

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

**Impacto da interrupção traducional no destino metabólico de polipeptídeos
recém-sintetizados em *Saccharomyces cerevisiae***

Ruth Maria Samaniego Valdez

Orientador: Erich Birelli Tahara

Belo Horizonte

Março, 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

**Impacto da interrupção traducional no destino metabólico de polipeptídeos
recém-sintetizados em *Saccharomyces cerevisiae***

Ruth Maria Samaniego Valdez

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientador: Erich Birelli Tahara

Belo Horizonte

Março, 2018

A mis padres, Víctor Samaniego e Isabel Valdez de Samaniego, y hijos: David, Belén, Vicky, Lucas, JuanJo con todo mi amor.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, porque foi Ele quem me ensinou que nada é impossível, que perante qualquer dificuldade não deveria desistir. Pois Ele tem me sustentado durante todo meu curso e que no final viria a recompensa de todo o esforço.

De uma forma especial agradeço ao professor Erich Tahara, o melhor orientador que alguém poderia ter, não só profissionalmente, mas como amigo. Tudo o que aprendi, desde o mais simples até o mais complexo, foi ensinado com muita paciência e dedicação. Passamos por muitas dificuldades de adaptação, dificuldades técnicas, mas sempre ele soube me orientar nesses obstáculos. Com todas essas experiências amadureci muito profissionalmente e como pessoa. (Um agradecimento especial à Marina, esposa do Erich, pelas caronas oferecidas.) (E muito grata também ao senhor por abrir mãos das férias, dos fins de semanas, dos descansos.)

Aos professores Carlos Renato Machado e Glória Regina Franco pelas dicas e observações nas reuniões, e por terem me acolhido no LGB.

Aos Profs. Ronaldo Nagem e Dawidson Gomes por terem-me permitido utilizar equipamentos de seus laboratórios.

Ao Prof. Lucas Bleicher, por ter ajudado a lidar com as proteínas.

Aos membros do melhor laboratório do ICB – LGB –, que participaram de todo o processo de aprendizagem, e fizeram parte do meu dia-a-dia, ajudando nos protocolos, nas dicas, nas horas de tristezas e alegrias. Começando pelos Brunos (1 e 2), Verônica, Natalia, Tiago Bruno, Héllida, William, Heron, Wesley, Roberto, Priscila, Dani, Dani Chame, e os demais Gloriosos (bioinformatas).

Agradeço em especial as “Erichetes”, meu grupo de lutas e vitórias: Rachel (“Ruth! Precisa de ajuda?”), Mayara, Marcela e Lainy (a melhor amiga e colega que Deus me deu). Sou grata a cada uma delas pela ajuda incondicional, pelas fofocas, pelas tardes de café e pão da alegria, pela companhia.

À meus amigos espalhados pela UFMG: colegas de Português, colegas de Bases, Arun, Jamal, e em especial a Edleusa, Wesley, John colombiano pelos reagentes doados, pela predisposição de me ajudar em todo momento.

À Mariana Costa, um doce de pessoa, sempre me alentando com um “Ruth, vai dar certo!”, pela ajuda com as modelagens das proteínas, nas clonagens e inúmeras dicas durante a realização dos experimentos.

À Camila, ao Jamil, ao Pablo, por terem fornecido reagentes indispensáveis para a realização deste trabalho.

Aos funcionários do Instituto, aos funcionários da secretaria, às mocas da limpeza pelo “bom dia, tá jóia?”.

Aos donos da minha morada, Rosa e Popó: muito grata pelos seus cuidados, suas disponibilidades para qualquer imprevisto.

Às colegas da minha morada, por respeitar minhas horas de estudo e descanso.

Aos meus inumeráveis irmãos da minha igreja: Deus tem me abençoado por tê-los conhecidos, grata por suas orações.

À minha segunda mãe Lucila, por todo seu carinho, pelos conselhos, pelos almoços gostosos, pela canjica. E à meu irmãozinho Isac.

Às minhas amigas do Regaa boff: Joquebede (Jô), Mariana, Rebecca, Debora, Karine, Lídia, Ana Vitoria, Ana Laura, Gaby, Priscila, tia Dilma, Caro, Manu, Kerina, Maeli, Nivia, Gissely, Raquel, Rute, Kellen, Gaby 2, Aninha, Sara, Isabel, Miriã, Lorraine, pelos fins de semanas abençoados, pelo amor e atenção de cada uma delas.

Agradeço de coração à todas estas pessoas citadas e às que não foram citadas (porque teria folhas e folhas de agradecimentos): cada uma delas foram parte da realização e conclusão deste trabalho, direta ou indiretamente.

Aos órgãos financiadores deste trabalho: CAPES, OEA.

SUMÁRIO

RESUMO	I
ABSTRACT.....	II
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABELAS	IV
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Tradução.....	1
1.2. Controle de qualidade em síntese de proteína	3
1.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como organismo modelo	6
2. JUSTIFICATIVA.....	8
3. OBJETIVOS	9
4. MATERIAIS E MÉTODOS	10
4.1. Linhagens de <i>Escherichia coli</i>	10
4.2. Linhagens parentais e mutantes de <i>S. cerevisiae</i>	10
4.3. Meios de cultura, cultivo de microrganismos e seu armazenamento	10
4.3.1. Para <i>E. coli</i>	10
4.3.2. Para <i>S. cerevisiae</i>	11
4.4. Extração de DNA genômico de <i>S. cerevisiae</i>	11
4.5. Desenho de oligonucleotídeos para obtenção de repórteres, cassete de deleção e realização de genotipagem	12
4.6. Reação da polimerase em cadeia.....	13
4.7. Purificação de amplicons e produtos de digestão.....	14
4.8. Digestão enzimática e ligação dos fragmentos de DNA	14
4.9. Transformação de <i>E. coli</i> competente	15
4.10. Identificação de clones positivos de <i>E. coli</i> e sequenciamento de construções	15
4.11. Transformação de <i>S. cerevisiae</i>	16
4.12. Ensaio de toxicidade à higromicina B.....	17
4.13. Obtenção do extrato solúvel total de <i>S. cerevisiae</i>	17
4.14. Quantificação de proteína.....	17

4.15. <i>Western blotting</i>	18
4.16. Construção dos modelos tridimensionais de Hel2p e Rqc1p	18
5. RESULTADOS	20
5.1. Construção de modelos tridimensionais de Hel2p e Rqc1p	20
5.2. Deleção de <i>LTN1</i> nos mutantes <i>rpl11bΔ</i> , <i>asc1Δ</i> , <i>hel2Δ</i> e <i>rqc1Δ</i>	21
5.3. Ensaio de toxicidade à higromicina B	23
5.4. Construção de repórteres para o estudo da interrupção traducional em <i>S. cerevisiae</i>	25
5.5. Verificação do crescimento celular de transformantes de <i>S. cerevisiae</i>	27
5.6. Determinação do destino metabólico de polipeptídeos recém-sintetizados presos ao ribossomo.	28
6. DISCUSSÃO.....	32
7. CONCLUSÕES.....	35
8. PERSPECTIVAS	36
9. BIBLIOGRAFIA.....	37

