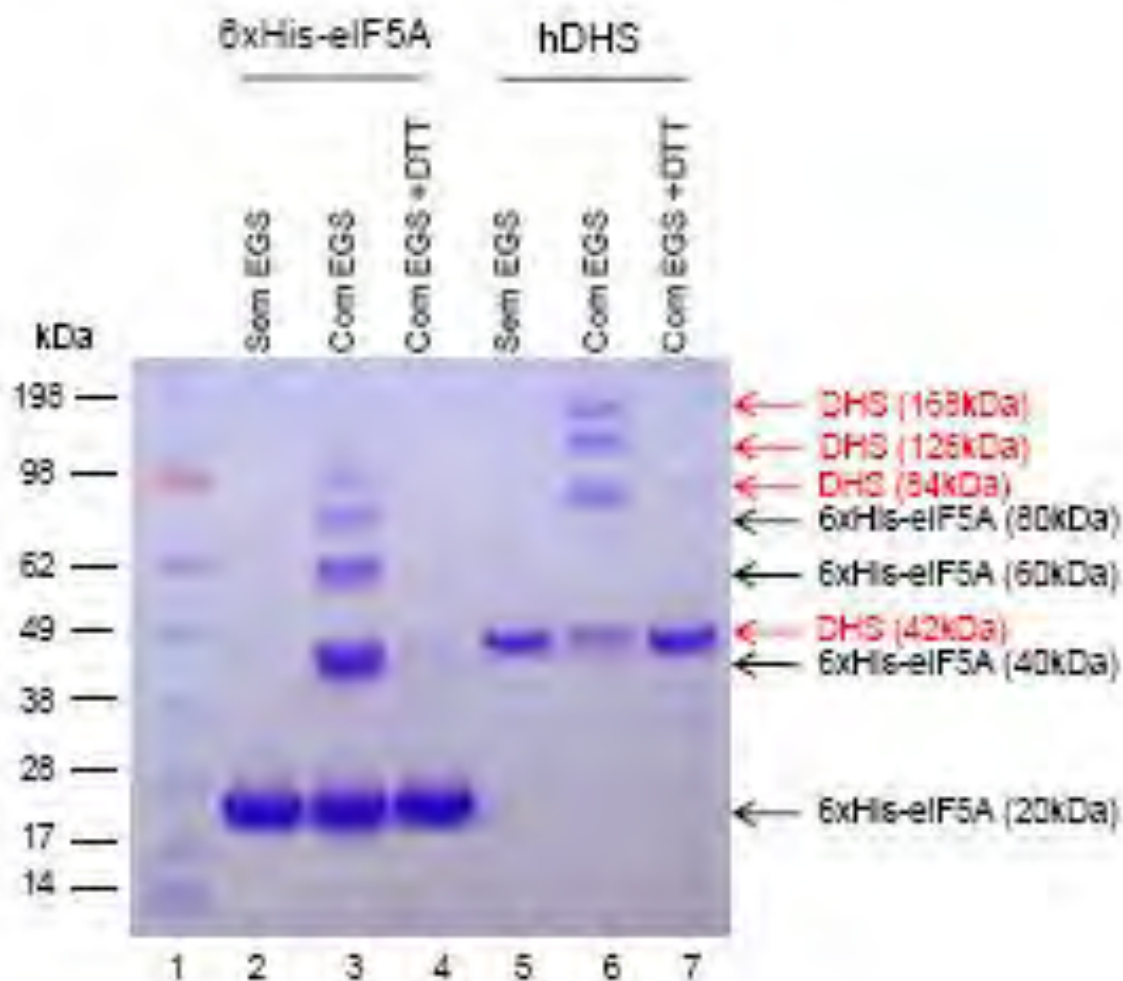


Figura 19. Análise do estado oligomérico de 6xHis-eIF5A em solução, purificada a partir de bactéria, por crosslinking. SDS-PAGE seguido de coloração por Coomassie Blue da proteína 6xHis-eIF5A antes (canaleta 2) e após o tratamento com EGS e EGS mais DTT (canaletas 3 e 4, respectivamente). As setas pretas indicam os tamanhos moleculares assumidos por 6xHis-eIF5A. Como controle, a proteína DHS de humano também foi submetida ao ensaio e está indicada por setas vermelhas. A canaleta 1 apresenta o padrão de tamanho molecular (Invitrogen).

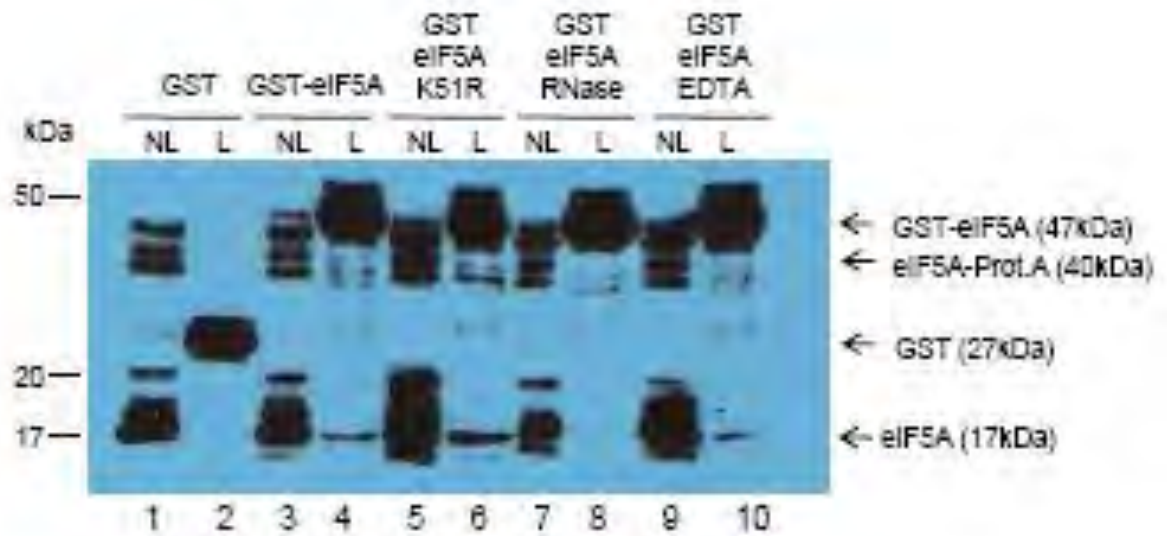


Figura 20. Análise do estado oligomérico de 6xHis-eIF5A por copurificação. Copurificação entre GST-eIF5A e eIF5A, bem como entre GST-eIF5A^{K51R} e eIF5A^{K51R}, seguido de SDS-PAGE e western blot. NL e L correspondem as amostras não ligadas e ligadas a resina de glutationa, respectivamente. Foi utilizado anti-eIF5A, o qual reconhece eIF5A e GST. As setas indicam as proteínas reveladas, com seus respectivos tamanhos moleculares.

4.2- Obtenção de novos mutantes de eIF5A

Consideráveis avanços no estudo de eIF5A foram conseguidos com a utilização de mutantes condicionais dessa proteína, notadamente em relação aos resultados obtidos em nosso laboratório com o isolamento de supressores de *tif51A-1* (Valentini *et al.*, 2002; Zanelli e Valentini *et al.*, 2005), o envolvimento de eIF5A com a maquinaria traducional (Zanelli *et al.*, 2006; Gregio *et al.*, 2009) e o rastreamento por letalidade sintética utilizando o alelo *tif51A-3* (Frigieri *et al.*, 2007). Dessa maneira, com o objetivo de mapear regiões estruturais importantes para a atividade da proteína eIF5A, três diferentes técnicas foram utilizadas para gerar mutantes dessa proteína de levedura: Mutagênese química, PCR mutagênica e mutação sítio-dirigida. A obtenção dos novos mutantes de eIF5A foi realizada com a colaboração da bolsista de Iniciação Científica Suzana M. Rangel.

4.2.1- Mutagênese química

Recentemente, o alelo *tif51A-3* (*tif51A*^{C39Y/G118D}) de eIF5A foi utilizado em um rastreamento por letalidade sintética realizado em nosso laboratório (Frigieri *et al.*, 2007). Neste rastreamento, mutações pontuais aleatórias foram geradas utilizando o agente químico etilmetanossulfonato (EMS) e buscou-se genes mutados que, em associação exclusiva com o alelo mutado *tif51A-3*, e só nesta situação, inviabilizam a sobrevivência celular. O estudo dos mutantes extragênicos revelou um alelo mutante do gene *YPT1* (*ypt1*-G80D) como sinteticamente letal com *tif51A-3* (Frigieri *et al.*, 2007).

Durante o rastreamento, também foram geradas mutações intragênicas no alelo *tif51A-3* que resultaram no nocauteamento deste alelo e consequentemente na inviabilidade celular, visto que *TIF51A* é essencial. Nove mutantes intragênicos do alelo *tif51A-3* foram gerados e descartados do rastreamento de letalidade sintética por não se tratar exatamente de uma interação genética. No entanto, esses mutantes foram objetos de estudo deste trabalho pois a identificação e a caracterização fenotípica das mutações que nocautearam o alelo *tif51A-3* podem revelar aminoácidos importantes para a estrutura e a função da proteína eIF5A.

A fim de identificar estas mutações intragênicas, o alelo mutado *tif51A-3** foi amplificado por PCR à partir do DNA genômico dos nove mutantes e sequenciado utilizando os oligonucleotídeos SVO49 e SVO50. Além de apresentarem os dois aminoácidos trocados do alelo mutante *tif51A-3* (*tif51A*^{C39Y/G118D}), os nove mutantes estudados revelaram um terceiro aminoácido trocado, que estão listados na Tabela 5. O mecanismo de ação do agente

mutagênico EMS envolve a adição de um grupo etil à guanina, a qual passa a fazer duas pontes de hidrogênio e assim se pareia com timina no lugar da citosina. Como o esperado, todos os alelos estudados apresentaram esse tipo de mutação (Tabela 5).

Coincidentemente, a mutação P83L presente em um dos alelos estudados corresponde a mesma mutação observada no alelo *tif51A-2* já descrito por nosso laboratório (Valentini *et al.*, 2002). O fato de as três mutações juntas (C39Y, P83L e G118D) tornarem a levedura inviável reforça a importância desses aminoácidos na estrutura de eIF5A.

Com o propósito de avaliar o fenótipo gerado pelas mutações individualizadas, foram realizados experimentos de separação das mutações dos alelos *tif51A-3** nocauteados, presentes nos mutantes SVL518 (*tif51A*^{C39Y/G118D/S140F}), SVL519 (*tif51A*^{C39Y/T66I/G118D}), SVL520 (*tif51A*^{C39Y/P116L/G118D}), SVL521 (*tif51A*^{C39Y/G50D/G118D}), SVL522 (*tif51A*^{C39Y/G53D/G118D}) e SVL523 (*tif51A*^{C39Y/G118D/M142I}). Quando possível, a separação destas mutações foi realizada através de subclonagens de fragmentos de DNA. Primeiramente, os alelos selvagem e nocauteados de *TIF51A* foram amplificados por PCR utilizando os oligonucleotídeos SVO58/SVO59 e DNA genômico das leveduras SVL55, SVL518, SVL519, SVL520, SVL521, SVL522 e SVL523. Em seguida, o alelo selvagem foi clonado no sítio *Bam*HI do vetor pUC18 (pSV303) dando origem à construção plasmidial pUC18-*TIF51A* (pSV305). Após digestão da construção pSV305 e dos produtos de PCR contendo os alelos mutados de *tif51A-3** com enzimas de restrição específicas, as quais apresentam sítios apenas na ORF de *TIF51A*, mas não no vetor pUC18 (pSV303), um fragmento do alelo selvagem foi substituído pelo mesmo fragmento do gene mutado (“swap”). Dessa maneira foram obtidas as construções plasmidiais pSV617 (pUC18-*tif51A*^{T66I/G118D}), pSV618 (pUC18-*tif51A*^{G118D/M142I}), pSV619 (pUC18-*tif51A*^{G118D/S140F}), pSV620 (pUC18-*tif51A*^{M142I}), pSV621 (pUC18-*tif51A*^{S140F}), pSV766 (pUC18-*tif51A*^{T66I}), pSV768 (pUC18-*tif51A*^{C39Y/G50D}), pSV770 (pUC18-*tif51A*^{G50D}), pSV772 (pUC18-*tif51A*^{C39Y/G53D}), pSV774 (pUC18-*tif51A*^{G53D}) e pSV777 (pUC18-*tif51A*^{P116L/G118D}) as quais foram checadas por sequenciamento de DNA utilizando os oligonucleotídeos SVO49 e SVO50.

Esses novos alelos foram então subclonados em um vetor *LEU2/CEN* (pRS315 - pSV59), utilizando a enzima *Bam*HI. As subclonagens deram origem às construções pSV622 (pRS315-*tif51A*^{T66I/G118D}), pSV623 (pRS315-*tif51A*^{G118D/M142I}), pSV624 (pRS315-*tif51A*^{G118D/S140F}), pSV625 (pRS315-*tif51A*^{M142I}), pSV626 (pRS315-*tif51A*^{S140F}), pSV767 (pRS315-*tif51A*^{T66I}), pSV769 (pRS315-*tif51A*^{C39Y/G50D}), pSV771 (pRS315-*tif51A*^{G50D}), pSV773 (pRS315-*tif51A*^{C39Y/G53D}), pSV775 (pRS315-*tif51A*^{G53D}) e pSV778 (pRS315-*tif51A*^{P116L/G118D}). Estas subclonagens de separação das mutações não puderam ser feitas diretamente em

pRS315 (pSV59), pois os sítios das enzimas de restrição utilizadas também estão presentes nesse vetor.

As duas mutações do alelo 3 de *TIF51A* (*tif51A*^{C39Y/G118D}) também foram separadas. No entanto, a separação pôde ser realizada diretamente a partir da construção contendo o alelo *tif51A-3* no vetor pRS315 (pSV140), utilizando a enzima *SaI* que possui um sítio dentro da ORF de *TIF51A* e outro no vetor. Essas mutações já haviam sido isoladas no passado (Valentini *et al.*, 2002), entretanto, os plasmídeos foram perdidos. Essas subclonagens deram origem às construções plasmidiais pSV615 (pRS315-*tif51A*^{C39Y}) e pSV616 (pRS315-*tif51A*^{G118D}).

4.2.2- PCR mutagênica

O gene que codifica eIF5A (*TIF51A*) foi usado como molde para PCR mutagênica utilizando os oligonucleotídeos SVO51 e SVO52, gradiente de concentrações de desoxirribonucleotídeos, 7 mM de MgCl₂ e 0,5 mM de MnCl₂. Após amplificação e quantificação, foi realizada transformação de alta eficiência da levedura nocaute coberta com gene selvagem de eIF5A (SVL132), com o produto de PCR mutagênica e o plasmídeo *TRP1/CEN* pRS314-*TIF51A* (pSV501), anteriormente linearizado com *SaI*, para promover a recombinação homóloga.

Os volumes totais das transformações foram plaqueados em 40 placas SC -*Trp*. Os clones obtidos foram replicados, com a utilização de veludo estéril, em 5-FOA e incubados diretamente a 37°C. Isso foi feito devido ao aparecimento de um grande número de colônias por placa na etapa de transformação, o que impossibilitava a distinção dos clones após várias réplicas. Foram rastreados 1,0x10³ clones, entre os quais foram obtidos 7 suspeitos. Os clones suspeitos foram cultivados, a partir da placa SC -*Trp* a 25°C, em meio contendo 5-FOA, para que ocorresse a troca de plasmídeos, e 3 cobriram o nocaute de *TIF51A*.

Os 3 clones que cobriram o nocaute de *TIF51A* tiveram então seus plasmídeos extraídos da levedura e, a seguir, introduzidos em *E. coli* através de eletroporação. Depois de crescidas as colônias bacterianas, foi feita a extração plasmidial de bactéria. A partir desse DNA foi realizada reação de sequenciamento do plasmídeo mutado utilizando os oligonucleotídeos SVO49 e SVO50, sendo possível identificar as mudanças dos resíduos de aminoácido de eIF5A codificada por cada clone, são elas: pSV708 (pRS314-*tif51A*^{Q22H/L93F}), pSV710 (pRS314-*tif51A*^{N29K/M44I/P83S}) e pSV711 (pRS314-*tif51A*^{G14D/V57D}).

Com o mesmo propósito de determinar resíduos de aminoácidos importantes para a

manutenção da estrutura e atividade da proteína eIF5A, as mutações dos diferentes alelos gerados foram isoladas, quando possível, por subclonagens. Sendo assim, o plasmídeo pSV708 (pRS314-*tif51A*^{Q22H/L93F}), foi digerido com as enzimas *Sall* e *HpaI*, gerando um fragmento onde estava contido somente a mutação L93F. Esse fragmento foi ligado ao pRS314-*TIF51A* (pSV501), previamente digerido com as mesmas enzimas e, através desta troca foi obtido um plasmídeo contendo somente a mutação L93F (pSV712-pRS314-*tif51A*^{L93F}). Concomitantemente, o plasmídeo restante do pSV708 (pRS314-*tif51A*^{Q22H/L93F}) contendo a mutação Q22H, foi ligado ao fragmento de 357 pb gerado pela digestão com *HpaI* e *Sall* do pRS314-*TIF51A* (pSV501), gerando a construção pSV713 (pRS314-*tif51A*^{Q22H}).

As mutações do pSV710 (pRS314-*tif51A*^{N29K/M44I/P83S}) foram isoladas digerindo o plasmídeo com as enzimas *Sall* e *HpaI*, gerando um fragmento que possui as mutações M44I e P83S. Esse fragmento foi ligado ao plasmídeo pRS314-*TIF51A* (pSV501) previamente digerido com *Sall* e *HpaI* e, através disso, foi conseguida uma construção plasmidial contendo apenas estas mutações (pSV781-pRS314-*tif51A*^{M44I/P83S}). Ao mesmo tempo, o plasmídeo restante do pSV710 (pRS314-*tif51A*^{N29K/M44I/P83S}), contendo somente a mutação N29K, foi ligado ao fragmento gerado pela digestão com *HpaI* e *Sall* do pRS314-*TIF51A* (pSV501), gerando a construção pSV782 (pRS314-*tif51A*^{N29K}). Para separar as mutações M44I e P83S, foi necessária a subclonagem do alelo selvagem e do mutante *tif51A*^{M44I/P83S}, no vetor pUC18, pois a ausência de sítios de restrição no cassete de clonagem do pSV781 (pRS314-*tif51A*^{M44I/P83S}) não permitia a separação destas mutações. Assim, utilizando a enzima *Bam*HI, o fragmento de 1,1Kb foi retirado do plasmídeo pSV781 (pRS314-*tif51A*^{M44I/P83S}) e ligado ao pUC18 (pSV303) previamente linearizado com *Bam*HI, gerando então pSV780 (pUC18-*tif51A*^{M44I/P83S}). A seguir, o pSV780 (pUC18-*tif51A*^{M44I/P83S}) foi digerido com as enzimas *Eco*RV e *Eco*RI e o fragmento produzido contendo a mutação M44I foi ligado ao pUC18-*TIF51A* (pSV305) previamente digerido com as mesmas enzimas e, deste modo, foi conseguido um plasmídeo contendo somente a mutação M44I (pSV794-pUC18-*tif51A*^{M44I}). Porém, foi necessário trazer este alelo para uma construção plasmidial que permite a sua expressão em levedura. Deste modo, foi feita outra subclonagem utilizando *Bam*HI, gerando um fragmento de 1,1Kb do plasmídeo pSV794 (pUC18-*tif51A*^{M44I}), que foi ligado ao vetor *LEU2/CEN* pRS315 (pSV59) previamente linearizado com esta mesma enzima. Com isso, foi obtida a mutação M44I no plasmídeo *LEU2* (pSV793-pRS315-*tif51A*^{M44I}). Finalmente, a mutação P83S isolada já existia no laboratório, pois corresponde ao alelo *tif51A-1* (Valentini *et al.*, 2002).

O isolamento das mutações presentes no plasmídeo pSV711 (pRS314-*tif51A*^{G14D/V57D}) foi feito utilizando a mesma estratégia usada para separar as mutações do pSV708 (pRS314-*tif51A*^{Q22H/L93F}). Dessa maneira, foram obtidos os plasmídeos pSV783 (pRS314-*tif51A*^{G14D}) e pSV784 (pRS314-*tif51A*^{V57D}).

4.2.3- Mutação Sítio-dirigida

A estrutura terciária de eIF5A é formada basicamente por estruturas β e “ao acaso”, como pode ser observado na estrutura cristalográfica de eIF5A de *S. cerevisiae* (Figura 8). Essas estruturas aleatórias que conectam as estruturas β são chamadas de alças, as quais podem ser importantes pontos de interação física entre proteínas e outros fatores celulares, uma vez que essas sequências de resíduos geralmente não têm importância para estabilização da estrutura secundária e encontram-se na superfície da proteína. Como dito anteriormente, eIF5A sofre uma modificação pós-traducional exclusiva e de extrema importância para a viabilidade da célula, que consiste na hipusinação da lisina 51, presente na alça localizada entre o resíduo treonina 46 até a lisina 56 da sua estrutura (Figuras 4 e 8). Assim, foram geradas mutações pontuais em resíduos específicos presentes na alça onde ocorre a hipusinação de eIF5A, uma região de total conservação entre as espécies, como pode ser verificado no alinhamento múltiplo apresentado na Figura 3.