RESUMO

A interrupção da tradução em eucariotos por mRNAs desprovidos de códons de terminação, ou contendo códons raros, ou ainda que sofreram clivagem acidental, é capaz de recrutar aos ribossomos sequestrados o complexo RQC, responsável pela ubiquitinação do polipeptídeo defeituoso recém-sintetizado, marcando-o para a degradação proteossomal. Em *Saccharomyces cerevisiae*, a ausência da proteína ubiquitina ligase E3 Ltn1p promove a formação de agregados proteicos a partir dos polipeptídeos defeituosos não-degradados pela atividade da proteína Tae2p. Através do uso de repórteres que promovem a interrupção traducional, identificamos que a agregação de polipeptídeos sintetizados por mRNAs contendo códons raros necessita da atividade de Hel2p, uma proteína associada ao ribossomo. Curiosamente, Hel2p também parece estar relacionada com a degradação desses polipeptídeos defeituosos recém-sintetizados a partir de mRNAs que sofrem clivagem acidental em sua região codificante. Além disso, verificamos que a proteína Rqc1p promove grande sensibilidade à higromicina B, antibiótico aminoglicosídico que promove *frameshifting* tradicional. Em conjunto, nossos dados abrem a possibilidade de execução de um estudo mais aprofundado sobre os mecanismos de geração de agregados proteicos em decorrência de defeitos da tradução, que podem estar relacionados à ocorrência de doenças neurodegenerativas.

ABSTRACT

Translational arrest in eukaryotes promoted by mRNAs lacking stop-codons, or harboring rare codons, or those which undergo accidental cleavage, is capable of recruiting the RQC (Ribosome Quality Control) complex towards ribosomes. The RQC complex is responsible for the ubiquitination of the newly-synthesized, defective polypeptides, marking them for proteasomal degradation. In *S. cerevisiae*, the absence of the ubiquitin ligase E3 Ltn1p promotes the formation of protein aggregates from non-degraded defective polypeptides due to the activity of Tae2p. Using reporters that promote translational arrest, we observed that the aggregation of polypeptides synthesized from mRNAs containing rare codons requires the activity of Hel2p, a ribosome-associated protein. Interestingly, Hel2p also appears to be related to the degradation of newly-synthesized defective polypeptides from mRNAs that undergo accidental cleavage inside their coding region. In addition, we verified that the Rqc1p protein promotes high sensitivity to hygromycin B, an aminoglycoside that promotes translational frameshifting. Altogether, our data open the possibility of carrying out a more detailed study on the mechanisms of generation of protein aggregates as a result of translation defects, which may be related to neurodegenerative diseases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama representativo da atividade do complexo RQC.....	19
Figura 2: Representação estrutural da proteína Rpl1bp.....	19
Figura 3: Representação do tipo fita da estrutura cristalina de Asc1p.....	20
Figura 4: Representação do tipo fita de modelos tridimensionais de Hel2p e Rqc1p preditos pelo servidor para predição de estrutura e função de proteínas I-TASSER.....	36
Figura 5: Deleção de <i>LTN1</i> nos mutantes <i>rpl1bΔ</i> , <i>asc1Δ</i> , <i>hel2Δ</i> e <i>rqc1Δ</i>	39
Figura 6: Ensaio de toxicidade à higromicina B.....	41
Figura 7: Construção de repórteres para o estudo da interrupção traducional em <i>S. cerevisiae</i>	43
Figura 8: Resultados do sequenciamento dos repórteres.....	44
Figura 9: Teste de crescimento em meio sólido SGal.....	45
Figura 10: Determinação do destino metabólico de polipeptídeos recém-sintetizados presos aos ribossomos.....	48
Figura 11: Efeitos da deleção de <i>ASCI</i> , <i>RQC1</i> , <i>LTN1</i> e <i>HEL2</i> em <i>S. cerevisiae</i>	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos mutantes BY4741 utilizados nesse trabalho.	10
Tabela 2. Oligonucleotídeos para obtenção de cassete de deleção de <i>LTNI</i> e realização de genotipagem.	12
Tabela 3. Oligonucleotídeos para construção de repórteres..	13
Tabela 4. Protocolo utilizado para PCRs executadas neste trabalho.	13

1. INTRODUÇÃO

1.1. Tradução

Diferentemente do material genético procariótico, o DNA dos eucariotos encontra-se armazenado no núcleo, onde ocorre a transcrição, enquanto a tradução do código de nucleotídeos do mRNA – originado a partir do DNA – à sequência de aminoácidos de uma proteína tem lugar no citoplasma, em estruturas denominadas ribossomos. Os ribossomos são estruturas ribonucleoproteicas celulares altamente conservadas ao longo da escala filogenética. Nos procariotos, os ribossomos tem um coeficiente de sedimentação de 70S, enquanto nos eucariotos é 80S, divididos em duas subunidades (uma maior, e outra menor). A subunidade menor 30S em procariotos é composta por rRNA 16S e 21 proteínas, enquanto a subunidade maior 50S possuem os rRNAs 23S, 5S e 34 proteínas (GREEN AND NOLLER, 1997). Em eucariotos, os ribossomos contêm quatro diferentes rRNAs e 79 proteínas divididas em duas subunidades: a menor, também chamada subunidade 40S, que contém o rRNA 18S (de 1800 nucleotídeos), e 33 proteínas ribossômicas diferentes; e a maior, também chamada subunidade 60S, a qual apresenta os rRNAs 5S (de 121 nucleotídeos), 5.8S (de 158 nucleotídeos), e 25S (de 3396 nucleotídeos), todos associados a 46 proteínas ribossômicas (BASERGA, 2013).

Existem quatro etapas principais no processo de síntese proteica: iniciação, alongação, terminação, e reciclagem. Nos eucariotas, o aminoácido iniciador é metionina, e não *N*-formilmetionina dos procariotos. Na iniciação da tradução eucariótica, a subunidade ribossômica 40S é unida ao iniciador específico Met-tRNA_i^{Met}, a fatores de iniciação, e a um RNA mensageiro (mRNA). Esta etapa é completada quando este complexo localiza, a sequência do mRNA, o códon de iniciação AUG, com o conseqüente acoplamento da subunidade ribossômica 60S para então formar o ribossomo 80S (OCHOA, 1977). Os eucariotos, em contraste com os procariotos, não utilizam uma sequência específica rica em purinas no lado 5' para distinguir os AUGs iniciadores dos internos: em vez disso, o AUG mais próximo da extremidade 5' do mRNA é geralmente selecionado como o local de início. Em quase todos os casos, o mRNA eucariótico tem apenas um local de início e, portanto, é molde para uma única proteína. Em contraste, um mRNA procariótico pode ter múltiplas sequências de Shine-Delgarno e, portanto, vários locais de início, servindo como um molde para a síntese de várias proteínas (CALOGERO et al., 1988; KOZAK, 1978; YUSUPOVA et

al., 2001). Além disso, os eucariotos utilizam muito mais fatores de iniciação do que os procariotos, e sua interação é muito mais complexa. Essa diferença no mecanismo de início é, em parte, uma consequência da diferença no mRNA em processamento, em que se observa que, após a transcrição em procariotos, a extremidade 5' do mRNA está prontamente disponível para os ribossomos. Em contraste, em eucariotos antes da tradução ser iniciada, o pré-mRNA deve ser processado e transportado para o citoplasma.

A etapa seguinte é da elongação da cadeia polipeptídica, caracterizada pelo ciclo repetitivo de entrega dos corretos RNA transportadores aminoacilados (aminoacil-tRNAs) ao sítio A do ribossomo, seguido pela formação da ligação peptídica, e pela translocação para o códon seguinte do mRNA para a produção de um polipeptídeo completo. Nesta etapa atuam fatores de elongação, sendo em eucariotos EF1 α e EF1 $\beta\gamma$ e seus equivalentes EF-Tu e EF-Ts em procarióticos. A forma GTP de EF1 α entrega aminoacil-tRNAs ao sítio A do ribossomo e EF1 $\beta\gamma$ catalisa a troca de GTP pelo GDP ligado. O EF2 eucariótico medeia a translocação induzida pelo GTP da mesma maneira que o EF-G procariótico (UEMURA et al., 2007; WINTERMEYER et al., 2004).

A etapa de terminação tem início quando da entrada de um códon de terminação do mRNA no sítio A: estes códons não são reconhecidos pelo tRNA, mas pelo fator de liberação 1 eucariótico (eRF1), o qual, em conjunto com a GTPase eRF3 (IF3 nos procariotos) promove a liberação das proteínas recém-sintetizadas do ribossomo. Finalmente, a reciclagem consiste na dissociação do ribossomo 80S em eucariotos e 70S em procariotos, nas duas subunidades ribossomais eucarióticas 40S e 60S (e 50S e 30S procarióticas), que então poderão ser utilizadas para novas rodadas de tradução (DEVER; GREEN, 2012; DEVER; KINZY; PAVITT, 2016; GRAILLE; SÉRAPHIN, 2012).

Entretanto, (i) as mutações gênicas nas bases nucleotídicas que originam os códons de terminação dos mRNAs; (ii) a clivagem e poliadenilação de moléculas precursoras do mRNA em sua região codificante durante o processamento; e (iii) a clivagem acidental do mRNA maduro em sua região codificante, são eventos capazes de dar origem a mRNAs desprovidos de códons de terminação (mRNAs *non-stop*) (AKIMITSU; TANAKA; PELLETIER, 2007; ATKINSON; BALDAUF; HAURYLIUK, 2008; FRISCHMEYER; HOOF; DIETZ, 2002; GE et al., 2010; GRAILLE; SÉRAPHIN, 2012; VASUDEVAN et al., 2003). A tradução de um mRNAs *non-stop* pelo ribossomo acarreta no tradução da cauda poliadenilada do mRNA, a qual dá origem a um trato polibásico de lisinas em sequência localizado na porção C-terminal do polipeptídeo *non-stop* (BENGTSON; JOAZEIRO, 2010; ITO-HARASHIMA et

al., 2007). Presumivelmente, por ser positivamente carregado, o segmento de lisinas do polipeptídeo *non-stop* interage eletrostaticamente com o túnel de saída ribossomal – carregado negativamente –, interrompendo o processo traducional e impedindo não somente a liberação do polipeptídeo *non-stop* recém-sintetizado do ribossomo como também a dissociação e reciclagem das subunidades ribossomais (BENGTSON; JOAZEIRO, 2010; GRAILLE; SÉRAPHIN, 2012; LU; DEUTSCH, 1996; VASUDEVAN et al., 2003).

A grande maioria das proteínas, tão logo sintetizadas, assumem a sua conformação tridimensional nativa. O dobramento dessas proteínas (*folding*) acontece em um processo co-traducional, permitindo que elas realizem suas funções, tais como, catálise, transporte, defesa, entre outros (HART; ISTRAIL, 1995; TANG, 2000).

O dobramento de polipeptídeos recém-sintetizados podem encontrar limitações no interior das células, criando condições que aumentam a probabilidade de as cadeias recém-sintetizadas não se dobrarem corretamente, mas sim que se agreguem umas às outras formando estruturas não funcionais (DOBSON; KARPLUS, 1999; ELLIS; HARTL, 1999). O processo de agregação é altamente favorecido por aumentos de concentração e temperatura, onde as regiões hidrofóbicas das proteínas ficam transitoriamente expostas no meio celular, aumentando a tendência da agregação. O acúmulo dessas proteínas mal enoveladas tem como consequência a perda de função e toxicidade celulares, estando associado à doenças, tal como o diabetes tipo I, a Doença de Creutzfeldt-Jakob, Alzheimer, Parkinson (DP), Huntington, esclerose lateral amiotrófica, entre outras (NICO; BOTT; HOL, 2014; SHERMAN; GOLDBERG, 2001). Em 1997 Carrel e Lomas descreveram estas doenças como proteinopatias, que formam um grande grupo de patologias caracterizadas pela presença de proteínas anormalmente dobradas nas células afetadas (LOMAS; CARREL, 1997).

1.2. Controle de qualidade em síntese de proteína

As células requerem a produção contínua de proteínas para a manutenção de sua homeostase. Porém, o processo traducional pode ser prejudicado por vários motivos tais como mutações no DNA e erros de processamento dos precursores do mRNA que originam mRNAs *non-stop*, além da baixa concentração celular de um dado ou mais tRNA-aminoacilados: qualquer um desses problemas pode ocasionar a interrupção da tradução, provocando o sequestro de ribossomos e efeitos celulares deletérios como estresse e morte celular. Para minimizar as consequências dessa interrupção traducional, os organismos desenvolveram mecanismos para reconhecer os ribossomos sequestrados e, através de sinalização de estresse celular detectado pela via HSF1 (*heat shock fator 1*), provendo mecanismos para a realização

da reciclagem ribossomal e da degradação tanto do mRNA como dos polipeptídeos recém-sintetizados defeituosos (BRANDMAN et al., 2012; BRANDMAN; HEGDE, 2016).

Em 1996, Keiler e colaboradores descreveram como os procariotos realizam a remoção dos polipeptídeos *non-stop* presos ao ribossomo: as células, ao detectarem o sequestro ribossomal, promovem o recrutamento, ao complexo traducional, de um RNA que é, ao mesmo tempo, transportador e mensageiro (tmRNA). Este tmRNA é então capaz de adicionar a sequência polipeptídica AANDENYALAA à extremidade C-terminal do polipeptídeo *non-stop* preso ao ribossomo 70S, marcando-o para sua posterior degradação por proteases (GILLET; FELDEN, 2001; HUANG et al., 2000; KEILER; WALLER; SAUER, 1996); SUNDERMEIER et al., 2008). Quatorze anos mais tarde, Bengtson e Joazeiro demonstraram, através da utilização da levedura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo experimental, que a ubiquitina E3 ligase associada ao ribossomo do tipo RING listerin (Ltn1p, também conhecida como Rkr1p) promove a ubiquitinação dos polipeptídeos *non-stop* presos ao ribossomo eucariótico, direcionando-os à degradação proteassomal. Além disso, observaram que células com deleção do gene *LTN1* fazem as células ficar mais sensíveis a higromicina B, um antibiótico aminoglicosídeo que afeta a fidelidade da tradução e, portanto, *readthrough* dos códons de terminação. (BENGTSON; JOAZEIRO, 2010; BOROVIKSKAYA et al., 2008; BRODERSEN et al., 2000). [Interessantemente, Ltn1p havia sido descrita em 2007 como uma proteína responsável apenas pela remodelação de cromatina (BRAUN et al., 2007)]. De fato, em 2012, Brandman e colaboradores demonstraram que Ltn1p atuava em complexo com as proteínas Tae2p (esta posteriormente chamada de Rqc2p), Rqc1p, Cdc48p, Ufd1p e Npl4p, formando então o complexo de controle de qualidade do ribossomo (RQC, do inglês *ribosome quality control*) (BRANDMAN et al., 2012). Ortólogos de algumas dessas proteínas do complexo RQC foram descritas em mamíferos, sendo elas NEMF (Tae2p de leveduras), TCF25 (Rqc1), p97 (Cdc48), Listerin (Ltn1p) (SHAO et al., 2015; SHAO; HEGDE, 2014).