Essas modificações foram obtidas pelo método de mutação sítio-dirigida, utilizando o kit “QuickChange” – Stratagene e o plasmídeo *LEU2* contendo o gene codificador de eIF5A selvagem pRS315-*TIF51A* (pSV146). Os oligonucleotídeos foram devidamente desenhados para que fossem introduzidas as mutações pontuais em eIF5A, como mostrado na Tabela 5. Os oligos SVO218/SVO219 geraram o mutante H52A (pSV732-pRS315-*tif51A*^{H52A}), SVO387/SVO388 produziram o mutante H52D (pSV785-pRS315-*tif51A*^{H52D}), SVO220/SVO221 formaram G53A (pSV731-pRS315-*tif51A*^{G53A}), SVO216/SVO217 originaram G50A (pSV733-pRS315-*tif51A*^{G50A}) e SVO214/SVO215 produziram a modificação K56A (pSV734-pRS315-*tif51A*^{K56A}), SVO393/SVO394 geraram K56D (pSV787-pRS315-*tif51A*^{K56D}) e SVO395/SVO396 originaram H54D (pSV786-pRS315-*tif51A*^{H54D}). Todas estas mutações foram checadas por sequenciamento, utilizando os oligonucleotídeos SVO49 e SVO50.

Também foram obtidos mutantes com modificações nas estruturas α -hélice da molécula de eIF5A (Figura 8). Os oligonucleotídeos SVO405 e SVO406 foram utilizados para

gerar a mutação S24P (pSV843-pRS315-*tif51A*^{S24P}), localizada na pequena α -hélice do N-terminal de eIF5A (Figura 8). Os oligos SVO425 e SVO426 originaram as três mutações G118V, L120N e L124D (pSV845-pRS315-*tif51A*^{G118V/L120N/L124D}), localizadas na α -hélice do C-terminal (Figura 8) e os oligos SVO427 e SVO428 geraram a mutação dupla G118V e D122W (pSV844-pRS315-*tif51A*^{G118V/D122W}), também localizadas na α -hélice do C-terminal. Os oligonucleotídeos SVO389 e SVO390 foram utilizados para inserir um stop códon no C-terminal de eIF5A, deletando completamente a α -hélice dessa região (pSV842-pRS315-*tif51A*^{P116stop}).

Além das mutações dos resíduos das α -hélices, foi feita também a modificação no gene de eIF5A para que houvesse a deleção dos 10 aminoácidos iniciais de eIF5A. Esta modificação também foi realizada para análise da importância desses resíduos em eucariotos, uma vez que esses aminoácidos não existem nas proteínas eIF5A de arqueas. Essa deleção foi gerada primeiramente, retirando a metionina inicial de eIF5A, que foi substituída por uma leucina, gerando o mutante M1L (pSV735-pRS314-*tif51A*^{M1L}) através da utilização dos oligonucleotídeos SVO210 e SVO211. Esse alelo leva à deleção dos 20 aminoácidos iniciais de eIF5A ($\Delta 20$), uma vez que a segunda metionina, na mesma janela de leitura, é no resíduo 21 da proteína. A seguir, o mutante M1L foi usado como DNA molde para a geração da deleção dos 10 aminoácidos ($\Delta 10$), a qual foi realizada através da introdução de um resíduo de metionina em substituição à treonina 10. A mutação T10M (pSV736-pRS314-*tif51A*^{T10M}), foi realizada através da utilização dos primers SVO212 e SVO213.

Dessa maneira, foram gerados 40 mutantes novos de eIF5A, dos quais 18 tiveram origem por mutagenese química, 10 foram gerados por PCR mutagênica e 12 foram obtidos por mutação sítio-dirigida. Na Tabela 6 estão listados todos os mutantes de eIF5A desenvolvidos nesse trabalho, bem como todos os já existentes na literatura. A Figura 21 apresenta a localização de alguns dos resíduos mutados no modelo da estrutura tridimensional de eIF5A de *S. cerevisiae* (PMDB PM0075091).

Tabela 5. Relação das mutações intragênicas geradas no alelo *tif51A-3*, durante o rastreamento de letalidade sintética.

MUTANTE INTRAGÊNICO	CÓDON ALTERADO	AMINOÁCIDO TROCADO
# 1 (51)	ACT → ATT	T66I
# 2 (83)	CCA → CTA	P83L
# 3 (88)	TCC → TTC	S140F
# 4 (345)	ACT → ATT	T66I
# 5 (360)	ACT → ATT	T66I
# 6 (385)	CCA → CTA	P116L
# 7 (413)	GGT → GAT	G50D
# 8 (440)	GGT → GAT	G53D
# 9 (447)	ATG → ATA	M142D

Tabela 6. Resumo dos resíduos de aminoácidos alterados existentes nos mutantes de eIF5A e seus respectivos fenótipos.

Origem	Mutação	Fenótipo de crescimento ^{a,b}	Expressão da proteína eIF5A ^c	Níveis da proteína eIF5A na temperatura não permissiva ^c
<i>tif51A</i>	—	tr	Sim	++++
<i>tif51A</i> (K51R) (Schnier <i>et al.</i> , 1991)	K51R	Inviável	Sim	ND
<i>ts1159</i> (Zuk <i>et al.</i> , 1998)	S149P	ts 34°C	Sim	+
<i>tif51A-1</i> (Valentini <i>et al.</i> , 2002)	P83S	ts 36°C	Sim	+
<i>tif51A-2</i> (Valentini <i>et al.</i> , 2002)	P83L	ts 37°C	Sim	+++
<i>tif51A-3</i> (Valentini <i>et al.</i> , 2002)	C39Y/G118D	ts 36°C	Sim	++
	C39Y	ts 38°C	Sim	+++
	G118D	tr	Sim	ND
<i>tif51A</i> (L102A) (Chatterjee <i>et al.</i> , 2006)	L102A	ts 37°C	Sim	ND
<i>tif51A</i> (D63V) (Saini <i>et al.</i> , 2009)	D63V	ts 37°C	Sim	ND
Mutagênese química	C39Y/P83L/G118D	Inviável	ND	ND
Mutagênese química	C39Y/T66I/G118D	Inviável	ND	ND
	T66I/G118D	ts 37°C	Sim	+++
	T66I	ts 38°C	ND	+++
Mutagênese química	C39Y/G118D/S140F	Inviável	ND	ND
	G118D/S140F	ts 38°C	Sim	+
	S140F	tr	Sim	ND
Mutagênese química	C39Y/G118D/M142I	Inviável	ND	ND
	G118D/M142I	ts 38°C	Sim	++
	M142I	tr	Sim	ND
Mutagênese química	C39Y/P116L/G118D	Inviável	ND	ND
	P116L/G118D	ts 38°C	Sim	++
Mutagênese química	C39Y/G50D/G118D	Inviável	ND	ND
	C39Y/G50D	Inviável	Sim	ND
	G50D	Inviável	Sim	ND

Mutagenese química	C39Y/G53D/G118D	Inviável	ND	ND
	C39Y/G53D	Inviável	Sim	ND
	G53D	Inviável	Sim	ND
PCR mutagênica	N29K/M44I/P83S	ts 37°C	Sim	++
	M44I/P83S	ts 37°C	Sim	++
	N29K	tr	Sim	ND
	M44I	tr	Sim	ND
PCR mutagênica	G14D/V57D	ts 37°C	Sim	+++
	G14D	tr	Sim	ND
	V57D	ts 37°C	Sim	+++
PCR mutagênica	Q22H/L93F	ts 38°C	Sim	++++
	L93F	tr	Sim	ND
	Q22H	tr	Sim	ND
Sítio-dirigida	G50A	Inviável	Sim	ND
Sítio-dirigida	H52A	Inviável	Sim	ND
Sítio-dirigida	H52D	Inviável	Sim	ND
Sítio-dirigida	G53A	Inviável	Sim	ND
Sítio-dirigida	H54D	Inviável	Sim	ND
Sítio-dirigida	K56D	Inviável	Sim	ND
Sítio-dirigida	K56A	ts 37°C	Sim	++++
Sítio-dirigida	Δ1-10	tr	Sim	ND
Sítio-dirigida	Δ116-157	Inviável	Não	ND
Sítio-dirigida	S24P	ts 37°C	Sim	++
Sítio-dirigida	G118V/D122W	ts 37°C	Sim	++
Sítio-dirigida	G118D/L120N/L124D	Inviável	Não	ND

^aAbreviações usadas: ts = temperatura-sensível; tr = temperatura-resistente.

^bTemperatura na qual o fenótipo é observado.

^cND = Não determinado.

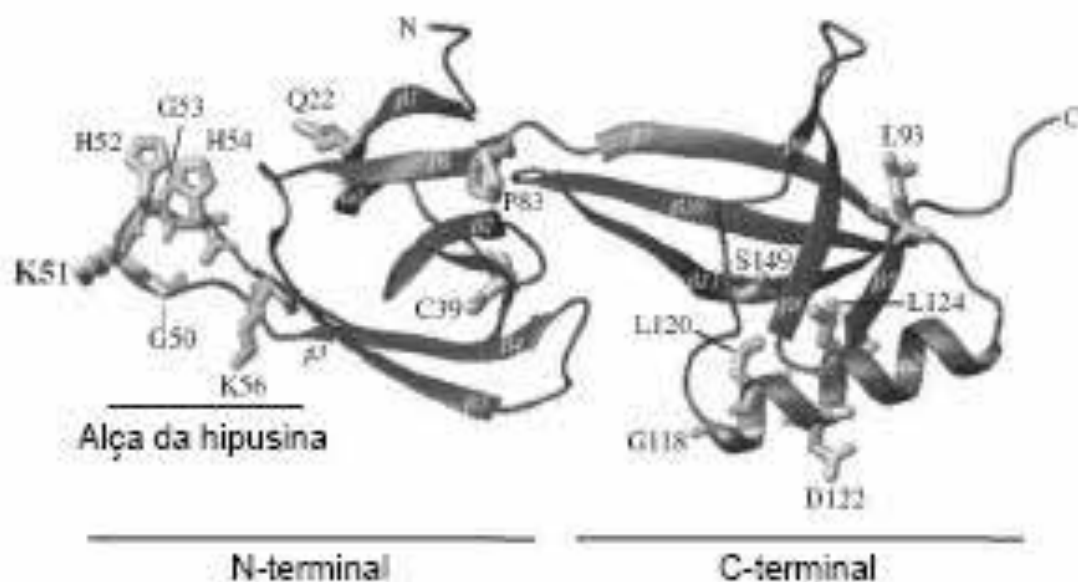


Figura 21. Localização de alguns dos resíduos mutados de eIF5A. Os domínios N-terminal e C-terminal, bem como a alça onde se localiza a lisina 51 (em negrito), alvo da hipusinação, estão indicados por barras horizontais no modelo da estrutura tridimensional de eIF5A de *S. cerevisiae* (PMDB PM0075091). Os resíduos identificados indicam a localização de alguns dos mutantes descritos nesse trabalho.

4.3- Caracterização inicial dos novos mutantes de eIF5A

4.3.1- Complementação da levedura contendo o alelo nocauteado de *TIF51A*

A primeira análise que deve ser feita com relação a um mutante de um gene essencial é conferir se o alelo mutado complementa a inviabilidade causada pelo nocauteamento do alelo selvagem. Assim, o plasmídeo contendo o alelo selvagem do gene que codifica a proteína eIF5A (pSV138- pRS316-*TIF51A*) e que mantém viável a levedura com esse gene nocauteado (SVL132) foi trocado por um plasmídeo contendo um dos alelos mutados individualmente. A viabilidade a 25°C indica que a proteína eIF5A mutada substitui a proteína selvagem. Entretanto, os alelos que não cobriram o nocaute do gene selvagem e tornaram as células inviáveis à 25°C possuem uma mutação bastante severa, indicando que a região onde está localizada essa mutação é importante para a estrutura e/ou função proteica. Dos 40 mutantes novos de eIF5A gerados neste trabalho, todos os 7 mutantes triplos originados pela mutagênese química não foram utilizados nesse ensaio, pois vieram do rastreamento de letalidade sintática e, portanto, não complementam o nocaute de *TIF51A*.

Os outros 33 mutantes obtidos por PCR mutagênica em plasmídeo *TRP1/CEN* (pSV58-pRS314; 9 construções) ou mutação sítio-dirigida em plasmídeo *LEU/CEN* (pSV59-pRS315; 24 construções) foram transformados individualmente na levedura contendo o gene codificador de eIF5A nocauteado (SVL132). Dessa maneira foram geradas as linhagens SVL524 (pSV59-pRS315-*tif51A*^{T66I/G118D}), SVL525 (pSV59-pRS315-*tif51A*^{G118D/M142I}), SVL526 (pSV59-pRS315-*tif51A*^{G118D/S140F}), SVL527 (pSV59-pRS315-*tif51A*^{M142I}), SVL528 (pSV59-pRS315-*tif51A*^{S140F}), SVL599 (pSV58-pRS314-*tif51A*^{Q22H/L93F}), SVL601 (pSV58-pRS314-*tif51A*^{N29K/M44I/P83S}), SVL602 (pSV58- pRS314-*tif51A*^{G14D/V57D}), SVL603 (pSV58-pRS314-*tif51A*^{L93F}), SVL604 (pSV58-pRS314-*tif51A*^{Q22H}), SVL631 (pSV59-pRS315-*tif51A*^{G53A}), SVL632 (pSV59-pRS315-*tif51A*^{H52A}), SVL633 (pSV59-pRS315-*tif51A*^{G50A}), SVL634 (pSV59-pRS315-*tif51A*^{K56A}), SVL636 (pSV59- pRS315-*tif51A*^{Δ1-10}), SVL649 (pSV59-pRS315-*tif51A*^{T66I}), SVL650 (pSV59- pRS315-*tif51A*^{P116L/G118D}), SVL664 (pSV58-pRS314-*tif51A*^{G14D}), SVL665 (pSV58-pRS314-*tif51A*^{N29K}), SVL666 (pSV59-pRS315-*tif51A*^{M44I}), SVL667 (pSV58-pRS314-*tif51A*^{V57D}), SVL668 (pSV58-pRS314-*tif51A*^{M44I/P83S}), SVL671 (pSV59-pRS315-*tif51A*^{H52D}), SVL672 (pSV59-pRS315-*tif51A*^{H54D}), SVL673 (pSV59-pRS315-*tif51A*^{K56D}), SVL704 (pSV59-pRS315-*tif51A*^{C39Y/G50D}), SVL705 (pSV59-pRS315-*tif51A*^{G50D}), SVL706 (pSV59-pRS315-*tif51A*^{C39Y/G53D}), SVL707 (pSV59-pRS315-*tif51A*^{G53D}), SVL721 (pSV59-pRS315-*tif51A*^{S24P}), SVL722 (pSV59-pRS315-*tif51A*^{G118V/D122W}), SVL723 (pSV59-pRS315-

tif51A^{G118V/L120N/L124D}) e SZL752 (pSV59-pRS315-*tif51A*^{P116stop}).

Em seguida, o plasmídeo *URA3* contendo o alelo selvagem de eIF5A (pSV138-pRS316-*TIF51A*), que mantém viável a levedura com esse gene nocauteado (SVL132), foi substituído em meio 5-FOA a 25°C por um dos plasmídeos *TRP1* ou *LEU2* contendo eIF5A mutado. Os controles utilizados nessa primeira fase de caracterização foram os vetores vazios *TRP1* ou *LEU2* (pSV58-pRS316, pSV59-pRS315) e o vetor contendo o gene de eIF5A selvagem (pSV50-pRS314-*TIF51A*/SVL512 ou pSV146-pRS315-*TIF51A*/SVL530). Foi observado que dos 33 alelos analisados, 21 mostraram-se viáveis e 12 inviáveis, não permitindo o crescimento da levedura na ausência do alelo selvagem de eIF5A (Tabela 6). O painel A da Figura 22 apresenta o resultado do teste de complementação do nocaute de eIF5A de alguns dos alelos novos obtidos.

4.3.2- Análise do fenótipo de sensibilidade à temperatura dos mutantes viáveis

Após o teste de complementação do fenótipo, todas as 21 linhagens viáveis foram então submetidas ao ensaio de sensibilidade à temperatura. As leveduras com o gene cromossomal de eIF5A nocauteado por *HIS3* e cobertas apenas com um dos alelos em estudo foram submetidas a diluições seriadas e cultivadas em meio SC-his a 25°C, 37°C e 38°C. Como controles desse experimento, foram utilizadas as leveduras nocauteadas cobertas com o alelo selvagem pRS315-*TIF51A* (SVL530) ou pRS314-*TIF51A* (SVL512).

Alguns alelos de *TIF51A* sensíveis à temperatura, os quais incluem *tif51A-1* (*tif51A*^{P83S}), *tif51A-2* (*tif51A*^{P83L}), *tif51A-3* (*tif51A*^{C39Y/G118D}), *ts1159* (*tif51A*^{S149P}), *tif51A-L102A* (*tif51A*^{L102A}) e *tif51A-D63V* (*tif51A*^{D63V}), já foram previamente descritos na literatura (Valentini *et al.*, 2002; Zuk e Jacobson, 1998; Chatterjee *et al.*, 2006; Saini *et al.*, 2009). No entanto, como esses mutantes apresentaram diferentes graus de sensibilidade à temperatura e isso pode ser decorrente de diferentes “background” genéticos, seus fenótipos foram novamente checados, dessa vez sob o mesmo “background” genético. Os mutantes *tif51A-L102A* (*tif51A*^{L102A}) e *tif51A-D63V* (*tif51A*^{D63V}), recentemente descritos, não foram incluídos nessa análise. Foi analisada também a importância de cada mutação presente no alelo *tif51A-3* para o fenótipo do mutante.

O painel B da Figura 22 apresenta o fenótipo de sensibilidade à temperatura de alguns dos novos mutantes e dos previamente descritos. Como o esperado, a levedura contendo eIF5A selvagem cresceu a 37°C e a 38°C da mesma forma como a 25°C, e as leveduras contendo os alelos temperatura-sensíveis não cresceram a partir de 32°C. Nesse estudo, 13

novos mutantes apresentaram-se termossensíveis e 8 mostraram-se termorresistentes (Tabela 6).

Utilizando a mesma metodologia, também foi avaliado se os compostos químicos sorbitol e PMSF, acrescentados individualmente ao meio de cultura, promovem supressão fenotípica entre todos os mutantes de eIF5A. Como mostrado no painel B da Figura 22, a adição de 1M de sorbitol no meio de cultura suprimiu parcialmente os fenótipos de termossensibilidade dos mutantes apresentados e de todos os outros caracterizados nesse trabalho (resultados não mostrados). No entanto, o sorbitol não foi capaz de substituir a proteína eIF5A no ensaio de complementação do nocaute do gene codificador dessa proteína (resultados não mostrados). Por outro lado, a adição de PMSF no meio de cultura não melhorou o crescimento celular dos mutantes de eIF5A na temperatura não permissiva (dados não mostrados).

4.3.3- Estabilidade da proteína mutada presente nos mutantes sensíveis à temperatura

Os fenótipos de inviabilidade ou termossensibilidade celular ocasionada por uma mutação genética pode ser decorrente de duas situações: a) degradação da proteína codificada pelo gene mutado ou b) produção de uma forma inativa da proteína, que deixa de se ligar a outros componentes celulares. Dessa maneira, para determinar a causa dos fenótipos apresentados pelos novos mutantes de eIF5A, os níveis dessa proteína foram analisados por western blot para cada novo alelo inviável ou termossensível de *TIF51A*. Como apresentado na Tabela 6, a maioria dos alelos termossensíveis apresentou instabilidade da proteína eIF5A na temperatura não permissiva. Esses resultados são similares aos obtidos com os 4 mutantes condicionais de eIF5A previamente descritos na literatura, os quais revelam resíduos importantes para a estrutura secundária e terciária de eIF5A (painel A da Figura 23). Dos 13 novos mutantes termossensíveis testados, apenas 2 não apresentam degradação de eIF5A na temperatura não permissiva, são eles: SLV599 (pRS314-*tif51A*^{Q22H/L93F}) e SVL634 (pRS315-*tif51A*^{K56A}), os quais serão discutidos adiante. Os níveis da proteína eIF5A mutada também foram verificados na presença de 1M de sorbitol no meio de cultura, no entanto não foi observado estabilização protéica (painel A da Figura 23).

Com o objetivo de verificar se a redução dos níveis da proteína eIF5A nos mutantes de *tif51A* é resultado de uma deficiência na síntese protéica ou da rápida degradação dessa proteína na temperatura não permissiva, foi realizado o ensaio de “pulse-chase” nas

temperaturas permissiva e não permissiva. Com a colaboração do Dr. Luciano Henrique Apponi, esse ensaio foi repetido três vezes e os resultados obtidos foram utilizados para calcular a meia-vida das proteínas eIF5A provenientes de alguns mutantes de *tif51A* (Painel B da Figura 23). Na temperatura permissiva, tanto as proteínas provenientes dos alelos mutantes analisados como do selvagem apresentaram meia-vida de aproximadamente 25 horas, o que está de acordo com os dados previamente publicados (Kang e Hershey, 1994). No entanto, na temperatura não permissiva, as proteínas provenientes dos mutantes de *tif51A* apresentaram marcante redução de meia-vida (Painel B da Figura 23).

Esses resultados confirmam a hipótese de que a instabilidade protéica é responsável pela diminuição dos níveis da proteína eIF5A na temperatura não permissiva e demonstram que os fenótipos apresentados pelos alelos mutantes de *tif51A* na temperatura não permissiva são decorrentes da diminuição dos níveis da proteína eIF5A, essencial para a viabilidade celular.