O sinal para o recrutamento do complexo RQC aos ribossomos é uma ligação peptidil-tRNA não-hidrolisada na subunidade 60S, uma marca da terminação traducional defeituosa (SHOEMAKER; EYLER; GREEN, 2010). Essa ligação peptidil-tRNA não-hidrolisada é reconhecida pela proteína Tae2p que, de fato, segundo previsões de biologia computacional, possui em sua estrutura um motivo de ligação a tRNA (MAXWELL BURROUGHS; ARAVIND, 2014). Uma vez formado o complexo peptidil-tRNA-Tae2p, Ltn1p então é recrutada ao ribossomo 60S, ligando-se à Tae2p pela sua extremidade N-terminal,

posicionando sua extremidade C-terminal – região em que o seu domínio catalítico RING está localizado – em contato próximo ao túnel de saída ribossomal, permitindo, então, a poliubiquitinação dos polipeptídeos defeituosos recém-sintetizados (LYUMKIS et al., 2014). Após a poliubiquitinação, o polipeptídeo defeituoso recém-sintetizado é então extraído da subunidade 60S por Cdc48, Ufd1 e Npl4 (Figura 1) tornando-se, assim, substrato livre para a degradação proteossomal. Curiosamente, Hel2p e Rqc1p ainda hoje não possuem estruturas tridimensionais determinadas.

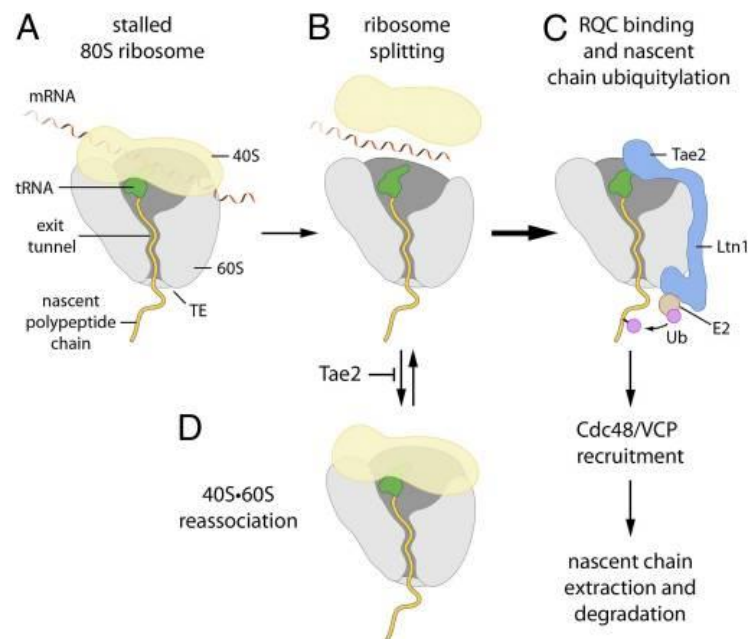


Figura 1. Diagrama representativo da atividade do complexo RQC. Extraído de LYUMKIS; OLIVEIRA DOS PASSOS et al., 2014.

Além disso, interessantemente, existem proteínas tanto integrantes quanto associadas aos ribossomos que conferem a essas estruturas a capacidade de interromper a tradução de mRNAs que possuem sequências nucleotídicas que originarão tratos de aminoácidos polibásicos: Rpl1bp e Asc1p (proteínas integrantes das subunidades 60S e 40S, respectivamente; Figura 2 e Figura 3) interrompem a tradução de sequências repetitivas do códon CGA – que codifica arginina –, possuindo Hel2p a mesma função, porém para o códon AAA – que codifica lisina (GERBASI et al., 2004; LETZRING et al., 2013; SITRON; COLE, 2017; YONASHIRO, TAHARA et al., 2016).

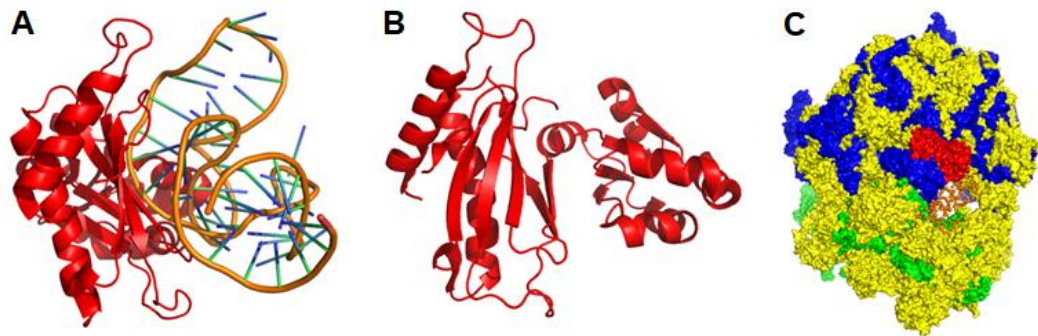


Figura 2. Representação estrutural da proteína Rpl1bp. Painei A: Rpl1bp ligada à RNA (PDB 2NOQ). Painei B: Rpl1bp em outra orientação – nessa representação o RNA não é mostrado (PDB 2NOQ). Painei C: Rpl1bp, em vermelho, no ribossomo eucariótico (PDB3J6X).

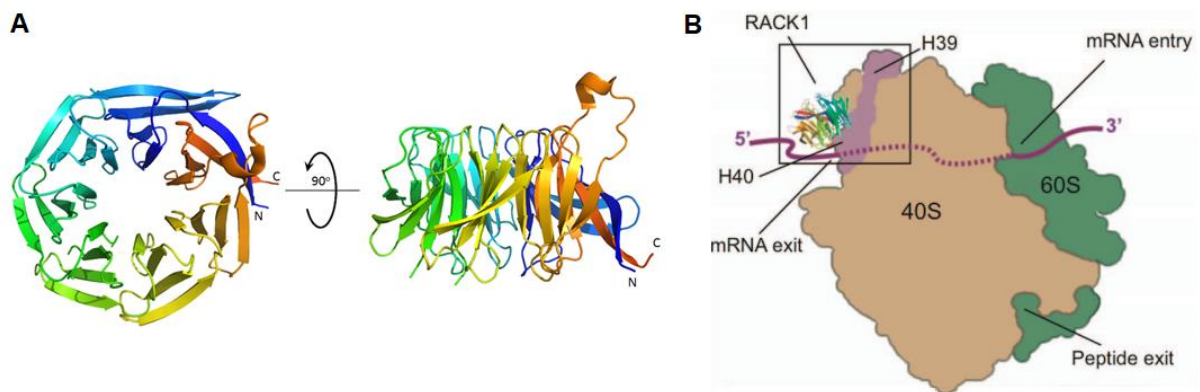


Figura 3. Representação do tipo fita da estrutura cristalina de Asc1p (PDB 3FRX). Painei A: Rotação de 90° de Asc1p. Painei B: Localização ribossomal de Asc1p, aqui identificada como RACK1. Retirado e adaptado de COYLE et al., 2009.