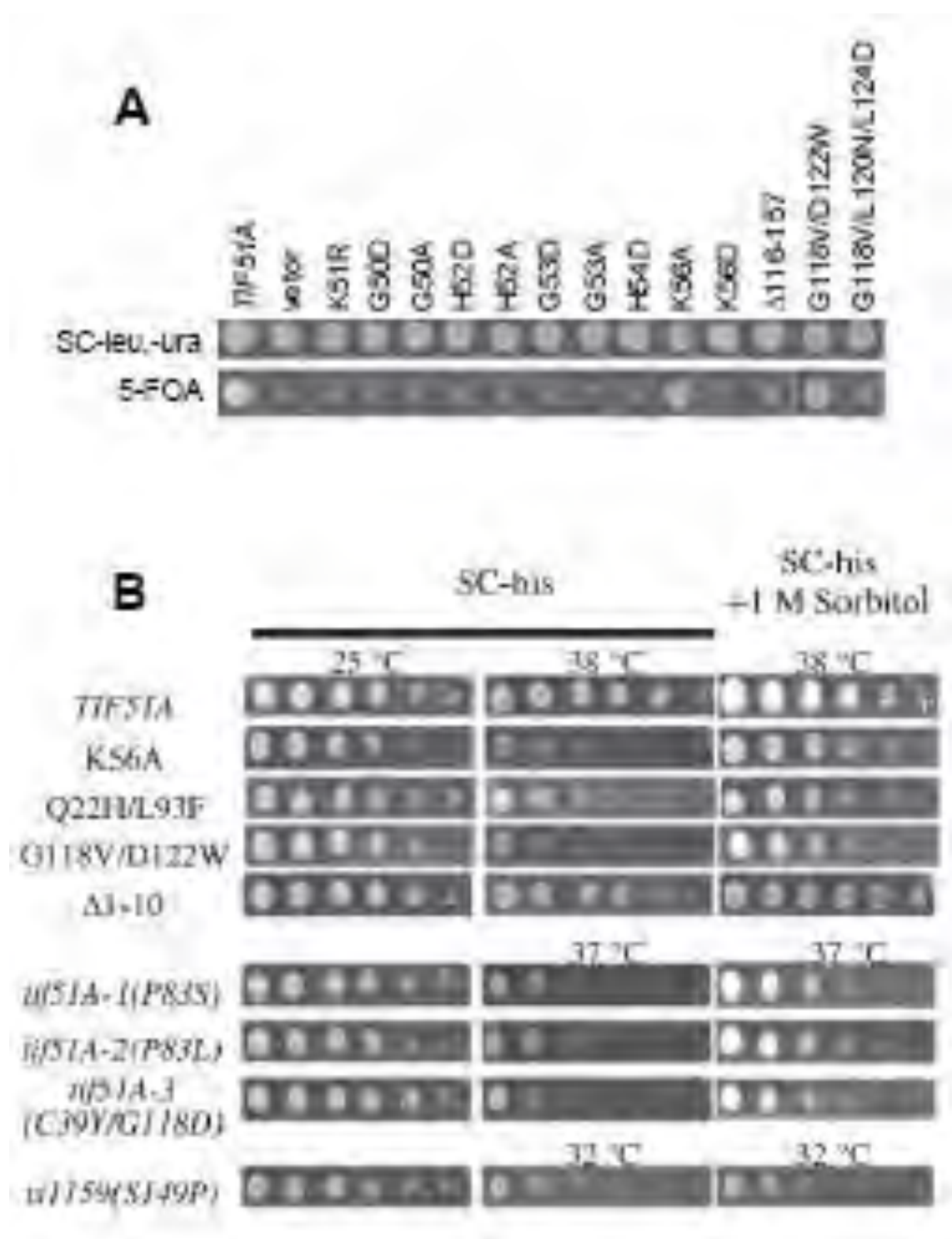


Figura 22. Avaliação da complementação do nocaute de *TIF51A* de alguns mutantes.

(A) Análise de crescimento das linhagens com a proteína eIF5A mutada. **(B)** Determinação da sensibilidade à temperatura dos mutantes *tif51A*, sob o mesmo background genético, na presença e ausência de 1M de sorbitol no meio de cultura.

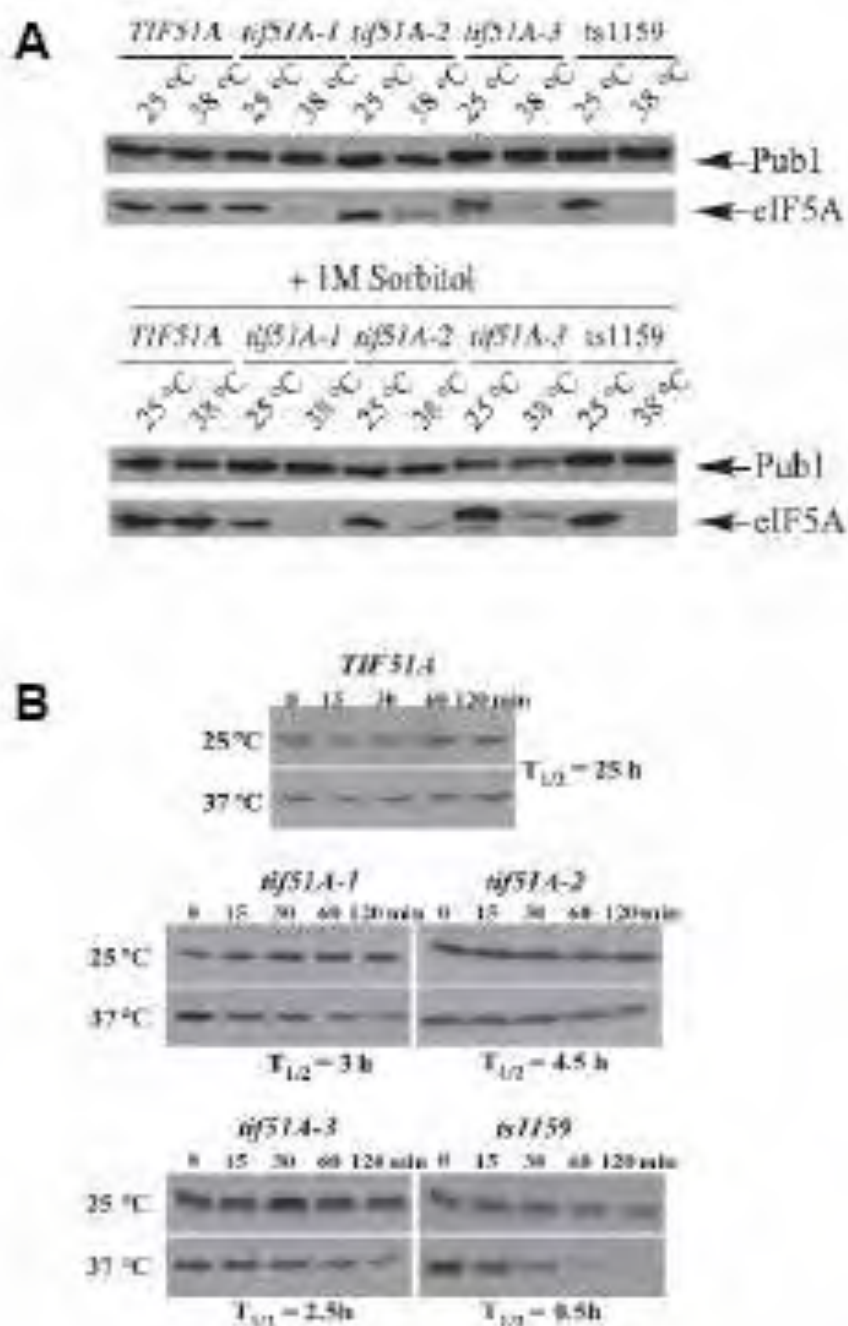


Figura 23. Análise da estabilidade da proteína mutada presente nos mutantes sensíveis à temperatura de *tif51A*. (A) Determinação dos níveis da proteína eIF5A selvagem e mutada por western blot, nas temperaturas permissiva e não permissiva, na presença e na ausência de 1M de sorbitol. (B) A meia-vida das proteínas eIF5A selvagem e mutadas foram checadas por ensaios de “pulse-chase”, nas temperaturas permissiva e não permissiva.

4.4- Caracterização dos mutantes de *tif51A* que apresentam alteração na alça de hipusinação

Durante a análise da terceira mutação que nocauteou o alelo *tif51A-3*^{C39Y/G118D} de eIF5A e causou inviabilidade celular (Frigieri *et al.*, 2007), foram identificadas 2 novas mutações (G50D e G53D) que, individualmente, são capazes de nocautear o gene codificador de eIF5A. Estes resíduos são totalmente conservados entre os vários organismos analisados (Figura 4) e estão localizados na alça de hipusinação (painel A da Figura 24). Esta alça, por sua vez, é 100% conservada entre os eucariotos e contém resíduos carregados positivamente ou não carregados (Figura 4). Dessa maneira, com o objetivo de verificar se a presença de aminoácidos negativamente carregados é a causa da inviabilidade dos alelos *tif51A*^{G50D} e *tif51A*^{G53D}, novos mutantes foram gerados através de mutação sítio-dirigida, substituindo os resíduos G50, H52, G53 e K56 por alanina e os resíduos H52, H54 e K56 por ácido aspártico. Esses novos mutantes foram avaliados quanto à sua capacidade de complementar o nocaute do gene selvagem (painel A da Figura 22), e os resultados mostram claramente que apenas o alelo *tif51A*^{K56A}, último aminoácido da alça de hipusinação (painel A da Figura 24), foi capaz de substituir o gene selvagem na temperatura permissiva. Em seguida, para verificar se as proteínas mutadas são produzidas pelos alelos inviáveis, uma linhagem que expressa a fusão funcional da proteína A com eIF5A selvagem (SVL731) foi transformada com os alelos em estudo e a expressão de eIF5A mutada foi checada por western blot. Essa análise foi possível uma vez que os tamanhos da proteína A-eIF5A e eIF5A são diferentes. Como pode ser observado no painel B da Figura 24, todos os mutantes inviáveis analisados apresentam a proteína eIF5A mutada estável, o que indica que seus fenótipos de inviabilidade não são causados pela perda da proteína. Esses resultados sugerem que essas proteínas mutantes são estáveis, mas não funcionais.

Assim, com o objetivo de determinar se um defeito na síntese de hipusina é responsável pelo fenótipo de inviabilidade apresentado pelos alelos com mutações na alça de hipusinação, foi testado se essas proteínas mutadas servem de substrato para as enzimas modificadoras de eIF5A (Dys1 e Lia1) em um experimento de hipusinação *in vivo* (painel C da Figura 24). Nenhuma das proteínas mutadas avaliadas sofreu a modificação pós-traducional de incorporação do resíduo de hipusina, sendo esta a causa para seus fenótipos de inviabilidade. O mutante eIF5A^{K56A} será analisado e discutido adiante.

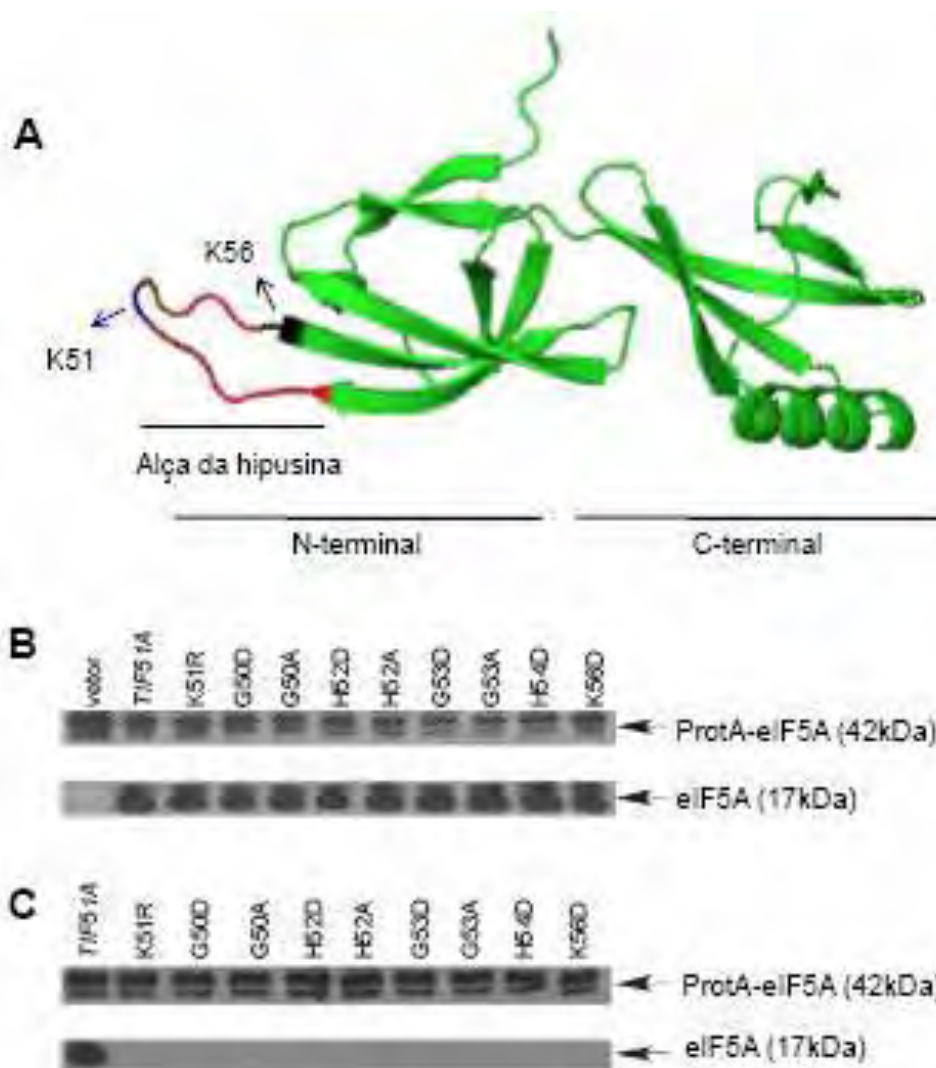


Figura 24. Caracterização dos mutantes de eIF5A cujos resíduos modificados estão localizados na alça de hipusinação. (A) Localização de alguns dos resíduos mutados de eIF5A. Os domínios N-terminal e C-terminal, bem como a alça de hipusinação, estão indicados por barras horizontais no modelo da estrutura tridimensional de eIF5A de *S. cerevisiae* (PMDB PM0075091). Os resíduos pertencentes à alça de hipusinação estão marcados em vermelho, a lisina alvo da hipusinação está marcada em azul e a localização do resíduo K56 está indicada em preto. **(B)** Expressão e estabilidade das proteínas mutadas. As linhagens expressando a fusão funcional ProtA-eIF5A selvagem foi transformada com os alelos inviáveis de *tif51A* e a expressão das proteínas mutantes foi determinada por western blot. **(C)** Análise das proteínas mutantes como substrato para a formação da hipusina. As mesmas linhagens utilizadas em (B) foram submetidas ao ensaio de hipusinação. O painel apresenta o fluorograma do SDS-PAGE das amostras analisadas.

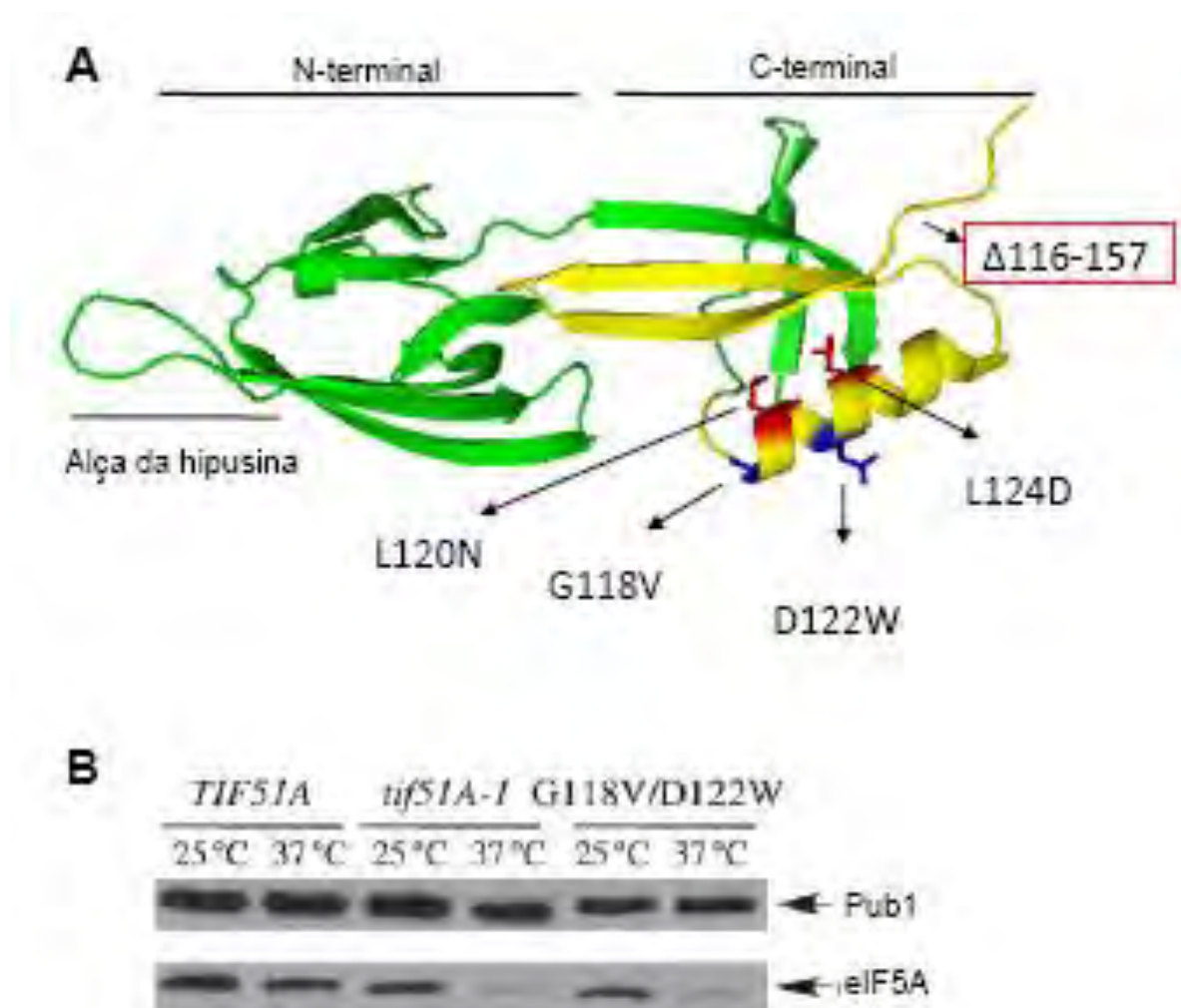


Figura 26. Mutantes de eIF5A com substituições na α -hélice do domínio C-terminal apresentam defeitos de estruturação protéica. (A) Expressão e estabilidade das proteínas mutadas produzidas pelas linhagens inviáveis. As linhagens expressando a fusão funcional ProtA-eIF5A selvagem foi transformada com os alelos inviáveis de *TIF51A* e a expressão das proteínas mutantes foi determinada por western blot. **(B)** Análise por dicroísmo circular da estrutura secundária de eIF5A recombinante. As proteínas selvagem e mutantes no C-terminal que se apresentaram inviáveis foram expressas em *E. coli* e analisadas por dicroísmo circular.

4.5- Caracterização dos mutantes de *tif51A* que apresentam alteração na α -hélice do C-terminal

Como apresentado na Figura 8 e no painel A da Figura 25, a estrutura terciária de eIF5A de *S. cerevisiae* possui uma região em α -hélice no domínio C-terminal. Curiosamente, estruturas previamente determinadas de proteínas homólogas de eIF5A de arqueas não apresentam essa α -hélice ou possuem essa estrutura bastante reduzida, diferente das estruturas observadas em leishmania, levedura e humano (Kim *et al.*, 1997; Peat *et al.*, 1998; Yao *et al.*, 2003; Tong *et al.*, 2009; *L. braziliensis* - PDB ID 1X6O e *L. mexicana* – PDB ID 1XTD).

Com o objetivo de confirmar a existência da α -hélice do C-terminal e analisar a importância dessa estrutura secundária para a estruturação e função de eIF5A, foram geradas mutações sítio-dirigidas baseadas na estrutura modelada de eIF5A de *S. cerevisiae* (PMDB PM0075091): eIF5A^{G118V/D122W}, eIF5A^{G118V/L120N/L124D} e eIF5A ^{Δ 116-157}. Estes mutantes também foram avaliados quanto a complementação do nocaute de *TIF51A*, sensibilidade à temperatura e estabilidade da proteína mutada. Como esperado, estes mutantes apresentaram diferentes graus de severidade fenotípica (painel A da Figura 22 e painel B da Figura 25). O mutante eIF5A^{G118V/D122W} mostrou-se termossensível com degradação da proteína mutada na temperatura não permissiva (painel B da Figura 25), e os mutantes eIF5A^{G118V/L120N/L124D} e eIF5A ^{Δ 116-157} apresentaram fenótipo de inviabilidade com níveis de produção de eIF5A mutada não detectáveis (painel A da Figura 22 e painel A da Figura 26). Esses resultados indicam que a região que contém essas mutações é importante para a manutenção estrutural da proteína eIF5A.