1.3. *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo

O gênero *Saccharomyces* é compreendido por fungos unicelulares diplóides que se reproduzem assexuadamente por brotamento, por esporulação (meiose, segregação e formação de haplóides), e por cruzamento com formação de diplóides (PRETORIUS, 2000). A espécie *S. cerevisiae* é um eucarioto simples, Crabtree-positivo, cujo uso na panificação e na fabricação de bebidas fermentadas é de indubitável importância pela sua habilidade, quando em ambiente com excesso de açúcares, em converter piruvato a acetaldeído – com concomitante geração de CO₂ – e, então, converter este aldeído a etanol, formando NAD⁺, permitindo, portanto, a reciclagem citossólica desta coenzima oxidada que permitirá então a execução da glicólise até a exaustão desta fonte de carbono (DE DEKEN, 1966). *S. cerevisiae* foi o primeiro eucarioto cujo genoma foi completamente sequenciado (GOFFEAU et al., 1996), estando este organizado de forma altamente compacta em contraste com os genomas

dos organismos multicelulares: essa levedura contém um conjunto haplóide de 16 cromossomos, todos eles bem caracterizados, com tamanhos variando de 200 a 2200 kb (SHERMAN; SHERMAN; ENZYMOLOGY, 2003). Seu uso como organismo-modelo para a célula eucariótica remonta a meados da década de 1960, época em que Fred Sherman iniciou seus estudos sobre mutagênese, tradução, e estrutura, processamento e modificações pós-traducionais em proteínas eucarióticas (ZARET, 2014). De fato, foi nesta levedura em que foi estabelecido o primeiro sistema para a pesquisa da expressão gênica eucariótica, através do estudo do gene *CYC1*, responsável pela codificação da isoforma 1 do citocromo *c* mitocondrial (SHERMAN; STEWART, 1971). Desde então, o uso dessa levedura tem encontrado grande aceitação no meio científico para estudos em ciências biológicas, muito em parte pela sua grande homologia com células eucarióticas mais complexas; pelo seu rápido crescimento (em condições nutricionais adequadas, podem gerar e liberar brotos a cada 120 minutos); pelo fato de suas células encontrarem-se dispersas em meio de cultivo; pela existência de protocolos bem estabelecidos para a realização de manipulações genéticas; pela sua facilidade para replicação e isolamento (SHERMAN; SHERMAN; ENZYMOLOGY, 2003). Há um grande número de linhagens laboratoriais de *S. cerevisiae* atualmente caracterizadas, podendo ser estas tanto haplóides (n) como diplóides ($2n$) (BRACHMANN et al., 1998; LOUIS, 2016).

2. JUSTIFICATIVA

Os efeitos da proteína Rpl1bp sobre a tradução de um mRNA contendo um trato de poli(A) ainda hoje não estão descritos; da mesma forma, também não se conhecem quais são os efeitos das proteínas Asc1p e Hel2p sobre a tradução de mRNAs que contêm, em sua sequência, códons raros dessa levedura, ou que sofrem clivagem de sua região codificante. Além disso, também não se conhece por completo o impacto da ausência da proteína Rqc1p no destino metabólico de polipeptídeos *non-stop* presos aos ribossomos. Desta forma, pretendemos com este projeto estudar como as proteínas Rpl1Bp, Asc1p, Hel2p e Rqc1p determinam a toxicidade celular à higromicina B, um aminoglicosídeo que afeta a fidelidade traducional (Item 5.3), e também como estas mesmas proteínas regulam o destino metabólico de polipeptídeos defeituosos oriundos de mRNAs que contêm sequências que promovem a interrupção da tradução e o recrutamento do complexo RQC aos ribossomos sequestrados.

3. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho, portanto, são:

- 1) A determinação, através de biologia computacional, da predição estrutural das proteínas Hel2p e Rqc1p;
- 2) A obtenção de cassete de deleção para a ubiquitina E3 ligase Ltn1p – proteína que possui papel central na determinação do destino metabólico dos polipeptídeos defeituosos recém-sintetizados presos ao ribossomo – para a deleção do gene que a codifica (*LTN1*) em mutantes deletados para os genes *RPL1B*, *ASC1*, *HEL2* e *RQC1*;
- 3) A condução de experimentos de toxicidade celular à higromicina B;
- 4) A construção de repórteres que interrompem a tradução, para estudo do destino metabólico das proteínas defeituosas recém-sintetizadas presas ao ribossomo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Linhagens de *Escherichia coli*

As linhagens de *E. coli* utilizadas para a obtenção dos DNA plasmideais foram a DH5 α (GRANT et al., 1990) e XL1-Blue (Stratagene).

4.2. Linhagens parentais e mutantes de *S. cerevisiae*

As linhagens parentais de *S. cerevisiae* utilizada neste trabalho foram a BY4741 (MATa; *HIS3* Δ 1; *LEU2* Δ 0; *MET15* Δ 0; *URA3* Δ 0; (BRACHMANN et al., 1998) e a CEN.PK 113-7D (MATa; *MAL2*-8^c; *SUC2*; DARAN-LAPUJADE et al., 2003). Os mutantes de *S. cerevisiae* contendo apenas uma deleção gênica são da linhagem BY4741, e foram doados pelo Prof. Luis Eduardo Soares Netto (Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo). Os mutantes com deleções adicionais foram construídos através do uso de cassete de deleção destinado a substituir, por recombinação homóloga, o gene *LTN1* com o marcador de seleção *HIS3* (Item 5.2). Na Tabela 1 estão descritos todos os mutantes utilizados neste trabalho.

Tabela 1. Descrição dos mutantes BY4741 utilizados nesse trabalho.

Mutante	Genótipo	Referência
<i>ltn1</i> Δ	MATa: <i>HIS3</i> Δ 1; <i>LEU2</i> Δ 0; <i>MET15</i> Δ 0; <i>URA3</i> Δ 0; <i>ltn1</i> Δ ::KanMX6	(BRAUN et al., 2007)
<i>rpl1b</i> Δ	MATa: <i>HIS3</i> Δ 1; <i>LEU2</i> Δ 0; <i>MET15</i> Δ 0; <i>URA3</i> Δ 0; <i>hel2</i> Δ ::KanMX6	(PLANTA; MAGER, 1998)
<i>asc1</i> Δ	MATa: <i>HIS3</i> Δ 1; <i>LEU2</i> Δ 0; <i>MET15</i> Δ 0; <i>URA3</i> Δ 0; <i>asc1</i> Δ ::KanMX6	(CHANTREL et al., 1998)
<i>hel2</i> Δ	MATa: <i>HIS3</i> Δ 1; <i>LEU2</i> Δ 0; <i>MET15</i> Δ 0; <i>URA3</i> Δ 0; <i>hel2</i> Δ ::KanMX6	(SINGH et al., 2012)
<i>rqc1</i> Δ	MATa: <i>HIS3</i> Δ 1; <i>LEU2</i> Δ 0; <i>MET15</i> Δ 0; <i>URA3</i> Δ 0; <i>rqc1</i> Δ ::KanMX6	(BRANDMAN et al., 2012)
<i>rpl1b</i> Δ <i>ltn1</i> Δ	MATa: <i>HIS3</i> Δ 1; <i>LEU2</i> Δ 0; <i>MET15</i> Δ 0; <i>URA3</i> Δ 0; <i>rpl1</i> Δ ::KanMX6; <i>ltn1</i> Δ ::His3MX6	Este estudo
<i>asc1</i> Δ <i>ltn1</i> Δ	MATa: <i>HIS3</i> Δ 1; <i>LEU2</i> Δ 0; <i>MET15</i> Δ 0; <i>URA3</i> Δ 0; <i>asc1</i> Δ ::KanMX6; <i>ltn1</i> Δ ::His3MX6	Este estudo
<i>hel2</i> Δ <i>ltn1</i> Δ	MATa: <i>HIS3</i> Δ 1; <i>LEU2</i> Δ 0; <i>MET15</i> Δ 0; <i>URA3</i> Δ 0; <i>hel2</i> Δ ::KanMX6; <i>ltn1</i> Δ ::His3MX6	(YONASHIRO, TAHARA et al., 2016)
<i>rqc1</i> Δ <i>ltn1</i> Δ	MATa: <i>HIS3</i> Δ 1; <i>LEU2</i> Δ 0; <i>MET15</i> Δ 0; <i>URA3</i> Δ 0; <i>rqc1</i> Δ ::KanMX6; <i>ltn1</i> Δ ::His3MX6	Este estudo