Buscando confirmar fisicamente a existência da α -hélice e caracterizar sua importância, os mutantes eIF5A^{G118V/L120N/L124D} e eIF5A ^{Δ 116-157}, bem como eIF5A selvagem, tiveram seus genes clonados no vetor de expressão em bactéria pQE30, as proteínas foram produzidas em *E. coli* e purificadas por cromatografia de afinidade com coluna de níquel. Em seguida, as proteínas puras foram submetidas à técnica de dicroísmo circular no Instituto de Física de São Carlos, pelo Dr. Wanius Garcia, responsável pela coleta e análise dos dados. Os resultados obtidos estão apresentados no painel B da Figura 26. O espectro de eIF5A selvagem é caracterizado pela leitura mínima a aproximadamente 207nm e por uma evidente curva (ombro) entre 216 e 223nm, dados que sugerem a presença de estruturas como folhas β e α -hélice. Esses resultados estão de acordo com dados anteriormente descritos para as

proteína de humano (Facchiano *et al.*, 2001; Tong *et al.*, 2009), de leishmania (*L. braziliensis* - PDB ID 1X6O e *L. mexicana* – PDB ID 1XTD) e de levedura (Figura 8). O espectro do mutante triplo eIF5A^{G118V/L120N/L124D}, por sua vez, apresenta diminuição da elipticidade entre 216 e 223nm quando comparado com o espectro da proteína selvagem, o que indica perda da estrutura terciária. O mutante contendo a deleção do C-terminal (eIF5A^{Δ116-157}) apresentou espectro com elipticidade ainda menor que o apresentado pelo mutante triplo. Esses resultados confirmam a existência da α -hélice e indicam que essa estrutura secundária tem grande importância para a estabilidade estrutural de eIF5A, o que está de acordo com a ideia de que os fenótipos apresentados pelos mutantes eIF5A^{G118V/D122W}, eIF5A^{G118V/L120N/L124D} e eIF5A^{Δ116-157} são decorrentes da destruição parcial e total da α -hélice, que leva à perda da proteína como um todo.

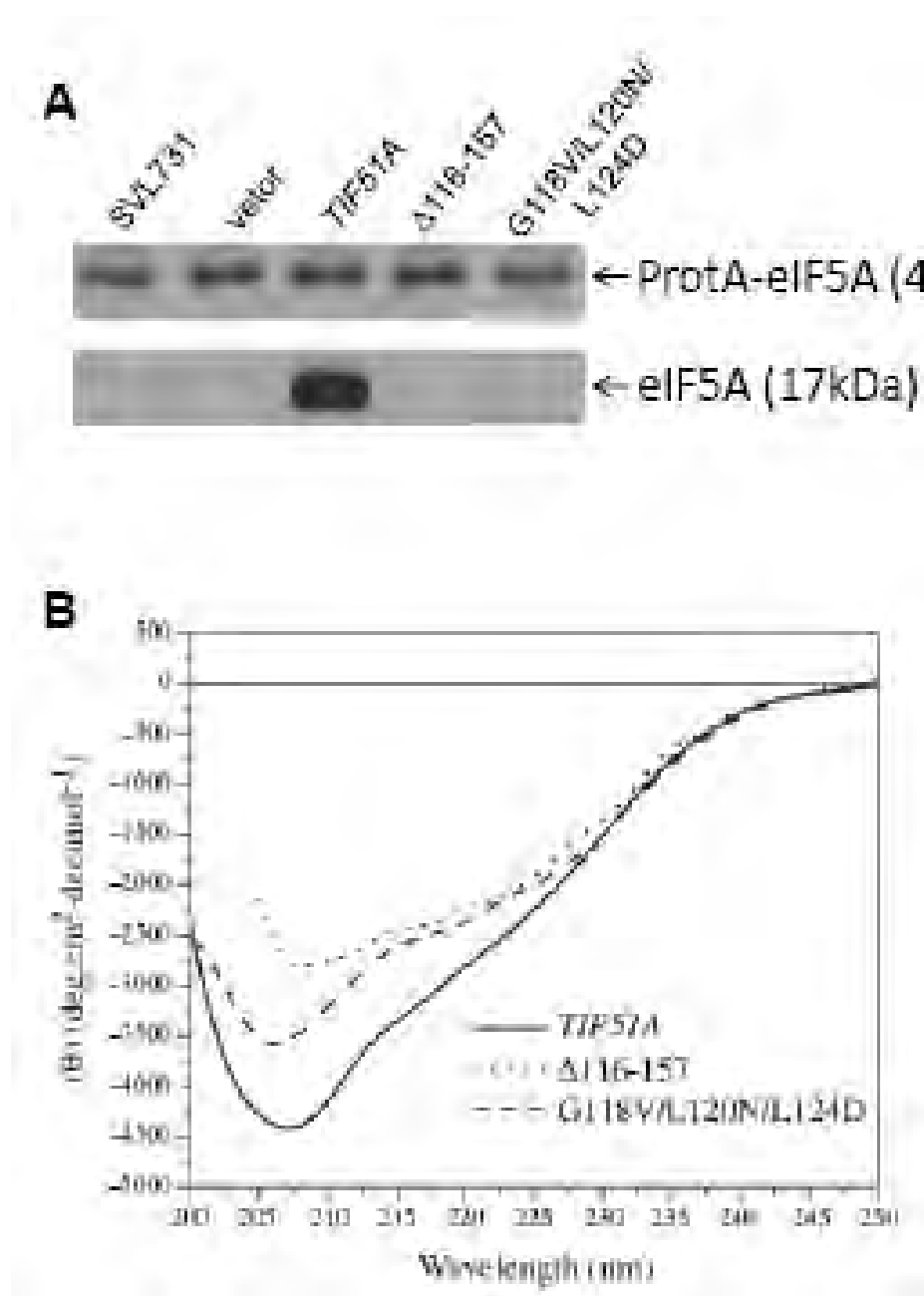


Figura 26. Mutantes de elf5A com substituições na α -hélice do domínio C-terminal apresentam defeitos de estruturação protéica. (A) Expressão e estabilidade das proteínas mutadas produzidas pelas linhagens inviáveis. As linhagens expressando a fusão funcional ProtA-elf5A selvagem foi transformada com os alelos inviáveis de *TIF51A* e a expressão das proteínas mutantes foi determinada por western blot. **(B)** Análise por dicroísmo circular da estrutura secundária de elf5A recombinante. As proteínas selvagem e mutantes no C-terminal que se apresentaram inviáveis foram expressas em *E. coli* e analisadas por dicroísmo circular.

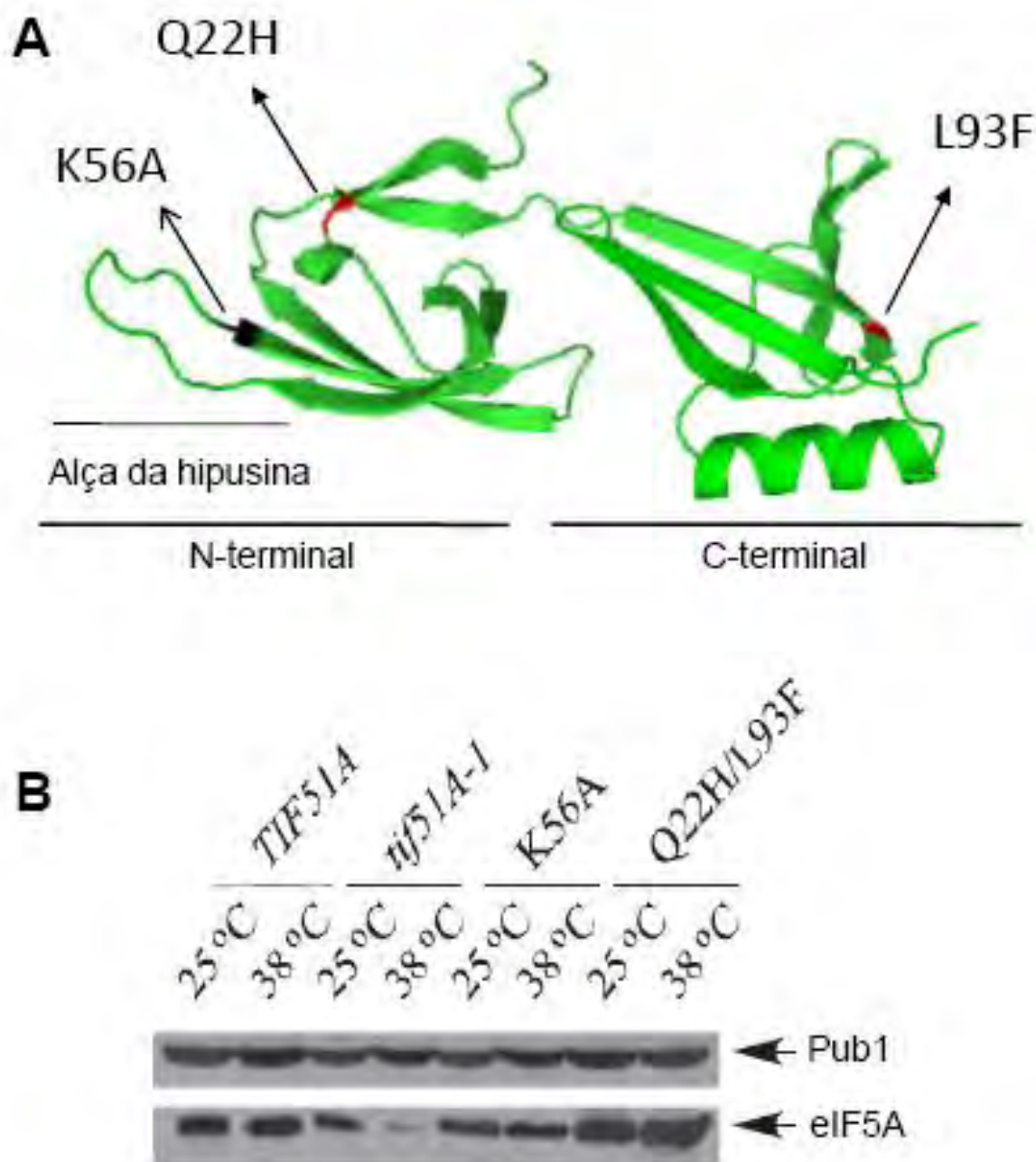


Figura 27. Caracterização dos dois mutantes de eIF5A que produzem a proteína estável na temperatura não permissiva. (A) Localização dos resíduos mutados de eIF5A. Os domínios N-terminal e C-terminal, bem como a alça de hipusinação, estão indicados por barras horizontais no modelo da estrutura tridimensional de eIF5A de *S. cerevisiae* (PMDB PM0075091). A localização dos resíduos mutados em eIF5AK56A e eIF5A^{Q22H/L93F} estão indicados em preto e vermelho, respectivamente. **(B)** Análise dos níveis das proteínas eIF5A selvagem e mutadas por western blot, nas temperaturas permissiva e não permissiva.

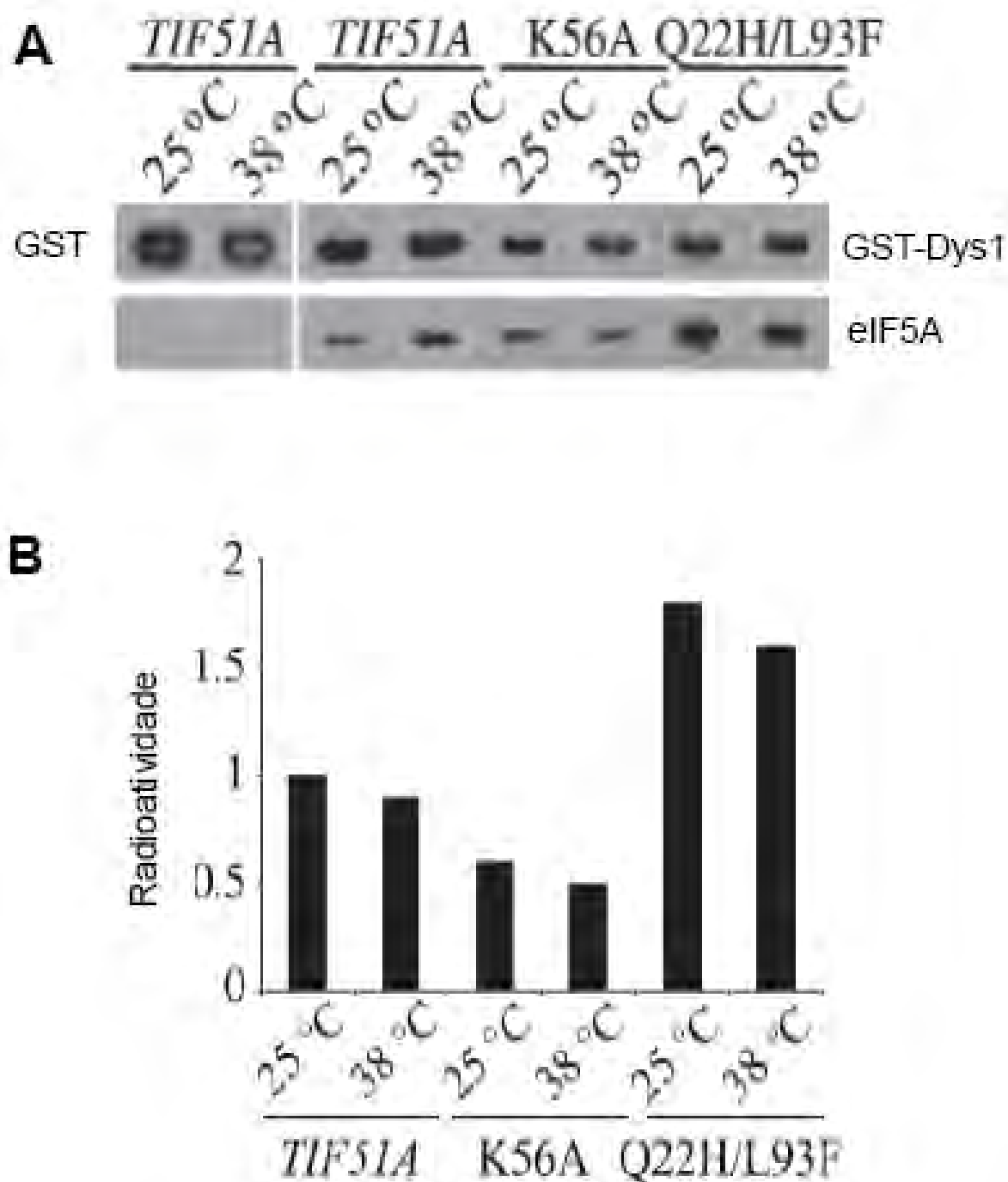


Figura 28. Caracterização da interação física e funcional entre os dois mutantes de eIF5A que produzem a proteína estável na temperatura não permissiva e a enzima **Dys1**. **(A)** Ensaio de copurificação entre GST-Dys1 e eIF5A selvagem e mutadas, nas temperaturas permissiva e e não permissiva. **(B)** Determinação se os mutantes de eIF5A servem de substrato para a formação da hipusina através do ensaio de hipusinação *in vivo*.

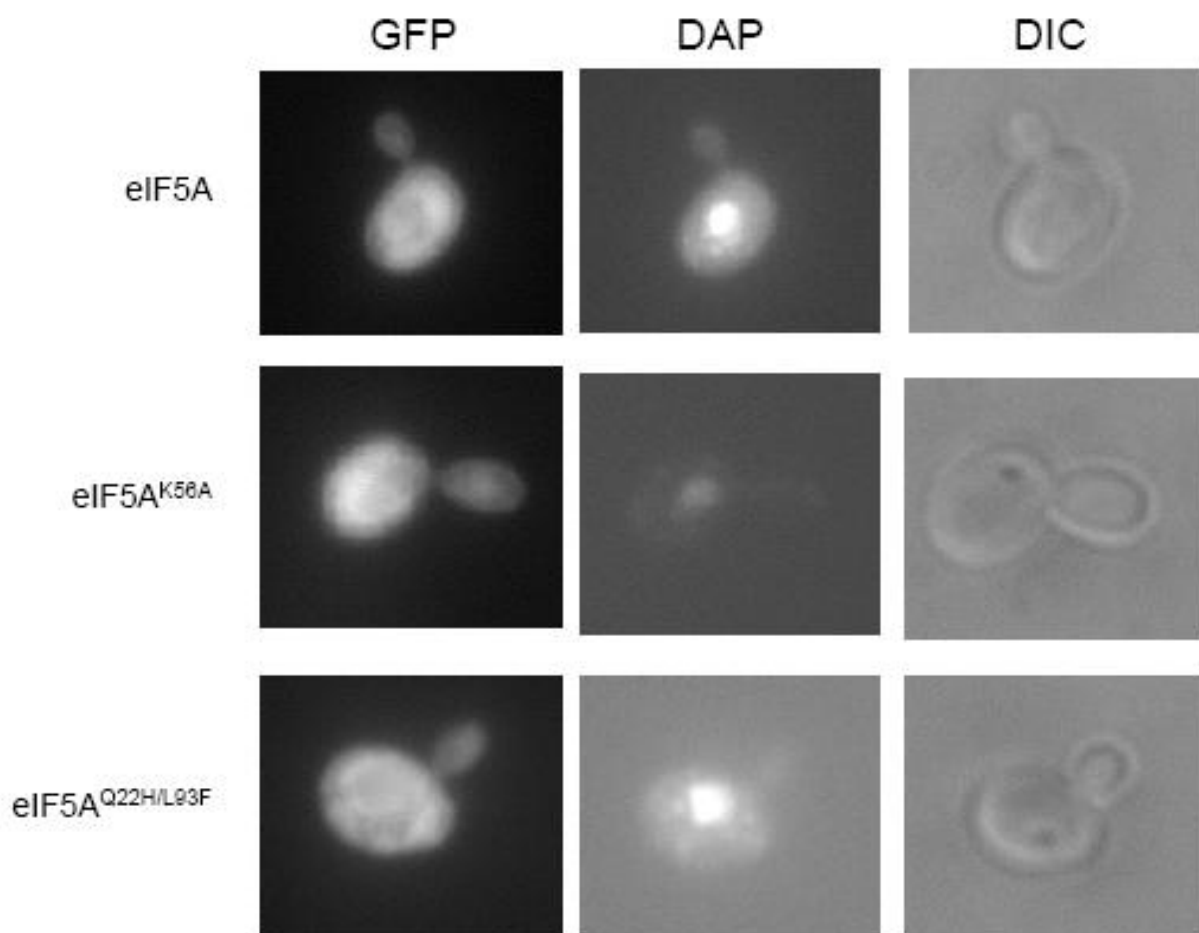


Figura 29. Localização subcelular dos dois mutantes de eIF5A que produzem a proteína estável na temperatura não permissiva. Localização celular de GFP-eIF5A, GFP-eIF5A^{K56A} e GFP-eIF5A^{Q22H/L93F}. GFP indica a localização das proteínas selvagem e mutadas, DAP apresenta a localização do núcleo e DIC mostra a célula como um todo. Essas imagens foram feitas das células depois de 3 horas a 38°C.

4.6- Caracterização dos mutantes de *tif51A* que produzem a proteína eIF5A estável na temperatura não permissiva de crescimento

Da mesma forma que os mutantes de eIF5A previamente descritos (Valentini *et al.*, 2002; Zuk e Jacobson, 1998; Chatterjee *et al.*, 2006; Saini *et al.*, 2009 e Figuras 22, 23, 25 e 26), a maioria dos novos alelos de *tif51A* produz a proteína eIF5A instável na temperatura não permissiva (Tabela 6), característica que explica o fenótipo termossensível desses mutantes, uma vez que a proteína 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 fisicamente 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*^{Q22H/L93F} e *tif51A*^{K56A}) apresentaram eIF5A estável na temperatura não permissiva (Figura 27), 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. Curiosamente, o mutante *tif51A*^{Q22H/L93F} apresentou aumento dos níveis da proteína eIF5A em relação à linhagem selvagem, tanto na temperatura permissiva como na não permissiva.

4.6.1- Interação física e funcional entre os mutantes eIF5A^{K56A} e eIF5A^{Q22H/L93F} e suas enzimas modificadoras Dys1 e Lia1

Uma vez que a função de eIF5A depende da formação do aminoácido hipusina, as interações físicas e funcionais entre os mutantes estáveis (eIF5A^{K56A} e eIF5A^{Q22H/L93F}) e as enzimas envolvidas no processo pós-traducional de formação da hipusina (Dys1 e Lia1) foram avaliadas. Inicialmente, foi verificada a capacidade desses mutantes de interagir fisicamente com a fusão funcional de GST com a enzima desoxihipusina sintase (GST-Dys1), responsável pela primeira etapa na formação da hipusina. As leveduras contendo o gene codificador de eIF5A selvagem nocauteado, viáveis devido à presença individual dos alelos *tif51A*^{Q22H/L93F} e *tif51A*^{K56A}, foram transformadas com a construção plasmidial pSV431, a qual codifica a proteína GST-Dys1. Em seguida, essas leveduras foram submetidas ao ensaio de copurificação, nas temperaturas permissiva e restritiva de crescimento. O painel A da Figura 28 apresenta o resultado desse experimento. Pode-se observar que as proteínas

eIF5A^{K56A} e eIF5A^{Q22H/L93F} são capazes de interagir fisicamente com GST-Dys1. De modo interessante, o mutante eIF5A^{Q22H/L93F} parece ser mais copurificado por GST-Dys1 do que a proteína eIF5A selvagem, o que pode ser resultado da maior expressão dessa proteína mutada (painel B da Figura 27). Esses mesmos resultados foram obtidos no ensaio de copurificação entre as proteínas eIF5A^{K56A} e eIF5A^{Q22H/L93F} e a proteína GST-Lia1 (Veridiana Soares Pereira Cano, resultados não publicados), responsável pela segunda etapa da formação da hipusina.

Depois de verificada a interação física entre eIF5A mutada e suas enzimas modificadoras (Dys1 e Lia1), foi avaliada a capacidade de essas proteínas mutadas serem hipusinadas através da análise da incorporação de espermidina radioativa nas proteínas eIF5A das linhagens mutantes *tif51A*^{Q22H/L93F} e *tif51A*^{K56A} (painel B da Figura 28). Esse experimento foi realizado com a colaboração da Dra. Veridiana Soares Pereira Cano. Pode-se observar que os dois mutantes servem de substrato para as enzimas Dys1 e Lia1, tanto na temperatura permissiva como na não permissiva. Apesar de observarmos menor hipusinação da proteína mutada eIF5A^{K56A} em relação à proteína selvagem, acreditamos que essa quantidade de eIF5A modificada seja suficiente para sua função celular, uma vez que a diminuição da forma hipusinada ocorre em ambas as temperaturas (permissiva e não permissiva) e esse mutante substitui a proteína selvagem na temperatura permissiva (painel A da Figura 22). De modo interessante, *tif51A*^{Q22H/L93F} apresentou um aumento na quantidade de proteína modificada em relação à proteína selvagem, fato que também pode ser explicado pela maior produção da proteína eIF5A^{Q22H/L93F} (painel B da Figura 27).

4.6.2- Caracterização de outros fenótipos dos mutantes eIF5A^{K56A} e eIF5A^{Q22H/L93F}

A localização subcelular de eIF5A foi determinada por microscopia de fluorescência (Valentini *et al.*, 2002). Neste estudo foi mostrado que eIF5A apresenta localização citoplasmática com maior concentração perinuclear, o que está de acordo com a localização de eIF5A em células de mamíferos, onde essa proteína localiza-se principalmente no citoplasma (Shi *et al.*, 1997; Li-En Jao e Yu Chen, 2002). Dessa maneira, a mesma técnica foi utilizada com os mutantes estáveis eIF5A^{K56A} e eIF5A^{Q22H/L93F} para verificar se eles apresentam alguma alteração da localização celular da proteína mutada nas temperaturas permissiva e não permissiva de crescimento. Para isso, inicialmente os alelos dos mutantes foram clonados em fusão com o gene codificador de GFP no vetor pCGF-1A (pSV76), induzível por galactose, e, depois de seqüenciados, os clones foram inseridos na levedura

SVL55. Em seguida, as expressões das proteínas selvagem e mutadas em fusão com GFP foram checadas por western blot e foi verificado que após uma hora de indução as proteínas já são produzidas em quantidades suficientes para análise (resultados não mostrados). A localização celular foi então determinada após uma hora de indução da expressão protéica na temperatura permissiva e 3 horas na temperatura não permissiva. A Figura 29 apresenta a localização das proteínas selvagem e mutadas a 38°C, em que se pode observar que tanto a proteína selvagem como os mutantes eIF5A^{K56A} e eIF5A^{Q22H/L93F} apresentam localização citoplasmática, mesma característica previamente observada para a proteína selvagem a 30°C (Valentini *et al.*, 2002). Assim, uma vez não existindo defeito visível na localização celular dessas proteínas mutadas e para entender qual o defeito celular apresentado pelos alelos *tif51A*^{Q22H/L93F} e *tif51A*^{K56A}, foram realizados outros ensaios tais como: quantificação da síntese protéica, curva de crescimento e perfil polissomal.

Inicialmente, foi verificado se esses mutantes apresentam defeito na síntese protéica, através do ensaio de quantificação da incorporação de leucina radioativa no conteúdo protéico celular. Como apresentado no painel A da Figura 30, os dois mutantes analisados (*tif51A*^{Q22H/L93F} e *tif51A*^{K56A}) possuem diminuição da síntese protéica em relação ao selvagem quando são submetidos à temperatura não permissiva. Também foi determinada a curva de crescimento das linhagens selvagem, *tif51A*^{Q22H/L93F} e *tif51A*^{K56A} (painel B da Figura 30). De modo interessante, o defeito na síntese protéica já foi evidente após 1 hora dos mutantes estarem na temperatura não permissiva, antes de qualquer defeito aparente de crescimento ser detectado, o que sugere que o defeito na síntese protéica é a causa da diminuição de crescimento dessas linhagens na temperatura restritiva.

A separação e quantificação dos componentes ribossomais (40S, 60S, 80S e o polissomo) através de gradiente de sacarose, seguida da análise das frações obtidas por absorvância à 254nm, é uma importante ferramenta para o estudo de proteínas envolvidas no processo de tradução. Dessa maneira, a análise dos mutantes termossensíveis *tif51A-1* e *tif51A-3* de eIF5A revelou defeitos na distribuição polissomal na temperatura não permissiva, quando comparados ao alelo selvagem, os quais lembram o defeito de uma proteína envolvida com o processo de elongação da tradução (Zanelli *et al.*, 2006; Gregio *et al.*, 2009). Uma vez que esses mutantes analisados de eIF5A são instáveis na temperatura não permissiva, o perfil polissomal dos mutantes que produzem eIF5A estável na temperatura não permissiva foi investigado e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 31.

Mutantes de proteínas envolvidas no início do processo de tradução apresentam aumento da porção 80S, porque a quantidade de ribossomos livres aumenta, e diminuição

da área do polissomo porque novos polissomos não são formados. Embora a proteína eIF5A tenha sido inicialmente identificada como um fator de início de tradução, a análise do perfil polissomal dos mutantes eIF5A^{K56A} e eIF5A^{Q22H/L93F} não indica defeito no início da tradução. Foi feita triplicata deste experimento e os números apresentados correspondem à média das medidas das áreas dos polissomos dividido pelas áreas da porção 80S. Pode-se observar que a relação entre a área do polissomo e da porção 80S é maior nos mutantes eIF5A^{K56A} (2,71 +/- 0,086) e eIF5A^{Q22H/L93F} (2,41 +/- 0,053) quando comparado com a linhagem selvagem (1,67 +/- 0,043), ou seja, a porção 80S diminui e a área do polissomo aumenta. Essa característica evidencia que, na temperatura restritiva, os mutantes de eIF5A estão sofrendo parada na etapa de elongação, pois o número de ribossomos livres (porção 80S) está diminuído, mas há aumento da área do polissomo. Isso indica que os ribossomos se ligam ao mRNA mas não se desligam, o que sugere defeito no processo de elongação da tradução nos mutantes de eIF5A.

4.6.3- Busca de parceiros físicos por copurificação de eIF5A^{K56A} e eIF5A^{Q22H/L93F}

Como apresentado anteriormente, o fenótipo de diminuição de crescimento a 38°C apresentado pelos dois mutantes de eIF5A que produzem a proteína estável na condição não permissiva pode ser decorrente da perda de interações físicas específicas entre eIF5A mutada e seus ligantes celulares nessa condição. Dessa maneira, com o objetivo de identificar as proteínas que interagem fisicamente com eIF5A selvagem mas deixam de interagir com as proteínas mutadas, foi realizado o experimento de copurificação seguido de espectrometria de massas.

Inicialmente, os genes codificadores de eIF5A selvagem e mutadas foram clonados no vetor de expressão em *S. cerevisiae* pYGEX-2T, o qual permite a expressão da proteína de interesse em fusão com GST, possui regulação de expressão por galactose, marca auxotrófica *URA3* e origem de replicação 2μ . Em seguida, as construções plasmidiais pSV20, pSV36, pVZ992 e pVZ994 foram introduzidas na linhagem SVL55 e os transformantes resultantes foram crescidos em meio sólido seletivo contendo glicose 2%. Pré-cultura destes transformantes foi feita em meio líquido seletivo contendo glicose 2%, a 30°C durante a noite. No dia seguinte, as culturas foram diluídas para D.O._{600nm}=0,016 em 500 mL de meio líquido seletivo contendo rafinose 2% e incubadas a 30°C até atingir D.O._{600nm}= 0,4-0,5. Em seguida, foi feita a indução da produção das proteínas de fusão, pela adição de 50 mL de galactose 20%, por 3 horas. Após a indução, as culturas foram

incubadas por 4 horas na temperatura restritiva de 38°C. As células foram centrifugadas a 2.500xg, por 7 minutos, a 4°C, lavadas duas vezes com PBS 1X gelado, pesadas e congeladas a -80°C. A seguir, as células foram lisadas, submetidas ao ensaio de copurificação e analisadas por SDS-PAGE seguido de coloração por prata.

Vale ressaltar aqui que a fusão GST-eIF5A é funcionalmente ativa por suprimir o fenótipo temperatura sensível de eIF5A mutada (Zanelli *et al.*, 2006). Como esperado, podemos observar na Figura 32 que uma série de proteínas de diferentes tamanhos foram copurificadas com a fusão GST-eIF5A mas não com GST-eIF5A^{K56A} e GST-eIF5A^{Q22H/L93F}. As bandas indicadas na Figura 32 foram recortadas do gel e enviadas para a identificação das proteínas por espectrometria de massas, no National Institutes of Health (Bethesda, MA).

As proteínas identificadas foram as proteínas ribossomais: L33A (12kDa), S17A (16kDa), S19A (16kDa), S15 (16kDa), S18 (17kDa), S20 (17kDa), S26 (14kDa), L6A (20kDa), L17A (21kDa), S9 (22kDa), S5(23kDa), L7B (28kDa), L2, S8 (23kDa), S01 (27kDa), S3 (26kDa), L13A (22kDa), L5 (34kDa), P0 (34Kda), L4A (40kDa) e o fator de elongação eEF2. Como pode ser observado, a maioria das proteínas identificadas são componentes do ribossomo, o que está de acordo com resultados previamente publicados (Zanelli *et al.*, 2006; Jao e Chen, 2006).

A associação de eIF5A com as proteínas ribossomais P0, L5 e eEF2 foi descrita recentemente por nosso laboratório como sendo dependente do ribossomo (Zanelli *et al.*, 2006). Da mesma forma, as proteínas P0 e L5 também foram identificadas nesse experimento de copurificação. No entanto, como pode ser observado na Figura 32, os dois mutantes de eIF5A parecem não copurificar ou copurificar em menor quantidade com as proteínas ribossomais identificadas, quando comparado com a proteína selvagem. Esse resultado indica que possivelmente esses dois mutantes perdem a interação com o ribossomo na condição não permissiva de crescimento, dado que sustenta a idéia de que a proteína eIF5A participa do processo de tradução e deve estar ligada ao ribossomo, ou a algumas proteínas do ribossomo. Curiosamente, o mutante GST-eIF5A^{Q22H/L93F} não perde a interação com o fator de elongação eEF2 (Figura 32), ao contrário do que parece ocorrer com mutante GST-eIF5A^{K56A} quando comparado com a proteína selvagem, dado que sugere uma possível ligação direta entre eIF5A e o fator de elongação eEF2.

Com o objetivo de verificar se os mutantes GST-eIF5A^{K56A} e GST-eIF5A^{Q22H/L93F} são capazes de se ligar às proteínas de tradução P0, L5 e eEF2 da mesma forma como a proteína selvagem, as mesmas amostras provenientes do experimento de copurificação apresentado anteriormente foram submetidas a SDS-PAGE 4-12% seguido de western blot,

utilizando os anticorpos anti-P0, anti-L5 ou anti-eEF2 para a identificação das respectivas proteínas. Além disso, com o objetivo de verificar se a ligação da proteína mutante GST-eIF5A^{Q22H/L93F} com a proteína eEF2 é dependente do ribossomo, os mesmos extratos protéicos utilizados no item anterior foram submetidos a nova copurificação, dessa vez na presença de EDTA 40 mM e 300 mg de RNase, substâncias que desfazem o ribossomo nessas concentrações.

O resultado apresentado na Figura 33 mostra claramente que na temperatura não permissiva as proteínas selvagem e GST-eIF5A^{Q22H/L93F} interagem com P0, L5 e eEF2, ao contrário do mutante GST-eIF5A^{K56A}. Esse resultado confirma o dados obtidos pelo experimento anterior que demonstram que o mutante GST-eIF5A^{K56A} perde a interação com proteínas ribossomais, ao contrário das proteínas selvagem e GST-eIF5A^{Q22H/L93F}. Entretanto, o dado mais interessante apresentado nesse experimento foi a manutenção da copurificação do fator de elongação eEF2 pelo mutante GST-eIF5A^{Q22H/L93F} na condição em que o ribossomo é desfeito (tratamento com EDTA e RNase). Esse resultado sugere uma possível interação física direta entre eIF5A e eEF2.

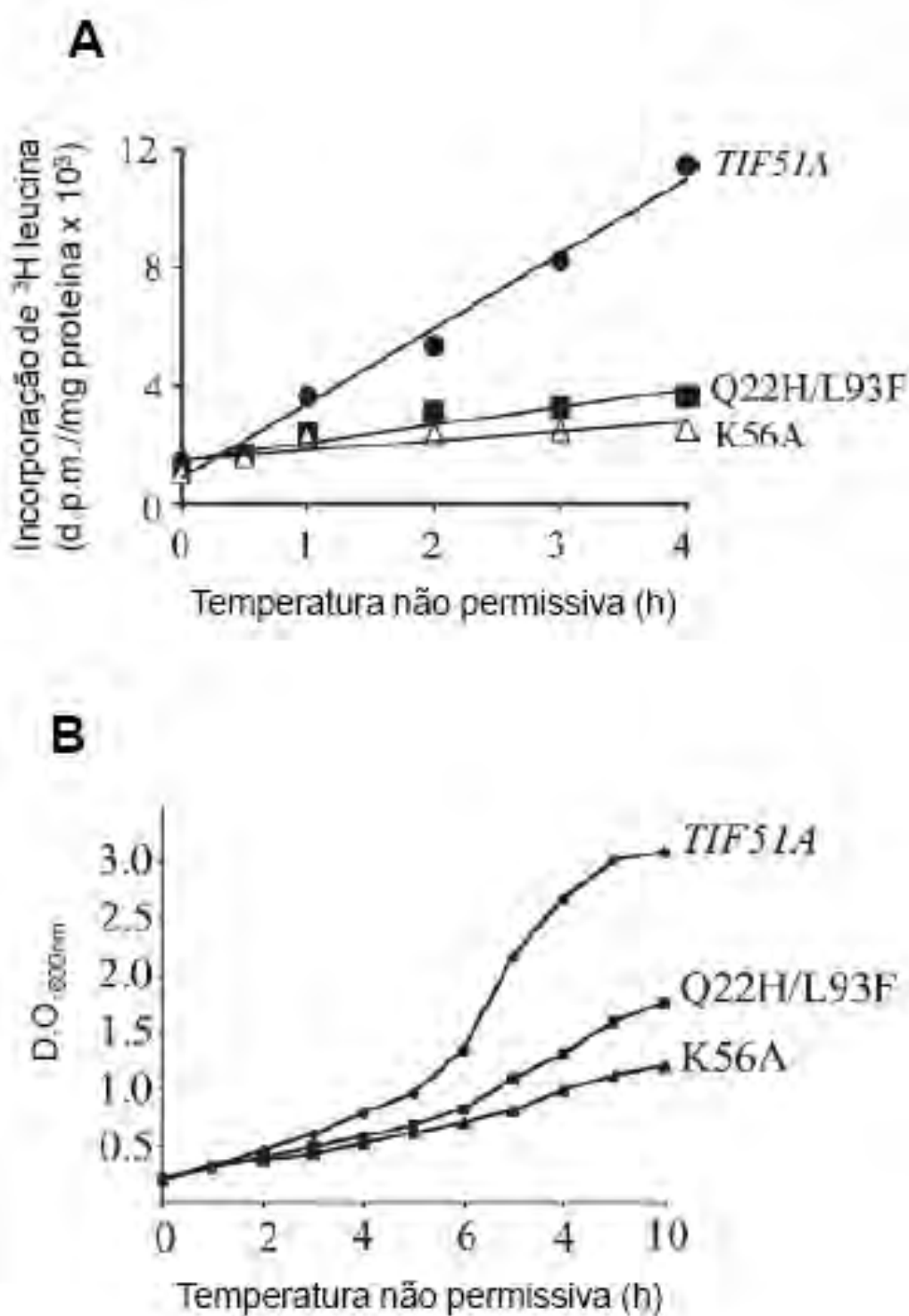


Figura 30. Caracterização do defeito celular dos dois mutantes de eIF5A que produzem a proteína estável na temperatura não permissiva. (A) Determinação dos níveis de síntese protéica das linhagens contendo *TIF51A* ou um dos alelos *tif51A*^{K56A} e *tif51A*^{Q22H/L93F}. (B) Curva de crescimento das linhagens contendo *TIF51A* ou um dos alelos *tif51A*^{K56A} e *tif51A*^{Q22H/L93F} na temperatura não permissiva.

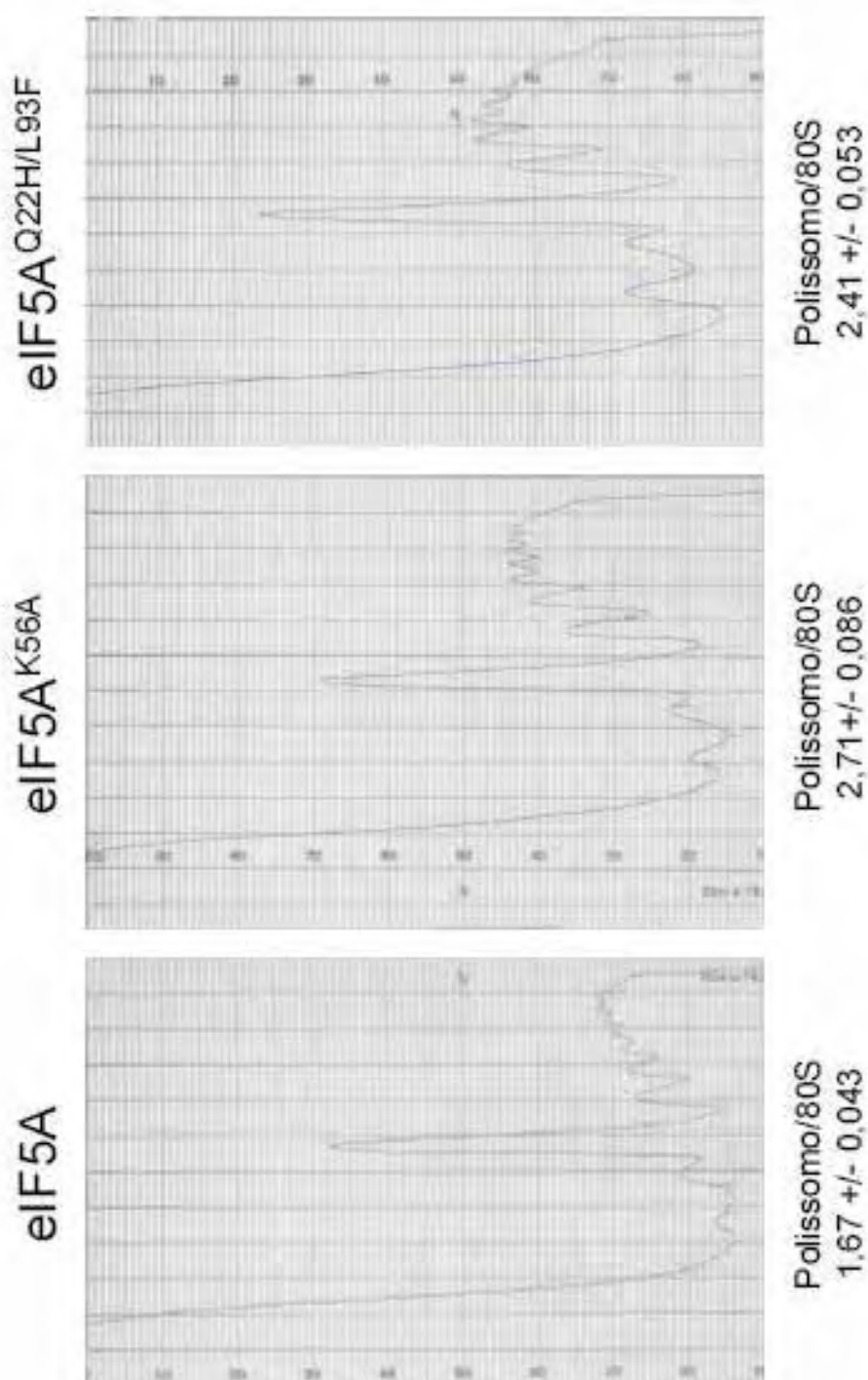


Figura 31. Perfil polissomal de eIF5A selvagem e mutadas. Extrato protéico das linhagens contendo os genes codificadores da proteína eIF5A selvagem (SVL530) ou dos mutantes eIF5A^{K56A} (VLZ634) ou eIF5A^{Q22H/L93F} (VZL599) foi submetido a ultracentrifugação seguida de análise das frações por luz ultravioleta 252nm. A proporção entre as áreas do polissomo e da fração 80S está indicada abaixo de cada gráfico.