4.3. Meios de cultura, cultivo de microrganismos e seu armazenamento

4.3.1. Para *E. coli*

Os meios de cultura utilizados para *E. coli* (SAMBROOK et al., 1989) foram o LB líquido (triptona 1,0%, cloreto de sódio 1,0%, e extrato de levedura 0,5%); e o LB sólido (LB líquido suplementado com ágar bacteriológico 2,0%). Para seleção de clones de *E. coli*

contendo plasmídeos de interesse, foram adicionados 100 µg/mL de ampicilina ao meio LB. *E. coli* foi cultivada em meio LB sólido e líquido, a 37 °C, com agitação a 150 rpm, no caso deste último.

4.3.2. Para *S. cerevisiae*

Os meios de cultura utilizados para *S. cerevisiae* foram (i) o YPD líquido (peptona 2,0%, dextrose 2,0% e extrato de levedura 1,0%); (ii) o YPD sólido (YPD líquido suplementado com ágar bacteriológico 2,0%); (iii) o SD líquido suplementado com 40 µg/mL de aminoácidos (base nitrogenada 0,17%, dextrose 2,0% e sulfato de amônio 0,5%, suplementado com sulfato de adenina 10 mg/L, uracila 20 mg/L, triptofano 50 mg/L, histidina 20 mg/L, arginina 50 mg/L, metionina 20 mg/L, tirosina 50 mg/L, leucina 100 mg/L, isoleucina 50 mg/L, lisina 50 mg/L, fenilalanina 50 mg/L, aspartato 80 mg/L, valina 140 mg/L, treonina 100 mg/L); (iv) o SD sólido (SD líquido desprovido de aminoácidos, e suplementado com ágar bacteriológico 2,0% e aminoácidos auxotróficos); (v) SGal líquido (meio SD com substituição da dextrose por galactose, na mesma quantidade). Todos os meios foram esterilizados em vapor úmido a 121 °C por 20 minutos. O cultivo de leveduras em meio líquido foi realizado a 28 °C, com agitação orbital (120 rpm), a partir da inoculação de 1.10^7 células retiradas de uma pré-cultura de 16 h em 10 mL de meio fresco ($Abs_{600\text{ nm}} = 0,2$). As células de levedura foram cultivadas até o início de sua fase estacionária precoce de crescimento ($Abs_{600\text{ nm}} = 1,6$), quando foram centrifugadas a 1000 x g, por 1 min. Os sobrenadantes foram descartados e o precipitado celular foi armazenado a -80 °C até o processamento das amostras.

Os estoques de trabalho tanto de *E. coli* como de *S. cerevisiae* foram mantidos a 4 °C, em placas contendo meio sólido apropriado, e eram renovadas periodicamente, e seus estoques permanentes foram mantidos a -80° C, em meios líquidos apropriados contendo 25% de glicerol.

4.4. Extração de DNA genômico de *S. cerevisiae*

A extração de DNA genômico foi realizada segundo descrito por Harju e colaboradores (HARJU; FEDOSYUK; PETERSON, 2004). O volume de 1,5 mL de uma cultura de *S. cerevisiae* CEN.PK 113-7D ou BY4741 cultivada *overnight* em YPD foi transferido a um microtubo e centrifugado por 2 min, a 1000 x g. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 200 µL de tampão de lise [Triton X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-Cl 10mM (pH = 8,0) e EDTA 1 mM (pH = 8,0)], sendo em

seguida incubadas por 4 min a -80 °C, e então transferidas a banho de água a 100 °C e incubadas por 1 min. Este processo foi repetido, e o conteúdo do microtubo foi vortexado por 30 s. Foram então adicionados 200 µL de clorofórmio, e o microtubo foi vortexado por mais 2 min, e então centrifugado a 20.000 x g por 3 min, em temperatura ambiente. Após a centrifugação, a fase aquosa (superior) foi transferida para um novo microtubo de centrífuga contendo 800 µL de etanol 100% gelado. O sistema foi misturado por inversão, e incubado a -80 °C por pelo menos 20 min. Após essa etapa, o microtubo foi centrifugado por 5 min, a 20.000 x g, em temperatura ambiente, e o sobrenadante foi removido. O *pellet* de DNA foi lavado com 500 µL de etanol 70% por duas vezes, nas mesmas condições anteriores. O DNA foi finalmente seco a 37 °C por período suficiente para a evaporação do etanol 70% (30-60 min), e então ressuspensão em 25-50 µL de água MilliQ estéril.

4.5. Desenho de oligonucleotídeos para obtenção de repórteres, cassete de deleção e realização de genotipagem

Os oligonucleotídeos utilizados neste trabalho foram desenhados com o auxílio do programa SnapGene Viewer (GSL Biotech LLC), analisados através da ferramenta de análise OligoCalc (disponível em <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) (KIBBE, 2007), sendo a síntese destes realizada pela empresa Exxtend (Campinas, SP). Os oligonucleotídeos utilizados para a construção de cassete de deleção de *LTNI* contendo o gene *HIS3* como marca de seleção, bem como aqueles utilizados para a genotipagem de *S. cerevisiae* transformante, estão na Tabela 2.

Tabela 2. Oligonucleotídeos para obtenção de cassete de deleção de *LTNI* e realização de genotipagem.

Nome	Sequência nucleotídica (5' → 3')
FW cassete de deleção	GAAGAAGTCCTTCTTAATAGTTCAAATCTGCTAAGCCATCAAAA AAGTTCAAGCAATAGTTGGTTCTTAATGTCTGCCCTAAGAAGAT CGTCG
RV cassete de deleção	GAGAGCACAATAATAAAAGGAACTTTGTTTAAAAAATGTAGTACA TTTATATGAAATTTATATGCGATAGTCTACCTTTAAGCAAGGATTT TCTTAACTTCTTCGGCG
FW genotipagem	GAGGTCTCCGGTTCGATTCC
RV genotipagem	TTGGATCAGGATTTGCGCCT

Os oligonucleotídeos utilizados para a construção de repórteres (Item 5.4) estão na Tabela 3.

Tabela 3. Oligonucleotídeos para construção de repórteres. A sequência codificante para o epítipo *FLAG* no oligonucleotídeo FW all está em negrito. Os sítios de restrição encontram-se sublinhados. GAGCTC: SacI; TCTAGA: XbaI.