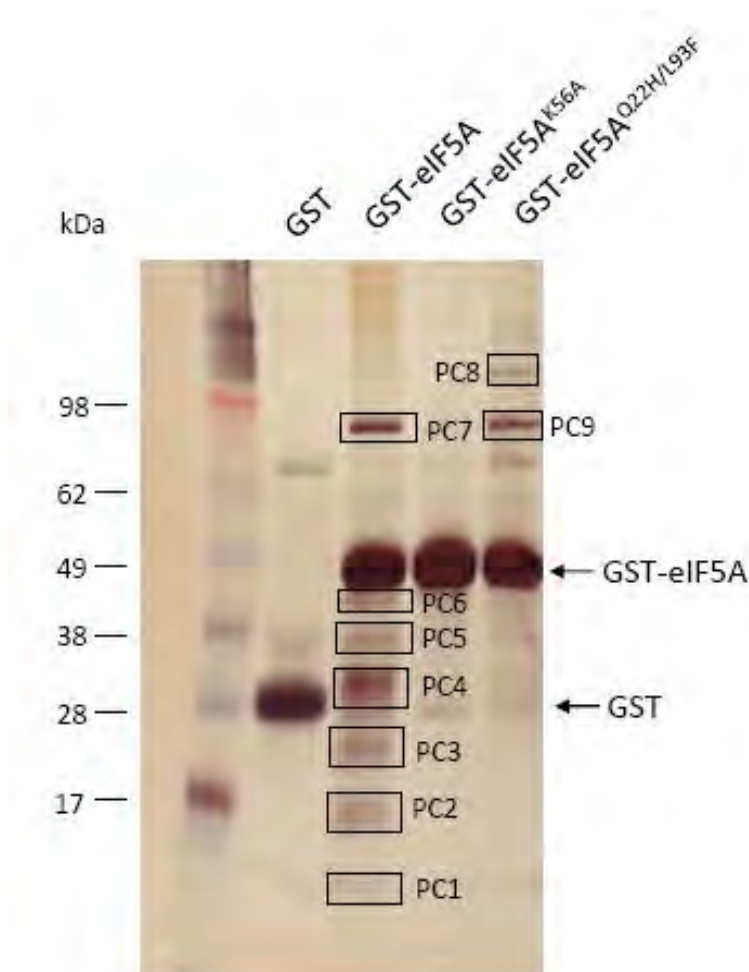


Figura 32. Busca de parceiros físicos por copurificação de eIF5A^{K56A} e eIF5AQ22H/L93F. A linhagem SVL55 contendo pSV20 (pYGEX-2T, canaleta 1), pSV36 (pYGEX-2T-*TIF51A*, canaleta 2), pVZ992 (pYGEX-2T-*tif51A*^{K56A}, canaleta 3) ou pVZ994 (pYGEX-*tif51A*^{Q22H/L93F}, canaleta 4) foi submetida ao experimento de copurificação e as amostras foram analisadas por gel SDS-PAGE 4-12% seguido de coloração por prata utilizando o kit SilverQuest (Invitrogen). A primeira canaleta contém o padrão de massa molecular e as setas indicam as proteínas GST (27kDa) ou GST-eIF5A (47kDa) selvagem e mutadas. As bandas indicadas pelos retângulos foram recortadas do gel e analisadas por espectrometria de massas. As proteínas identificadas foram PC1: L33A (12kDa). PC2: S17A (16kDa), S19A (16kDa), S15 (16kDa), S18 (17kDa), S20 (17kDa), S26 (14kDa). PC3: L6A (20kDa), L17A (21kDa), S9 (22kDa). PC4: S5(23kDa), L7B (28kDa), L2, S8 (23kDa), S01 (27kDa), S3 (26kDa), L13A (22kDa). PC5: L5 (34kDa), P0 (34Kda). PC6: L4A (40kDa). N-metyhyltransferase (68Kda). PC7: eEF2 (94 kda). PC8: GSTeIF5A (47kDa). PC9: eEF2 (94 kda).

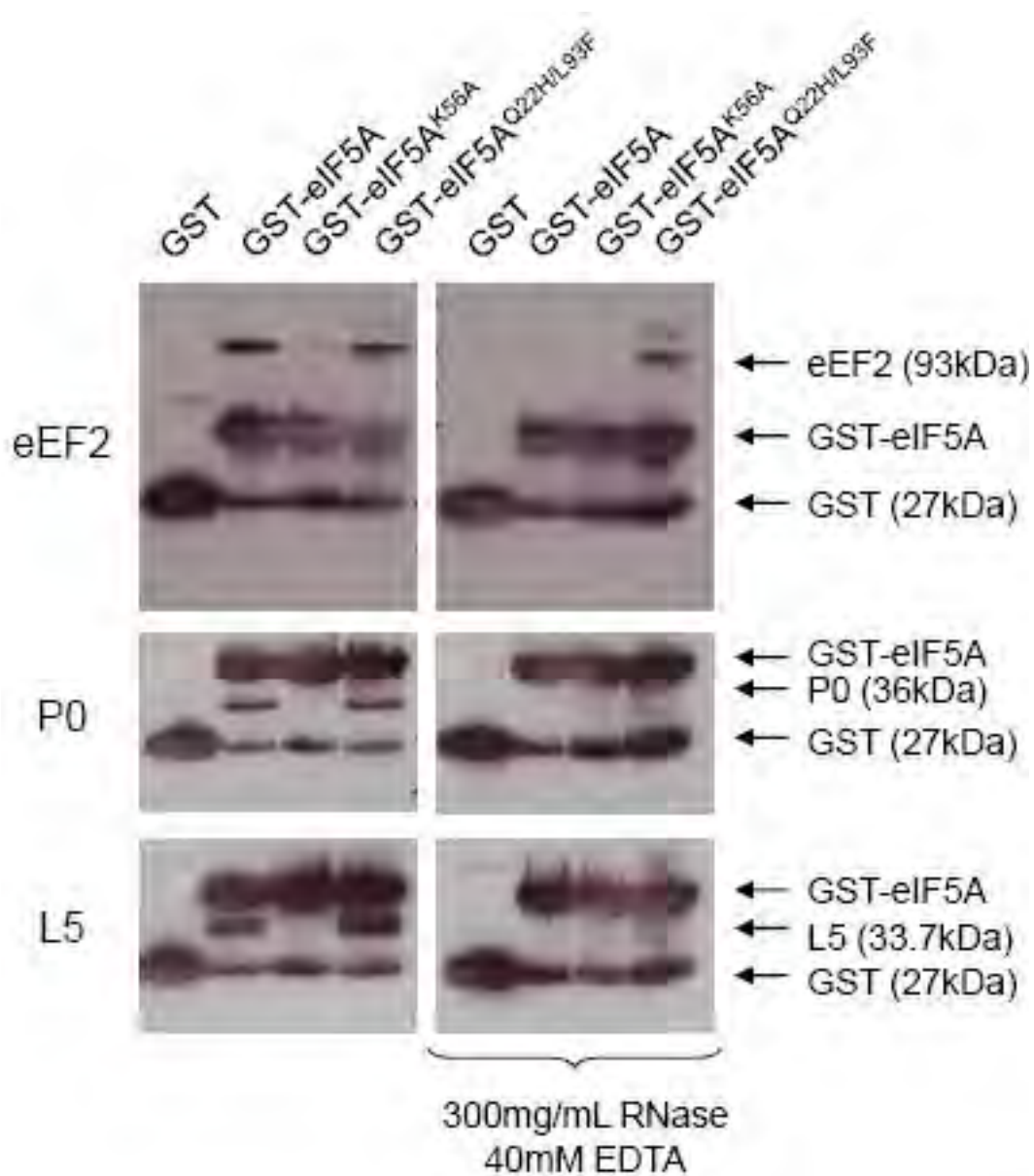


Figura 33. Identificação de parceiros físicos de eIF5A por ensaio de copurificação. As mesmas linhagens do experimento anterior foram submetidas ao experimento de copurificação na presença e ausência de 40mM de EDTA e 300µg/mL de RNase. Em seguida as amostras foram analisadas por gel SDS-PAGE 4-12% seguido de western blot utilizando como anticorpo primário anti-eEF2, anti-P0, anti-L5 ou anti-GST. As proteínas identificadas estão indicadas por setas, com seus respectivos tamanhos moleculares.

5- DISCUSSÃO

5.1- Análise estrutural de eIF5A

eIF5A é uma proteína ácida (pI 5,4), constituída de 157 aminoácidos (em *S. cerevisiae*) e com massa molecular de 18-21kDa, dependendo da espécie (Park *et al.*, 1997). Em janeiro de 2005, quando este trabalho foi iniciado, não se conhecia muito sobre a estrutura terciária da proteína eIF5A. Resolvidas por cristalografia, existiam apenas as proteínas das arqueas *M. jannaschii* (Kim *et al.*, 1997), *P. aerophilum* (Peat *et al.*, 1998) e *P. horikoshii* (Yao *et al.*, 2003). Ainda, a estrutura de eIF5A de humano havia sido modelada (Facchiano *et al.*, 2001). Sendo assim, naquele momento, a determinação da estrutura cristalográfica de eIF5A de *S. cerevisiae* mostrava-se importante para a continuidade do seu estudo, principalmente por se tratar de uma proteína essencial e a análise mutacional baseada em sua estrutura terciária apresentar-se como um instrumento interessante para a análise de sua função. Dessa maneira, a proteína eIF5A recombinante de *S. cerevisiae* foi produzida, purificada e submetida ao rastreamento de condição de cristalização.

Inicialmente, foi produzida a proteína sem “tag”, através da purificação por cromatografia de afinidade utilizando a proteína de fusão GST. No entanto, apesar do grande empenho dispensado no refinamento das condições de cristalização em que formaram-se apenas esferolitos, não foi obtido cristal de eIF5A. Sendo assim, novo rastreamento foi realizado, desta vez com a proteína eIF5A purificada contendo seis histidinas (Figura 7). A proteína 6xHis-eIF5A cristalizou na condição 30% PEG 400; 0,1M NaMES pH6,5; 0,1M MgCl₂ e glicerol 3%, e a estrutura de eIF5A de *S. cerevisiae* pôde ser resolvida (Figura 8). Devido a baixa resolução (3,352 Å), não foi possível visualizar as cadeias laterais dos aminoácidos de algumas regiões da estrutura obtida, no entanto, as estruturas secundárias que compõem a molécula de eIF5A foram determinadas com precisão e os dados obtidos foram depositados no “Protein Data Bank” (PDB ID 3ER0).

Concomitantemente a resolução da estrutura de eIF5A de *S. cerevisiae*, as estruturas homólogas dessa proteína de duas *Leishmanias* foram depositadas no PDB (PDB ID 1XTD, 1X6O) e a de humano foi recentemente resolvida (Tong *et al.*, 2009), as quais mostraram-se similares à estrutura de eIF5A de levedura. A análise

dessas estruturas mostrou eIF5A dividida em dois domínios, predominantemente compostos por estruturas secundárias irregulares, estruturas β e uma α -hélice no C-terminal. Curiosamente, as estruturas previamente determinadas das proteínas homólogas de eIF5A de arqueas não apresentam esta α -hélice no C-terminal ou possuem esta estrutura bastante reduzida (Kim *et al.*, 1997; Peat *et al.*, 1998; Yao *et al.*, 2003).

A comparação dos domínios de eIF5A com outras proteínas de estruturas tridimensionais conhecidas mostra que o domínio N-terminal possui um dobramento classificado como “Translation Protein SH3-like motif”, também presente em várias proteínas ribossomais e fatores de alongação da tradução, sendo descrito na literatura como mediador de ligações entre proteína e RNA. O domínio C-terminal, por sua vez, é similar a dobramentos de proteínas que se ligam a ácidos nucleicos de fita simples (OB-fold: “Single-stranded Oligonucleotide Binding Fold”) (<http://supfam.org/SUPERFAMILY>; Gough 2001), também presente em outros fatores envolvidos com a tradução (eIF1A, eIF2 α e outras proteínas ribossomais). Entretanto, enquanto a atividade de ligação de eIF1A ao RNA mensageiro é atribuída ao arranjo “OB-fold”, esta mesma estrutura encontrada em eIF2 α caracteriza-se como o local de sua fosforilação e regulação por diversas eIF2 quinases, não sendo clara a atividade de ligação de eIF2 α a RNA mensageiros no início da tradução. De fato, dois trabalhos sugerem a interação de eIF5A com RNA (Xu e Chen, 2001; Xu *et al.*, 2004). No entanto, estudos adicionais ainda necessitam ser realizados com o intuito de estabelecer um papel de eIF5A na interação física direta com mRNAs.

Até o momento, não foram identificadas proteínas homólogas de desoxihipusina sintase ou desoxihipusina hidroxilase em bactéria e, como esperado, o aminoácido hipusina também nunca foi encontrado nesses organismos (Park, 2006). Devido ao baixo rendimento obtido na purificação de eIF5A de tecido ou de levedura, todas as estruturas cristalográficas existentes dessa proteína foram obtidas a partir de proteínas recombinantes produzidas em bactéria e, como esperado, nenhuma destas estruturas apresentou o aminoácido hipusina. Sendo assim, com o propósito de obter quantidades suficientes de eIF5A hipusinada para ensaios de cristalização e de interação física com o ribossomo, os genes codificadores das proteínas hEIF5A, DHS e DOHH de humano foram clonados, sob o controle de um único promotor, no vetor policistrônico pST39 (Song Tan, *et al.*,

2001). As células expressando esses genes foram então submetidas a ensaios de hipusinação *in vivo* (Figuras 11 e 12) e depois de confirmada a produção de eIF5A hipusinada em bactéria, esta foi purificada por cromatografia de troca iônica, sendo obtido aproximadamente 50mg da proteína com alto grau de pureza a partir de 6L de cultura bacteriana (Figura 13 a 15). Esta proteína já está sendo submetida a ensaios de cristalização e apresenta-se como um reagente de grande importância para futuros estudos estruturais e funcionais de eIF5A. Além disso, um manuscrito descrevendo a produção e purificação de hEIF5A hipusinada em bactéria encontra-se em fase final de redação (Abstract no Anexo I).

Como mencionado anteriormente, foi descrito na literatura que eIF5A purificada de eritrócitos de humano apresentam-se como dímero em condições fisiológicas (Chung *et al.*, 1991). Mais de quinze anos depois, um homólogo de eIF5A em arquea foi descrito como tendo atividade ribonucleolítica específica *in vitro*, dependente do estado oligomérico da proteína (Wagner e Klug, 2007). Recentemente, foi publicado que eIF5A de *S. cerevisiae* forma dímero em solução de forma dependente do aminoácido hipusina e RNA mensageiro (Gentz *et al.*, 2008). Em posse destes resultados, o estado oligomérico de eIF5A de *S. cerevisiae* foi investigado neste trabalho por quatro técnicas diferentes: Cromatografia de exclusão molecular, SAXS, crosslinking e copurificação. Ao contrário do que foi publicado (Gentz *et al.*, 2008), este estudo demonstrou que eIF5A apresenta-se oligomerizada em solução, independentemente da existência do aminoácido hipusina, sendo que os ensaios de cromatografia de exclusão molecular e SAXS deixam claro que eIF5A é um dímero em solução (Figuras 16 a 19). De modo interessante, os resultados obtidos com o ensaio de copurificação sugerem que a dimerização ocorre *in vivo*, de forma dependente de RNA, mas independente da hipusina e do ribossomo estruturado, 80S (Figura 20). Estes dados fazem sentido se considerarmos que a hipusina não faz parte da superfície de contato entre as duas moléculas de eIF5A porque precisa estar livre para atuar como sítio ativo e funcional da proteína. Ainda, se considerarmos que eIF5A está envolvida no início da tradução, como já foi sugerido anteriormente (Benne e Hershey, 1978; Park *et al.*, 1993), o dímero de eIF5A pode ligar-se apenas ao RNA mensageiro ou ainda ao complexo de RNA mensageiro e subunidade 40S (complexo ternário do início da tradução apresentado na Figura 1), uma vez que a ligação a RNA mensageiro é essencial para a formação do dímero, ao contrário da ligação ao ribossomo 80S

(Figura 20). No entanto, estas são apenas suposições, uma vez que nenhum trabalho apresentado até hoje demonstra a funcionalidade e essencialidade da formação do dímero para a atividade de eIF5A. A determinação da superfície de contato entre as moléculas de eIF5A se faz necessária neste momento. Em posse deste conhecimento, será possível gerar mutantes dessa proteína que não se oligomerizam e, assim, determinar a funcionalidade do dímero.

Embora não exista o aminoácido hipusina em bactérias, as sequências de aminoácidos e as estruturas tridimensionais dos fatores de alongação em bactéria (EF-P) e de início da tradução em eucarioto (eIF5A) são bastante parecidas (Glick e Ganoza, 1975; Hanawa-Suetsugu *et al.*, 2004). EF-P é uma proteína ácida que está dividida em três domínios: Domínio I no N-terminal e domínios II e III no C-terminal. A estrutura cristalográfica dos domínios I e II de EF-P são sobreponíveis aos domínios N-terminal e C-terminal das estruturas de aIF5A (eIF5A de arquea), respectivamente (painel A da Figura 34). Curiosamente, a estrutura global de EF-P assemelha-se muito com a estrutura de tRNA (Hanawa-Suetsugu *et al.*, 2004) e com o envelope protéico gerado por SAXS da proteína eIF5A de *S. cerevisiae* (Figura 18), como pode ser visto nos painéis B e C da Figura 34.

EF-P é uma proteína essencial em bactérias que estimula a atividade peptidil-transferase de ribossomos (Glick e Ganoza, 1975). Assim como eIF5A, EF-P também estimula a síntese de metionil-puromicina *in vitro*, sugerindo, além da similaridade estrutural, uma conservação funcional entre EF-P e eIF5A (Park, 2006). Recentemente, foi mostrado que, embora EF-P não possua desoxihipusina ou hipusina, esta proteína de *E. coli* sofre uma modificação pós-traducional que adiciona uma massa de 144 em sua lisina 34, lisina esta localizada no sítio correspondente ao sítio onde se localiza a hipusina em arqueas e eucariotos (Aoki *et al.*, 2008). Além disso, foi proposto que EF-P interage com o sítio A do ribossomo 70S e inibe a ligação do RNA transportador nesse sítio (Aoki *et al.*, 2008). De modo interessante, o gene codificador do tRNA de alanina foi encontrado em nosso laboratório como supressor em alto número de cópias do fenótipo termossensível de mutantes de eIF5A (Watanabe *et al.*, resultados não publicados). Esse dado, aliado ao fato de que a estrutura de EF-P é bastante parecida com a estrutura global de um RNA transportador (Hanawa-Suetsugu *et al.*, 2004; Figura 36), fortalece a idéia apresentada por Aoki e colaboradores (Aoki *et al.*, 2008).

Por outro lado, a recente estrutura cristalográfica de EF-P ligado ao ribossomo

70S mostrou esse fator localizado entre os sítios P e E. (Blaha *et al.*, 2009). Este estudo propõe que EF-P facilita o posicionamento do tRNA iniciador no sítio P, estimulando a formação da primeira ligação peptídica (Blaha *et al.*, 2009). Os autores também propõem um modelo no qual eIF5A se posiciona de maneira similar no ribossomo 80S e a cadeia de hipusina fica estendida para o centro da peptidil transferase. Dessa maneira, a atividade que eIF5A apresentou de estimular a síntese *in vitro* de metionil puromicina seria explicada pelo envolvimento de eIF5A na formação da primeira ligação (Blaha *et al.*, 2009). No entanto, a conservação funcional de EF-P e eIF5A não pode ser assumida como verdade absoluta apenas devido à similaridade existente entre suas sequências de aminoácidos e estruturas cristalográficas. É importante enfatizar que estudos futuros de localização de eIF5A no ribossomo se fazem necessários para o melhor entendimento do papel de eIF5A no mecanismo de tradução.

eIF5A é uma proteína singular por vários fatores, mas dentre todos os mencionados, ressalta-se o fato de ser a única proteína na célula a ser ativada pela adição do aminoácido hipusina. No entanto, uma questão importante não resolvida até o presente momento é até que ponto a conservação na sequência de aminoácidos e na estrutura tridimensional de eIF5A reflete os requerimentos estruturais necessários para a sua interação com as enzimas modificadoras (desoxihipusina sintase e desoxihipusina hidroxilase) e/ou com os efetores que atuam abaixo de eIF5A na célula. Dentro desse contexto, foi realizada uma análise mutagênica da proteína eIF5A de *S. cerevisiae* com a finalidade de dissecar os elementos estruturais necessários para a atividade biológica desta proteína, assim como para sua modificação pós-traducional e, com isto, obter informações a respeito da função desempenhada por esta intrigante proteína. Parte dos resultados obtidos neste estudo foram publicados na revista “FEBS Journal” (“Structural modeling and mutational analysis of yeast eukaryotic translation initiation factor 5A reveal new critical residues and reinforce its involvement in protein synthesis” – Dias *et al.*, 2008 – Anexo II).

Sendo assim, 40 novos mutantes foram gerados e caracterizados neste trabalho, dos quais 19 não complementaram o nocaute do gene que codifica eIF5A, 13 mostraram-se termossensíveis e 8 não apresentaram fenótipo diferente do selvagem nas condições avaliadas (Tabela 6). Para avaliar a causa dos fenótipos apresentados pelos novos mutantes de eIF5A, os níveis dessa proteína foram analisados para cada novo alelo inviável ou termossensível de *TIF51A* (Tabela 6). Dos 13 mutantes novos termossensíveis testados, apenas 2 não apresentam degradação de eIF5A na temperatura não permissiva. Isso

significa que todos os outros mutantes possuem alteração em aminoácidos importantes para a estrutura e estabilidade da proteína, o que explica seus fenótipos.

Com o objetivo de verificar se existe relação entre a conservação dos resíduos substituídos em eIF5A e o fenótipo apresentado por esses mutantes em levedura, a conservação de cada resíduo de aminoácido substituído foi examinada pelo alinhamento múltiplo apresentado (Figura 4) e um levantamento estatístico avaliou a frequência e o tipo de conservação dos resíduos em todas as proteínas eIF5A e nas suas homólogas de arqueas (Figura 35). Pode-se verificar que no caso dos alelos com mutações únicas que apresentaram fenótipo de inviabilidade, todos os resíduos substituídos são 100% conservados entre os eucariotos analisados, com exceção do resíduo His54, e todos fazem parte da alça onde se localiza a hipusina. Os alelos termossensíveis com mutações únicas, por sua vez, possuem resíduos substituídos que são conservados em 90% dos eucariotos e em 80% de todos os organismos analisados, incluindo as arqueas. Por outro lado, os resíduos com menor conservação entre as espécies avaliadas são aqueles que foram substituídos nos alelos de eIF5A que não apresentaram fenótipo diferente do selvagem nas condições analisadas (72% conservados nos eucariotos e 50% em todos os organismos avaliados). Dessa maneira, parece ser bastante forte a relação entre o grau de conservação dos resíduos entre as espécies e os fenótipos apresentados pelos alelos com esses resíduos substituídos.