Nome	Sequência nucleotídica (5' → 3')
FW all	ATTAGAGCTCGCAAAGATGGATTATAAAGACGATGACGATAAAAC AGAGCAGAAAGCCCTAGTAAAGCGT
RV controle	GCGCTCTAGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTATT ACATAAGAACACCTTTGGTGGAGGG
RV Lys₁₂	GCGCTCTAGACTATTATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TCATAAGAACACCTTTGGTGGAGGG
RV Arg₁₂	GCGCTCTAGACTATTATCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTC GTCGCATAAGAACACCTTTGGTGGAGGG
RV HHRz	GCGCTCTAGACTATTAACCCTGTTTCGTCCTCACGGACTCATCAGACC GGAAAACACATCCGGTGACAGGCATAAGAACACCTTTGGTGGAGGG

4.6. Reação da polimerase em cadeia

A reação da polimerase em cadeia (PCR) foi padronizada para um volume final de 50 µL, como descrito na Tabela 4, utilizando termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.). O programa de PCR consistiu em um ciclo inicial de desnaturação a 94 °C por 4 min, seguido por mais um ciclo de desnaturação a 94 °C por 30 s; um ciclo de hibridização a 55 °C por 30 s; e um ciclo de extensão 72 °C, por tempo suficiente para permitir a síntese do *amplicon*, respeitada a velocidade de processamento da polimerase GoTaq DNA Polymerase (Promega Corporation), que é de 1 Kb/min – os ciclos de desnaturação por 30 s, hibridização e extensão foram repetidos por 34 vezes. Para o término do programa, foi executada uma etapa de extensão por 5 min, a 72 °C, ao final da qual a temperatura de trabalho do termociclador foi abaixada até 12 °C, por tempo indefinido.

Tabela 4. Protocolo utilizado para PCRs executadas neste trabalho.

	Concentração estoque	Quantidade para 50 µL de reação
Tampão de amplificação	5 X	10 µL
dNTPs	10 mM	1 µL
oligonucleotídeo FW	10 µM	1 µL
oligonucleotídeo RV	10 µM	1 µL
Taq polimerase	5 U/µL	1 U
DNA molde	Variável	100 ng
H₂O	55,5 M	Variável

4.7. Purificação de amplicons e produtos de digestão

Para a purificação dos *amplicons* e de produtos de digestão, foram realizadas eletroforeses de DNA em gel de agarose 1% com tampão TAE [Tris-Cl 40 mM (pH = 8,3), ácido acético 20 mM, e EDTA 1 mM) contendo 0,5 X de SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen). Para tal, aos DNAs foi adicionado tampão de carregamento (azul de bromofenol 0,125%, xileno cianol 0,125%, e glicerol 50%), sendo estes adicionados aos poços do gel de agarose, que então foi submetido a eletroforese a 120 V, por aproximadamente 25 min. O DNA foi visualizado utilizando o transiluminador T26M (BioAgency), operando a 302 nm. A banda correspondente aos *amplicons* ou produtos de digestão foi cortada do gel com o auxílio de um bisturi, e colocada em uma membrana de celulose de aproximadamente 7 cm, devidamente fechada em suas extremidades com o uso de grampos, na presença de 400 µL de tampão TAE diluído 10 X. Esse sistema foi adicionado à uma cuba eletroforética contendo o mesmo tampão, e o DNA presente no fragmento do gel foi eletroluído a 250 V, por 12 min. A membrana de celulose foi então desgrampeada, e o seu conteúdo líquido (que agora contém o DNA de interesse) foi recolhido com o uso de uma micropipeta, e transferido a um microtubo de centrífuga. A esse microtubo, foi adicionado um volume de fenol; o sistema foi homogeneizado, e então centrifugado a 8.000 x g, por 3 min. A fase orgânica foi removida com o auxílio de uma micropipeta e, em seguida, foi adicionado um volume de clorofórmio; novamente, seguimos com a homogeneização, centrifugação e remoção da fase orgânica tal como anteriormente. Ao microtubo foi então adicionado 1/20 volume de NaCl 5,0 M, sendo este homogeneizado e, posteriormente, adicionado 2,5 volumes de etanol 100%. O microtubo foi então incubado a -80 °C por pelo menos 20 min, e então centrifugado a 20.000 x g por 5 min. O DNA precipitado foi então lavado com etanol 70% por duas vezes, seco a 37 °C, e ressuspensão em volume variável (25-50 µL) de água milliQ estéril.

4.8. Digestão enzimática e ligação dos fragmentos de DNA

As digestões enzimáticas dos *amplicons* e do plasmídeo pYES2 (Invitrogen) foram realizadas em um volume de 100 µL, com 3 U de enzima [SacI e XbaI (Promega Corporation)] para cada 900 ng de DNA, por 3 h, a 37 °C, na presença do tampão MULTICORE (Promega Corporation) 1 X. O vetor pYES2, concomitantemente à digestão enzimática com SacI e XbaI, foi também incubado na presença de 10 U de fosfatase alcalina de intestino de bovino (Promega Corporation), nas duas últimas horas de protocolo. A ligação dos fragmentos de DNA foi realizada – após a purificação destes (Item 4.7) – pela sua incubação na presença de 1 U de T4 DNA ligase (Invitrogen) a temperatura ambiente, por 1 h, em um

volume de 15 µL. A razão molar inserto:vetor utilizada para as ligações foi de 3:1. O controle da ligação (ligação conduzida na ausência de inserto) foi realizado diariamente, como medida do êxito da digestão do vetor pelas duas enzimas utilizadas.

4.9. Transformação de *E. coli* competente

Um pré-inóculo de *E. coli* DH5α foi conduzido *overnight* em 10 mL de meio LB, a 37 °C. O volume de 100 µL do pré-inóculo foi adicionado a 10 mL de meio LB fresco, que foi incubado com constante agitação orbital, a 37° C, por aproximadamente 4 h, quando então o crescimento celular foi interrompido. A cultura foi transferida para um tubo cônico de 50 mL estéril, e então centrifugada por 5 min a 6.800 x g, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em 10 mL de tampão 1 [CaCl₂ 10 mM, Tris-Cl 10mM (pH = 7,5)] gelado, e o sistema foi centrifugado novamente nas mesmas condições anteriores. Após o descarte do sobrenadante, as células foram novamente ressuspensas em 10 mL de tampão 2 [CaCl₂ 30mM, Tris-Cl 10mM (pH = 7,5)] gelado e, em seguida, incubadas por 30 min no gel, ao final dos quais foram mais uma vez centrifugadas. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado celular foi ressuspenso em 1 mL de tampão 2 gelado. Para a transformação dessas *E. coli* agora competentes, 7,5 µL dos produtos de ligação foram adicionados a 50 µL dessa suspensão celular, que então permaneceu no gelo por 30 min. Em seguida, as células competentes adicionadas dos produtos de ligação foram incubadas por 90 s a 42 °C, ao fim dos quais foram mantidas no gelo por 2 min. O volume de 1 mL de meio LB foi então adicionado às suspensões celulares, e estas foram incubadas por 1 h, a 37 °C. Em seguida, as culturas foram centrifugadas a 6.800 x g por 1 min, e 950 µL de sobrenadante foram retirados, permitindo a ressuspensão de todo conteúdo celular em aproximadamente 50 mL de meio LB, os quais foram adicionados a placas de Petri contendo meio LB suplementado com ampicilina 100 µg/mL (Item 4.3). Estas placas de Petri foram incubadas *overnight* a 37 °C, e então um número variável de colônias (5-20) foram coletadas, sendo utilizadas para a obtenção de tapetes celulares de aproximadamente 2 cm² em meio LB sólido com ampicilina 100 µg/mL.