O gene codificador da proteína quinase C em levedura (*PKC1*) foi identificado como supressor em alto número de cópias do fenótipo do mutante *tif51A-1*^{P83S} (Valentini *et al.*, 2002). *PKC* está envolvido com integridade celular e mutantes desse gene tem seu fenótipo suprimido por sorbitol em ensaios típicos de monitoramento de integridade celular. Nesse contexto, também foi mostrado que os fenótipos dos alelos *tif51A-1*^{P83S}, *tif51A-2*^{P83L}, *tif51A-3*^{C39Y/G118D} são suprimidos pelo sorbitol, estabilizador osmótico celular (Valentini *et al.*, 2002), sugerindo que a função de eIF5A está ligada a integridade da parede celular. No entanto, mais recentemente, foi mostrado que o fenótipo do mutante *tif51A*^{L102A} é suprimido pelos componentes sorbitol ou PMSF devido à estabilização da proteína eIF5A mutada na temperatura não permissiva (Chatterjee *et al.*, 2006). Dessa maneira, a supressão fenotípica por ambos, sorbitol e PMSF, foi avaliada entre todos os mutantes de eIF5A. Como mostrado no painel B da Figura 22, a adição de 1M de sorbitol no meio de cultura suprimiu o fenótipos de termossensibilidade dos mutantes analisados e de todos os outros caracterizados nesse trabalho, mas a proteína eIF5A mutada não foi estabilizada na temperatura não permissiva (painel A da Figura 23), sugerindo que o mecanismo de supressão fenotípica por esse

composto é geral para os mutantes de eIF5A, mas não se dá pela estabilização da proteína mutada. Sorbitol não é capaz de substituir a proteína eIF5A no ensaio de complementação do nocaute do gene codificador dessa proteína e o mecanismo pelo qual sorbitol suprime o fenótipo dos mutantes de eIF5A não é claro. Essa substância promove, provavelmente, a viabilidade celular em linhagens com quantidades limitadas de eIF5A. Embora PMSF tenha suprimido o fenótipo termossensível do mutante *tsL102A* (Chatterjee *et al.*, 2006), a adição dessa substância no meio de cultura não melhorou o crescimento celular dos outros mutantes de eIF5A na temperatura não permissiva, demonstrando que PMSF não pode ser considerado um supressor geral do fenótipo dos mutantes de eIF5A.

O resíduo de lisina que sofre hipusinação está localizado na extremidade de uma alça exposta presente no domínio N-terminal (painel A da Figura 24). A transferência do grupo 4-amino-2-hidroxibutil para este aminoácido adiciona uma longa cadeia lateral básica no local da formação do aminoácido hipusina, o qual é rodeado por resíduos básicos e hidrofílicos (STSKTG-hipusina-HGHAK). Assim, para investigar se a carga positiva dessa região é importante para a estabilidade e/ou atividade dessa alça, novos mutantes foram gerados através de mutação sítio-dirigida, substituindo individualmente os resíduos G50, H52, G53 e K56 por alanina e os resíduos H52, H54 e K56 por ácido aspártico. Com exceção do mutante termossensível K56A, que por sinal é o último resíduo da alça de hipusinação, todos os outros mutantes avaliados (G50A, G50D, H52A, H52D, G53A, G53D, H54D e K56D) não foram capazes de substituir a proteína selvagem, no entanto apresentaram a proteína estável. Esses resultados sugerem que qualquer substituição na alça de hipusinação afeta a função de eIF5A, embora a substituição do resíduo K56 por outro carregado negativamente seja mais prejudicial para a atividade de eIF5A do que sua substituição por alanina, mas não prejudica sua estrutura terciária ao ponto de levar à degradação protéica, evidenciando uma atividade funcional para essa região protéica.

A essencialidade do aminoácido hipusina para a viabilidade celular é bem conhecida (Park *et al.*, 2009). O bloqueio da hipusinação, por substituição da lisina alvo (K51R) ou deleção do gene que codifica para desoxihipusina sintase em leveduras leva à inviabilidade celular. Recentemente, foi apresentado que o nocaute dos genes codificadores da enzima desoxihipusina sintase ou da proteína eIF5A de camundongo também levam à morte embrionária (Park *et al.*, 2009). Dessa maneira, foi investigado se esses mutantes de eIF5A com alteração na alça de hipusinação possuem o aminoácido hipusina, sendo possível verificar que nenhum deles sofre essa modificação pós-traducional, o que explica o fenótipo destes mutantes (Figura 24).

Apesar da baixa resolução da estrutura cristalográfica de eIF5A de *S. cerevisiae* obtida, a α -hélice do C-terminal está localizada em uma das poucas regiões que possui alta resolução, o que possibilitou a visualização das cadeias laterais dos aminoácidos que a compõem. Essa estrutura secundária é composta por três voltas, no entanto, ela aparece na Figura 8 sendo composta por apenas uma volta. Isso ocorre devido a um erro de reconhecimento do programa pymol, utilizado para a visualização da estrutura. Como mencionado, essa estrutura não está presente ou é menor nas estruturas resolvidas de homólogos de eIF5A em arqueas, no entanto este trabalho mostrou, por ensaios de western blot e dicroísmo circular, que essa α -hélice do C-terminal é essencial para a manutenção estrutural dessa proteína.

Outra diferença importante entre as estruturas de eIF5A de eucariotos e de seus homólogos em arquea é a presença apenas em eucariotos de uma extensão no domínio N-terminal (Figura 4). Em levedura, essa extensão N-terminal possui 14 resíduos, no entanto, a existência de uma forma de eIF5A sem os 10 resíduos de aminoácidos iniciais do N-terminal já foi descrito em levedura (Wohl *et al.*, 1993; Klier *et al.*, 1993). Dessa maneira, para verificar se a forma de eIF5A sem os 10 aminoácidos iniciais é viável, a proteína eIF5A foi gerada com deleção dos 10 resíduos iniciais e sua habilidade de substituir a proteína selvagem foi checada em diferentes temperaturas (painel B da Figura 22). Como pode ser observado, esse novo alelo substitui a proteína selvagem e demonstra que os 10 aminoácidos iniciais de eIF5A de levedura não são essenciais para sua atividade. Esse resultado está de acordo com os resultados apresentados com a proteína de humano em que as formas protéicas de eIF5A sem 6 ou 13 resíduos iniciais também são viáveis (Cano *et al.*, 2008).

5.2- Análise funcional de eIF5A

Embora a maioria dos mutantes de eIF5A apresentem fenótipo de termossensibilidade devido a degradação da proteína eIF5A mutada na temperatura não permissiva (Tabela 6), dois alelos mutantes novos de *TIF51A*, nomeados de *tif51A*^{K56A} e *tif51A*^{Q22H/L93F}, apresentam fenótipo de termossensibilidade mas não têm a proteína eIF5A degradada na temperatura não permissiva. Apesar de apresentarem a mesma localização celular da proteína selvagem (Figura 29), esses

mutantes termossensíveis apresentam defeito de crescimento, redução na síntese protéica total e aumento de polissomo na temperatura não permissiva (Figuras 30 e 31), fenótipos anteriormente encontrados em mutantes de proteínas envolvidas com a etapa de alongação da tradução. De fato, trabalhos recentes envolvem eIF5A com a alongação da tradução (Zanelli *et al.*, 2006; Gregio *et al.*, 2009; Sani *et al.*, 2009), mas não definem o mecanismo pelo qual eIF5A está envolvido com esse passo da tradução.

Desde que a hipusinação é essencial para a atividade de eIF5A, esses mutantes foram submetidos ao ensaio de hipusinação *in vivo* para avaliar se a falta do aminoácido hipusina era a causa da diminuição de crescimento na temperatura não permissiva para esses mutantes, no entanto, ambos serviram de substrato para a modificação pós-traducional de síntese de hipusina e essa hipótese foi descartada. No entanto, os níveis de hipusinação do mutante *tif51A*^{K56A} aparecem reduzidos já na temperatura permissiva o que pode explicar o seu crescimento lento nesta condição. Dessa maneira, não pode ser excluída a possibilidade da diminuição dos níveis de hipusina ser responsável pelo fenótipo termossensível do mutante *tif51A*^{K56A}.

Enquanto K56 é o último aminoácido da alça de hipusinação, as cadeias laterais dos resíduos Q22 e L93 estão voltadas para o solvente, o que é particularmente incomum para o aminoácido leucina. O fato dessas proteínas serem estáveis, aliado ao dado de que os aminoácidos Q22 e L93 estão voltados para o solvente, sugere que esses resíduos sejam importantes para a interação de eIF5A com algum ligante envolvido com a sua função, e o fenótipo apresentado por esses mutantes está diretamente relacionado com a perda dessa interação.

Sendo assim, foram realizados ensaios paralelos de copurificação com as linhagens selvagem e mutantes, para identificar proteínas que deixam de interagir com eIF5A na temperatura não permissiva de crescimento. Foi possível constatar que as proteínas eIF5A^{K56A} e eIF5A^{Q22H/L93F} perdem a interação com proteínas ribossomais na temperatura não permissiva, sendo essa a possível causa dos seus fenótipos (Figura 32). Esses resultados estão de acordo com outros previamente publicados que dizem que eIF5A copurifica com monossomos funcionalmente ativos (Zanelli *et al.*, 2006). De modo interessante, o mutante eIF5A^{Q22H/L93F} parece interagir diretamente com o fator de alongação eEF2 na temperatura não permissiva (Figura 33), o que sugere que em algum momento da tradução eIF5A interage diretamente

com esse fator e que o defeito do mutante eIF5A^{Q22H/L93F} possa ser justamente não conseguir se desligar de eEF2 para que a elongação da tradução prossiga corretamente.

Apesar de eIF5A ter sido denominado como um fator de início de tradução devido a sua capacidade de estimular a síntese *in vitro* de metionil-puromicina (Benne e Hershey, 1978; Park *et al.*, 1993), dados subsequentes não suportam essa idéia (Kang e Hershey, 1994; Zuk e Jacobson, 1998). Nos últimos anos, três trabalhos sugerem que eIF5A faça parte da elongação da tradução, interagindo funcionalmente com o fator de elongação eEF2 (Zanelli *et al.*, 2006; Gregio *et al.*, 2009; Saini *et al.*, 2009).

Embora muitos estudos defendam o envolvimento de eIF5A com a elongação da tradução, não existe informação sobre a maneira ou o mecanismo pelo qual essa proteína atua no ribossomo. Não é conhecido o sítio ribossomal de interação com eIF5A (sítios A, P, ou E), nem mesmo qual é o papel da hipusina nessa interação, embora já seja conhecido que o aminoácido hipusina é essencial para a interação com o ribossomo (Zaneli *et al.*, 2006). A relevância da interação física e funcional entre eEF2 e eIF5A precisa ser melhor investigada nos níveis moleculares e celulares. Ensaio estruturais futuros de ligação de eIF5A ao ribossomo poderão ajudar a elucidar o mecanismo pelo qual eIF5A atua na elongação da tradução.

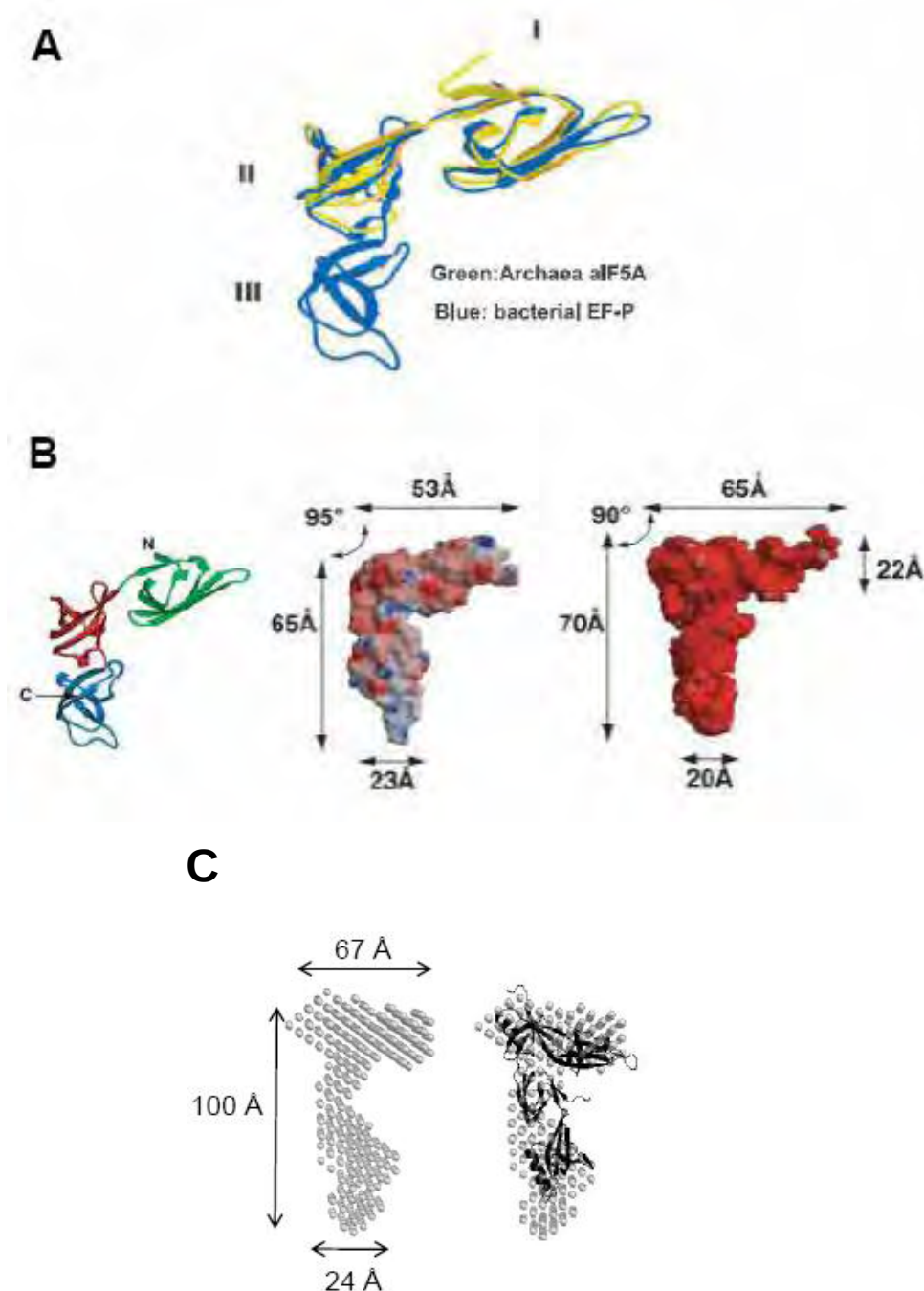


Figura 34. Comparação das estruturas tridimensionais de aIF5A, eIF5A e EF-P.

(A) Alinhamento das estruturas cristalográficas de aIF5A e EF-P (Figura adaptada de Park, 2006). (B) Comparação da estrutura cristalográfica de EF-P (duas primeiras figuras a esquerda) e a estrutura global do RNA transportador de fenilalanina de *S. cerevisiae* (Figura adaptada de Hanawa-Suetsugu *et al.*, 2004). (C) Reconstrução tridimensional da proteína 6xHis-yelF5A a partir das medidas obtidas por SAXS neste trabalho. O arranjo existente na célula unitária do cristal de 6xHis-yelF5A PDB (ID-3ER0) foi alinhado com a estrutura dessa proteína obtida por SAXS.

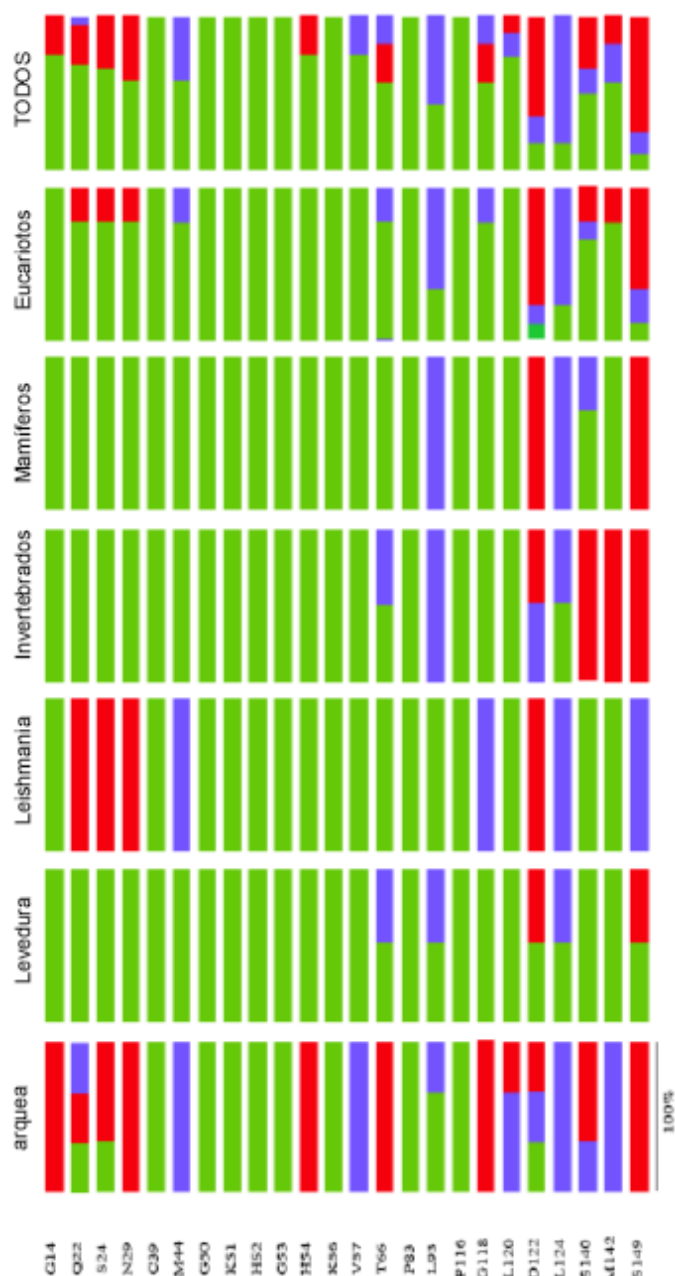


Figura 35. Conservação dos resíduos mutados de eIF5A de arqueas a eucariotos. Cada uma das 7 colunas representa a frequência e o tipo de conservação dos resíduos de eIF5A mutados, analisados a partir do alinhamento múltiplo entre vários organismos apresentado na Figura 5. TODOS compara todos os organismos do alinhamento. Verde = resíduos exatamente iguais aos apresentados nas leveduras, azul = mudanças conservadas (mudança para resíduos do mesmo grupo: não polar, alifático, aromático, polar, não carregado, carregado positivamente, carregado negativamente), vermelho = não conservado (mudança de grupo ou inexistência do resíduo).

6- CONCLUSÕES

- A estrutura cristalográfica de eIF5A de *S. cerevisiae* apresenta esta proteína dividida em dois domínios, predominantemente compostos por estruturas secundárias irregulares, fitas β e uma α -hélice no C-terminal.
- O domínio N-terminal de eIF5A possui um dobramento classificado como “Translation Protein SH3-like motif”, sendo descrito na literatura como mediador de ligações entre proteína e RNA.
- O domínio C-terminal de eIF5A é similar ao dobramento denominado OB-fold: “Single-stranded Oligonucleotide Binding Fold”, encontrado em proteínas que se ligam a ácidos nucleicos de fita simples.
- É possível produzir e purificar heIF5A hipusina recombinante de humano a partir de cultura bacteriana.
- A proteína eIF5A é um dímero em solução, independentemente do aminoácido hipusina.
- eIF5A se oligomeriza no extrato protéico celular de forma dependente de RNA.
- O envelope protéico gerado por SAXS da proteína eIF5A de *S. cerevisiae* assemelha-se muito com as estruturas de EF-P e tRNA.
- Qualquer alteração na alça de hipusinação não altera a estrutura protéica ao ponto de provocar a degradação da proteína, no entanto, leva à diminuição ou bloqueio completo da hipusinação e, conseqüentemente, inviabilidade celular.
- A α -hélice do C-terminal é essencial para a manutenção estrutural de eIF5A.
- Os 10 aminoácidos iniciais de eIF5A de levedura não são essenciais para sua atividade.
- O mecanismo de supressão fenotípica por sorbitol é geral para os mutantes de eIF5A, mas não se dá pela estabilização da proteína mutada.
- Os mutantes de eIF5A que não apresentam a proteína degradada na temperatura não permissiva de crescimento, apresentam defeitos celulares característicos de proteínas envolvidas com a etapa de elongação da tradução.

REFERÊNCIAS

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

AOKI, H.; XU, J.; EMILI, A.; CHOSAY, J. G.; GOLSHANI, A.; GANOZA, M. C. Interactions of elongation factor EF-P with the *Escherichia coli* ribosome. **FEBS J.**, v. 275, p. 671-681, 2008.

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

BARTIG, D.; SCHÜMANN, H.; KLINK, F. The unique posttranslational modification leading to deoxyhypusine or hypusine is a general feature of the archebacterial kingdom. **System. Appl. Microbiol.**, v. 13, p. 112-116, 1990.

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

BEVEC, D.; HAUBER, J. Eukaryotic initiation factor 5A activity and HIV-1 Rev function. **Biol. Signals**, v. 6, n. 3, p. 124-133, 1997.

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, n. 23, p. 10829-10833, 1994.

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**, v. 271, n. 5257, p. 1858-1860, 1996.

BLAHA, G.; STANLEY, R. E.; STEITZ, T. A. Formation of the first peptide bond: the structure of EF-P bound to the 70s ribosome. **Science**, v. 325, p. 966-970, 2009.

BULT, C. J.; WHITE, O.; OLSEN, G. J.; ZHOU, L.; FLEISCHMANN, R. D.; SUTTON, G. C.; BLAKE, J. A.; FITZGERALD, L. M.; CLAYTON, R. A.; GOCAYNE, J. D.; KELAVAGE, A. R.; DOUGHERTY, B. A.; TOMB, J. F.; ADAMS, M. D.; REICH, C. I.; OVERBEEK, R.; KIRKNESS, E. F.; WEINSTOCK, K. G.; MERRICK, J. M.; GLODEK, A.; SCOTT, J. L.; GEOGHAGEN, N. S.; VENTER, J. C. Complete genome sequence of the mathanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. **Science**, v. 273, n. 5278, p. 1058-73, 1996.

CANO, V. S. **Análise estrutural e funcional da interação física entre eIF5A e suas enzimas modificadoras em *Saccharomyces cerevisiae***. 2008. 177 f. Dissertação (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

CANO, V. S.; JEON, G. A.; JOHANSSON, H. E.; HENDERSON, C. A.; PARK, J. H.; VALENTINI, S. R.; HERSHEY, J. W.; PARK, M. H. Mutational analyses of human eIF5A-1 - identification of amino acid residues critical for eIF5A activity and hypusine modification. **FEBS J.**, v. 275, p. 44-58, 2008.

CHATTERJEE, I.; GROSS, S. R.; KINZY, T. G.; CHEN, K. Y. Rapid depletion of mutant eukaryotic initiation factor 5A at restrictive temperature reveals connections to actin cytoskeleton and cell cycle progression. **Mol. Genet. Genomics**, v. 275, n. 3, p. 264-276, 2006.

CHAUDHURI, J.; CHOWDHURY, D.; MAITRA, U. Distinct functions of eukaryotic translation initiation factors eIF1A and eIF3 in the formation of the 40 S ribosomal preinitiation complex. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 17975-17980, 1999.

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

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 synthase on the differentiation of mouse neuroblastoma and erythroleukemia cells. **Cancer Lett.**, v. 105, n. 2, p. 233-239, 1996.

CHUNG, S. H.; PARK, M. H.; FOLK, J. E.; LEWIS, M. S. Eukaryotic initiation factor 5A: the molecular form of the hypusine-containing protein from human erythrocytes. **B.B.A. Report**, v. 1076, p. 448-451, 1991.

CLEMENT, P. M.; HENDERSON, C. A.; JENKINS, Z. A.; SMIT-MCBRIDE, Z.; WOLFF, E. C.; HERSHEY, J. W.; PARK, M. H.; JOHANSSON, H. E. Identification and characterization of eukaryotic initiation factor 5A-2. **Eur. J Biochem.**, v. 270, n. 21, p. 4254-4263, 2003.

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

DELOCHE, O.; DE LA CRUZ, J.; KRESSLER, D.; DOERE, M.; LINDER, P. A membrane transport defect leads to a rapid attenuation of translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell**, v. 13, n. 3, p. 357-366, 2004.

EHRENBERG, M.; HAURYLIUK, V.; CRIST, C. G.; NAKAMURA, Y. Translation termination, the prion [PSI⁺], and ribosomal recycling. In: MATHEWS, M. B.; SONENBERG, N.; HERSHEY, J. W. B. **Translational control in biology and medicine**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2007. v. 1, cap. 7, p. 173-196.

FACCHIANO, A. M.; STIUSO, P.; CHIUSANO, M. L.; CARAGLIA, M.; GIUBERTI, G.; MARRA, M.; ABBRUZZESE, A.; COLONNA, G. Homology modelling of the human eukaryotic initiation factor 5A (eIF-5A). **Protein Eng.**, v. 14, n. 11, p. 881-890, 2001.

FAN-MINOGUE, H.; DU, M.; PISAREV, A. V.; KALLMEYER, A. K.; SALAS-MARCO, J.; KEELING, K. M.; THOMPSON, S. R.; PESTOVA, T. V.; BEDWELL, D. M. Distinct

eRF3 requirements suggest alternate eRF1 conformations mediate peptide release during eukaryotic translation termination. **Mol. Cell**, v. 30, p. 599-609, 2008.

FRIGIERI, M. C.; THOMPSON, G. M.; PANDOLFI, J. R.; ZANELLI, C. F.; VALENTINI, S. R. Use of a synthetic lethal screen to identify genes related to TIF51A in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genet. Mol. Res.**, v. 6, n. 1, p. 152-165, 2007.

GENTZ, P. M.; BLATCH, G. L.; DORRINGTON, R. A. Dimerization of the yeast eukaryotic translation initiation factor 5A requires hypusine and is RNA dependent. **FEBS J.**, v. 276, p. 695-706, 2009.

GINGRAS, A. C.; RAUGHT, B.; SONENBERG, N. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 68, p. 913-963, 1999.

GLICK, B. R.; GANOZA, M. C. Identification of a soluble protein that stimulates peptide bond synthesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 72, n. 11, p. 4257-4260, 1975.

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

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

GROPPO, R.; RICHTER, J. D. Translational control from head to tail. **Cur. Opi. in Cell Biol.**, v. 21, p. 444-451, 2009.

GUAN, X. Y.; SHAM, J. S.; TANG, T. C.; FANG, Y.; HUO, K. K.; YANG, J. M. Isolation of a novel candidate oncogene within a frequently amplified region at 3q26 in ovarian cancer. **Cancer Res.**, v. 61, n. 9, p. 3806-3809, 2001.

GUSTIN, M. C.; ALBERTYN, J.; ALEXANDER, M.; DAVENPORT, K. MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 62, n. 4, p. 1264-1300, 1998.

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

HANAUSKE-ABEL, H. M.; PARK, M. H.; HANAUSKE, A. R.; POPOWICZ, A. M.; LALANDE, M.; FOLK, J. E. Inhibition of the G1-S transition of the cell cycle by inhibitors of deoxyhypusine hydroxylation. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1221, n. 2, p. 115-124, 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. U. S. A.**, v. 101, n. 26, p. 9595-9600, 2004.

HENDERSON, B. R.; PERCIPALLE, P. Interactions between HIV Rev and nuclear import and export factors: the Rev nuclear localisation signal mediates specific binding to human importin-beta. **J. Mol. Biol.**, v. 274, n. 5, p. 693-707, 1997.

HOFMANN, W.; REICHART, B.; EWALD, A.; MULLER, E.; SCHMITT, I.; STAUBER, R. H.; LOTTSPREICH, F.; JOCKUSCH, B. M.; SCHEER, U.; HAUBER, J.; DABAUVALLE, M. C. Cofactor requirements for nuclear export of Rev response element (RRE)- and constitutive transport element (CTE)-containing retroviral RNAs. An unexpected role for actin. **J. Cell Biol.**, v. 152, n. 5, p. 895-910, 2001.

JAO, D. L.; CHEN, K. Y. Subcellular localization of the hypusine-containing eukaryotic initiation factor 5A by immunofluorescent staining and green fluorescent protein tagging. **J. Cell Biochem.**, v. 86, p. 590-600, 2002.

JAO, D. L.; CHEN, K. Y. Tandem affinity purification revealed the hypusinedependent binding of eukaryotic initiation factor 5A to the translating 80S ribosomal complex. **J. Cell Biochem.**, v. 97, n. 3, p. 583-598, 2006.

KANG, H. A.; HERSHEY, J. W. Effect of initiation factor eIF-5A depletion on protein synthesis and proliferation of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 6, p. 3934-3940, 1994.

KANG, H. A.; SCHWELBERGER, H. G.; HERSHEY, J. W. The two genes encoding protein synthesis initiation factor eIF-5A in *Saccharomyces cerevisiae* are members of a duplicated gene cluster. **Mol. Gen. Genet.**, v. 233, n. 3, p. 487-490, 1992.

KANG, H. A.; SCHWELBERGER, H. G.; HERSHEY, J. W. Translation initiation factor eIF-5A, the hypusine-containing protein, is phosphorylated on serine in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n. 20, p. 14750-14756, 1993.

KANG, K. R.; WOLFF, E. C.; PARK, M. H.; FOLK, J. E.; CHUNG, S. I. Identification of YHR068w in *Saccharomyces cerevisiae* chromosome VIII as a gene for deoxyhypusine synthase. Expression and characterization of the enzyme. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 31, p. 18408-18412, 1995.

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

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

KOZAK, M. Comparison of initiation of protein synthesis in prokaryotes, eukaryotes, and organelles. **Microbiol. Rev.**, v. 47, n. 1, p. 1-45, 1983.

KYRPIDES, N. C.; WOESE, C. R. Archaeal translation initiation revisited: the initiation factor 2 and eukaryotic initiation factor 2B alpha-beta-delta subunit families. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 95, n. 7, p. 3726-30, 1998.

LAMPHEAR, B. J.; KIRCHWEGGER, R.; SKERN, T.; RHOADS, R. E.; Mapping of functional domains in eukaryotic protein synthesis initiation factor 4G (eIF4G) with picornaviral proteases. Implications for cap-dependent and cap independent translational initiation. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 21975-21983, 1995.

LIAO, D. I.; WOLFF, E. C.; PARK, M. H.; DAVIES, D. R. Crystal structure of the NAD complex of human deoxyhypusine synthase: an enzyme with a ball-and-chain mechanism for blocking the active site. **Structure**, v. 6, n. 1, p. 23-32, 1998.

LIPOWSKY, G.; BISCHOFF, F. R.; SCHWARZMAIER, P.; KRAFT, R.; KOSTKA, S.; HARTMANN, E.; KUTAY, U.; GORLICH, D. Exportin 4: a mediator of a novel nuclear export pathway in higher eukaryotes. **Embo J.**, v. 19, n. 16, p. 4362-4371, 2000.

LIU, Y. P.; NEMEROFF, M.; YAN, Y. P.; CHEN, K. Y. Interaction of eukaryotic initiation factor 5A with the human immunodeficiency virus type 1 Rev response element RNA and U6 snRNA requires deoxyhypusine or hypusine modification. **Biol. Signals**, v. 6, n. 3, p. 166-174, 1997.

MAEDA, I.; KOHARA, Y.; YAMAMOTO, M.; SUGIMOTO, A. Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi. **Curr. Biol.**, v. 11, p.171-176, 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.**, v. 244, n. 6, p. 646-652, 1994.

MAJUMDAR, R.; BANDYOPADHYAY, A.; MAITRA, U. Mammalian translation initiation factor eIF1 functions with eIF1A and eIF3 in the formation of a stable 40 S preinitiation complex. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 6580-6587, 2003.

MEHTA, K. D.; LEUNG, D.; LEFEBVRE, L.; SMITH, M. The ANB1 locus of *Saccharomyces cerevisiae* encodes the protein synthesis initiation factor eIF-4D. **J. Biol. Chem.**, v. 265, n. 15, p. 8802-8807, 1990.

MERRICK, W. C. Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis.

Microbiol. Rev., v. 56, n. 2, p. 291-315, 1992.

MOAZED, D.; NOLLER, H. F. Transfer RNA shields specific nucleotides in 16S ribosomal RNA from attack by chemical probes. **Cell**, v. 47, p. 985-994, 1986.

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

NELSON, D. L.; COX, M. M. Protein metabolism. In:_____ . **Lehninger principles of biochemistry**. 4th ed. New York: W. H. Freeman, 2004. Cap. 28, p. 1066.

NYGARD, O.; NILSSON, L. Translational dynamics: interactions between the translation factors, tRNA and ribosomes during eukaryotic protein synthesis. **Eur. J. Biochem.**, v. 191, p. 1-17, 1990.

PATEL, P. H.; COSTA-MATTIOLO, M.; SCHULZE, K. L.; BELLEN, H. J. The *Drosophila* deoxyhypusine hydroxylase homologue nero and its target eIF5A are required for cell growth and the regulation of autophagy. **J. Cell Biol.**, v. 185, p. 1181-1194, 2009.

PARK, J. H.; WOLFF, E. C.; FOLK, J. E.; PARK, M. H. Reversal of the deoxyhypusine synthesis reaction. Generation of spermidine or homospermidine from deoxyhypusine by deoxyhypusine synthase. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 35, p. 32683-32691, 2003.

PARK, J. H.; ARAVIND, L.; WOLFF, E. C.; KAEVEL, J.; KIM, Y. S.; PARK, M. H. Molecular cloning, expression, and structural prediction of deoxyhypusine hydroxylase: a HEAT-repeat-containing metalloenzyme. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 103, n. 1, p. 51-56, 2006.

PARK, M. H. The essential role of hypusine in eukaryotic translation initiation factor 4D (eIF-4D). Purification of eIF-4D and its precursors and comparison of their activities. **J. Biol. Chem.**, v. 264, n. 31, p. 18531-18535, 1989.

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

PARK, M. H.; COOPER, H. L.; FOLK, J. E. Identification of hypusine, an unusual amino acid, in a protein from human lymphocytes and of spermidine as its biosynthetic precursor. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 78, n. 5, p. 2869-2873, 1981.

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

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

PARK, M. H.; LEE, Y. B.; JOE, Y. A. Hypusine is essential for eukaryotic cell proliferation. **Biol. Signals**, v. 6, n. 3, p. 115-123, 1997.

PARK, M. H.; WOLFF, E. C.; FOLK, J. E. Is hypusine essential for eukaryotic cell proliferation? **Trends Biochem. Sci.**, v. 18, n. 12, p. 475-479, 1993a.

PARK, M. H.; WOLFF, E. C.; FOLK, J. E. Hypusine: its post-translational formation in eukaryotic initiation factor 5A and its potential role in cellular regulation. **Biofactors**, v. 4, n. 2, p. 95-104, 1993b.

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

PARK, M. H.; WOLFF, E. C.; LEE, Y. B.; FOLK, J. E. Antiproliferative effects of inhibitors of deoxyhypusine synthase. Inhibition of growth of Chinese hamster ovary cells by guanyl diamines. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 45, p. 27827-27832, 1994.

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

PARKER, R.; SHETH, U. P bodies and the control of mRNA translation and degradation. **Mol. Cell**, n. 25, p. 635-646, 2007.

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**, v. 6, n. 9, p. 1207-1214, 1998.

PESTOVA, T. V.; KOLUPAEVA, V. G. The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection. **Genes**, v. 16, p. 2906-2922, 2002.

PESTOVA, T. V.; BORUKHOV, S. I.; HELLEN, C. U. Eukaryotic ribosomes require initiation factors 1 and 1A to locate initiation codons. **Nature**, v. 394, p. 854-859, 1998.

PESTOVA, T. V.; LORSCH, J. R.; HELLEN, C. U. The mechanism of translation initiation in eukaryotes. In: MATHEWS, M. B.; SONENBERG, N.; HERSHEY, J. W. B. **Translational control in biology and medicine**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2007. v. 1, cap. 4, 87-128.

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.

PISAREVA, V. P.; PISAREV, A. V.; KOMAR, A. A.; HELLEN, C. U.; PESTOVA, T. V. Translation initiation on mammalian mRNAs with structured 5'UTRs requires DExH-box protein DHX29. **Cell**, v. 135, p. 1237-1250, 2008.

RAUGHT, B.; GINGRAS, A. C. Signaling to translation initiation. In: MATHEWS, M. B.; SONENBERG, N.; HERSHEY, J. W. B. **Translational control in biology and medicine**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2007. v. 14, p. 369-400.

REDPATH, N. T.; PRICE, N. T.; SEVERINOV, K. V.; PROUD, C. G. Regulation of elongation factor-2 by multisite phosphorylation. **Eur. J. Biochem.**, v. 213, p. 689-699, 1993.

RUHL, M.; HIMMELSPACH, M.; BAHR, G. M.; HAMMERSCHMID, F.; JAKSCHE, H.; WOLFF, B.; ASCHAUER, H.; FARRINGTON, G. K.; PROBST, H.; BEVEC, D. Eukaryotic initiation factor 5A is a cellular target of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain mediating trans-activation. **J. Cell Biol.**, v. 123, n. 6, pt. 1, p. 1309-1320, 1993.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SASAKI, K.; ABID, M. R.; MIYAZAKI, M. Deoxyhypusine synthase gene is essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Lett.**, v. 384, n. 2, p. 151-154, 1996.

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

SCHATZ, O.; OFT, M.; DASCHER, C.; SCHEBESTA, M.; ROSORIUS, O.; JAKSCHE, H.; DOBROVNIK, M.; BEVEC, D.; HAUBER, J. Interaction of the HIV-1 rev cofactor eukaryotic initiation factor 5A with ribosomal protein L5. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 95, n. 4, p. 1607-1612, 1998.

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

SCHRADER, R.; YOUNG, C.; KOZIAN, D.; HOFFMANN, R.; LOTTSPREICH, F. Temperature-sensitive eIF5A mutant accumulates transcripts targeted to the nonsense-mediated decay pathway. **J. Biol. Chem.**, v. 281, n. 46, p. 35336-35346, 2006.

SCHWELBERGER, H. G.; KANG, H. A.; HERSHEY, J. W. Translation initiation factor eIF-5A expressed from either of two yeast genes or from human cDNA. Functional identity under aerobic and anaerobic conditions. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n. 19, p. 14018-14025, 1993.

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**, v. 6, n. 3, p. 143-149, 1997.

SHI, X. P.; YIN, K. C.; ZIMOLO, Z. A.; STERN, A. M.; WAXMAN, L. The subcellular distribution of eukaryotic translation initiation factor, eIF-5A, in cultured cells. **Exp. Cell Res.**, v. 225, n. 2, p. 348-356, 1996a.

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**, v. 1310, n. 1, p. 119-126, 1996b.

SHIBA, T.; MIZOTE, H.; KANEKO, T.; NAKAJIMA, T.; KAKIMOTO, Y. Hypusine, a new amino acid occurring in bovine brain. Isolation and structural determination. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 244, n. 3, p. 523-531, 1971.

SMIT-McBRIDE, Z.; SCHNIER, J.; KAUFMAN, R. J.; HERSHEY, J. W. Protein synthesis initiation factor eIF-4D. Functional comparison of native and unhyposinated forms of the protein. **J. Biol. Chem.**, v. 264, n. 31, p. 18527-18530, 1989.

SONENBERG, N.; HINNEBUSCH, A. G. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. **Cell**, v. 136, p. 731-745, 2009.

SONG, T. A modular polycistronic expression system for overexpressing protein complexes in *Escherichia coli*. **Prot. Exp. and Purif.** v. 21, p. 224-234, 2001.

SPRADLING, A. C.; STERN, D.; BEATON, A.; RHEM, E. J.; LAVERTY, T.; MOZDEN, N.; MISRA, S.; RUBIN, G. M. The Berkeley Drosophila Genome Project gene disruption project: single P-element insertions mutating 25% of vital Drosophila genes. **Genetics**, v. 153, n. 1, p. 135-177, 1999.

TAYLOR, D. J.; FRANK, J.; KINZY, T. G. Structure and function of the eukaryotic ribosome and elongation factors. In: MATHEWS, M. B.; SONENBERG, N.; HERSHEY, J. W. B. **Translational control in biology and medicine**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2007. v. 1, cap. 3, p. 59-86.

TOME, M. E.; GERNER, E. W. Cellular eukaryotic initiation factor 5A content as a mediator of polyamine effects on growth and apoptosis. **Biol. Signals**, v. 6, n. 3, p. 150-156, 1997.

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

THOMPSON, G. M.; CANO, V. S. P.; VALENTINI, S. R. Mapping eIF5A binding sites for Dys1 and Lia1: *In vivo* evidence for regulation of eIF5A hypusination. **FEBS Lett.**, v. 555, p. 464-468, 2003.

UMLAND, T. C.; WOLFF, E. C.; PARK, M. H.; DAVIES, D. R. A new crystal structure of deoxyhypusine synthase reveals the configuration of the active enzyme and of an enzyme.NAD.inhibitor ternary complex. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 27, p. 28697- 28705, 2004.

VALENTINI, S. R.; CASOLARI, J. M.; OLIVEIRA, C. C.; SILVER, P. A.; McBRIDE, A. E. Genetic interactions of yeast eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) reveal connections to poly(A)-binding protein and protein kinase C signaling. **Genetics**, v. 160, n. 2, p. 393-405, 2002.

WAGNER, S.; KLUG, G. An archaeal protein with homology to the eukaryotic translation initiation factor 5A shows ribonucleolytic activity. **J. Biol. Chem.**, v. 282, n. 19, p. 13966-76, 2007.

WOHL, T.; BAUR, M.; FRIEDL, A. A.; LOTTSPEICH, F. Chromosomal localization of the HYP2-gene in *Saccharomyces cerevisiae* and use of pulsed-field gel electrophoresis for detection of irregular recombination events in gene disruption experiments. **Electrophoresis**, v. 13, n. 9-10, p. 651-653, 1992.

WOHL, T.; KLIER, H.; AMMER, H.; LOTTSPEICH, F.; MAGDOLEN, V. The HYP2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is essential for aerobic growth: characterization of different isoforms of the hypusine-containing protein Hyp2p and analysis of gene disruption mutants. **Mol. Gen. Genet.**, v. 241, n. 3-4, p. 305-311, 1993.

WOLFF, E. C.; KANG, K. R.; KIM, Y. S.; PARK, M. H. Posttranslational synthesis of hypusine: evolutionary progression and specificity of the hypusine modification. **Amino Acids**, v. 33, n. 2, p. 341-350, 2007.

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. 2555-2561, 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, pt. 3, p. 585-590, 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.**, v. 133, n. 1, p. 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**, v. 171, n. 4, p. 1571-1581, 2005.

ZANELLI, C. F.; VALENTINI, S. R. Is there a role for eIF5A in translation? **Amino Acids**, v. 33, n. 2, p. 351-358, 2007.

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

ZITOMER, R. S.; LOWRY, C. V. Regulation of gene expression by oxygen in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol. Rev.**, v. 56, n. 1, p. 1-11, 1992.

ZUK, D.; JACOBSON, A. A single amino acid substitution in yeast eIF-5A results in mRNA stabilization. **Embo J.**, v. 17, n. 10, p. 2914-2925, 1998.