4.10. Identificação de clones positivos de *E. coli* e sequenciamento de construções

Os tapetes celulares de *E. coli* (Item 4.9) foram coletados com o auxílio de um palito de madeira estéril, e adicionados a 100 µL de solução A [glicose 50 mM, EDTA 10 mM e Tris-Cl 25 mM (pH = 8)] contendo lisozima 5,0 mg/mL e RNase A 2 µg/mL em um microtubo de centrífuga. Após homogeneização, foram adicionados num primeiro momento 200 µL de solução B (NaOH 200 mM e SDS 1%) e, posteriormente, 150 µL de solução C

(acetato de amônio 7,5M e ácido acético glacial 2%), havendo homogeneização por inversão após a adição de cada solução. Em seguida, os microtubos foram centrifugados a 10.000 x g, por 5 min, e o sobrenadante – que contém o DNA plasmideal – foi coletado e transferido para novos microtubos de centrífuga contendo isopropanol 100% gelado. Os microtubos foram homogeneizados por inversão, e então incubados a -80 °C por 20 min, ao fim dos quais foram centrifugados a 20.000 x g, por 5 min. O precipitado de DNA plasmideal foi lavado duas vezes com etanol 70%, seco a 37 °C até a completa remoção deste, e ressuspensão em 10 µL de solução contendo 0,5 U de SacI, 0,5 U de XbaI e tampão MULTI-CORE 1 X. O DNA plasmideal foi então digerido por 60 min, e o produto de digestão foi objeto de uma eletroforese em gel de agarose 1% contendo 0,5 X de SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen). A revelação, no gel eletroforético, de uma banda de tamanho esperado (aproximadamente 750 bp), correspondente ao inserto ligado ao vetor, utilizando o fotodocumentador Gel Doc EZ Imager (BioRad), permitiu-nos classificar aquela colônia como sendo clone positivo para a construção de interesse. Essa colônia positiva foi novamente cultivada em meio LB suplementado com ampicilina, e teve o seu DNA plasmideal extraído através do kit Wizard Plus SV DNA Purification System (Promega Corporation). Esse DNA plasmideal foi então novamente digerido com SacI e XbaI nas mesmas condições descritas acima, e também serviu de molde para a realização de uma PCR (Item 4.6) utilizando como iniciadores os mesmos oligonucleotídeos utilizados para a clonagem do inserto. Havendo então a confirmação da presença do inserto, prosseguimos com o envio das amostras de DNA plasmideal para a Myleus Biotecnologia (Belo Horizonte, MG), para sequenciamento tipo Sanger através de eletroforese capilar em aparelho ABI3730 (Life Technologies), utilizando-se polímero POP7 e BigDye v3.1.

4.11. Transformação de *S. cerevisiae*

A transformação de *S. cerevisiae* foi realizada segundo Amberg e colaboradores (AMBERG; BURKE; STRATHERN, 2006), com modificações. O número de 1.10^7 células foi retirado de uma pré-cultura crescida *overnight* em YPD e inoculado em 5 mL desse mesmo meio fresco ($Abs_{600nm} = 0,2$). O cultivo foi conduzido até o final da fase logarítmica de crescimento ($Abs_{600nm} = 0,8$). As células foram então centrifugadas a 1000 x g, por 1 min, ressuspensas em 1 mL de acetato de lítio 0,1 M, transferidas para um microtubo de centrífuga e centrifugadas novamente a 1000 x g, por 1 min. Em seguida, as células foram ressuspensas em 560 µL de solução de transformação (480 µL de PEG 3350 50% , 60 µL de acetato de lítio 1 M e 20 µL de DNA de esperma de salmão 10 mg/mL desnaturado a 100 °C por 10 min).

Aproximadamente 50 ng de plasmídeo – ou 2 µg de cassete de deleção – foram adicionados à suspensão celular, a qual foi então gentilmente homogeneizada. Após 45 min de incubação a 42 °C, as células foram centrifugadas a 1.000 x g por 30 s, ressuspensas em 1 mL de meio fresco e incubadas a 28 °C, por 2 h, ao final das quais foram lavadas 2 vezes com água ultrapura e plaqueadas em meio seletivo (i) desprovido de uracila, a marca de seleção em levedura do plasmídeo pYES2, ou (ii) desprovido de histidina, a marca de seleção do cassete de deleção para *LTNI* (Item 4.5). A incubação das placas foi realizada a 28 °C, pelo tempo necessário até que fosse possível realizar a visualização das colônias transformantes.

4.12. Ensaio de toxicidade à higromicina B

A capacidade de crescimento em meio YPD suplementado com higromicina B foi realizada pela verificação do crescimento celular tanto de *S. cerevisiae* selvagem quanto de mutantes dessa levedura, na presença e na ausência desse antibiótico. Para tal, o volume de 3 µL de diluições celulares 1; 1:10; 1:100; 1:1000; 1:10000 com Ab_{600nm} inicial de 0,2, foi sequencialmente adicionado em placas de Petri contendo YPD sólido, suplementado ou não com higromicina B 25, 50, 75 µg/mL. As imagens foram obtidas após 3 dias de crescimento celular a 28 °C.

4.13. Obtenção do extrato solúvel total de *S. cerevisiae*

A preparação do extrato solúvel total de *S. cerevisiae* foi realizada segundo Yonashiro, Tahara e colaboradores (YONASHIRO, TAHARA et al., 2016) com algumas modificações. Células cultivadas até a sua fase estacionária precoce de crescimento (Item 4.3) foram ressuspensas em 200 µL de tampão de lise [IGEPAL CA-630 0,2%, NaCl 140 mM, MgCl₂ 1.5 mM, coquetel inibidor de protease 2% (Sigma P8215), Tris-Cl 10 mM (pH 7,4)] sendo as suspensões resultantes adicionadas a microtubos de centrífuga de 1,5 mL contendo o volume de 100 µL de esferas de vidro de 0,5 mm de diâmetro. Assim, as suspensões foram homogeneizadas com o uso de um vórtex (Vortex Genie 2, Scientific Industries) operando em sua oscilação máxima, por 8 min, a 4 °C. Os lisados foram então transferidos a novos microtubos de centrífuga e centrifugados a 2800 x g por 10 min para a sedimentação dos debris celulares. Os sobrenadantes resultantes, contendo o extrato solúvel total de *S. cerevisiae*, foram então coletados e mantidos no gelo durante todo o experimento.

4.14. Quantificação de proteína

A quantificação de proteína foi realizada através do método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando reagente colorimétrico específico (BioAgency) através da

leitura das amostras em espectrofotômetro operando a 595 nm. Curvas analíticas com concentrações de 2 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL e 15 µg/mL de albumina bovina sérica foram diariamente construídas.

4.15. Western blotting

Quantidades variáveis de proteína previamente incubadas a 95 °C, por 3 min, em tampão de amostra [SDS 4%, azul de bromofenol 0,02%, glicerol 20%, ditiotreitol 200 mM, Tris-Cl (pH = 6,8)] foram utilizadas para a realização da eletroforese em gel bis-acrilamida 10 ou 12%, conduzida a 150 V, por 1,5 h, na presença de tampão de corrida [SDS 1%, glicina 2,5 M, Tris-Cl 250 mM (pH = 8,3)]. As proteínas do gel eletroforético foram então transferidas para uma membrana de PVDF Amersham Hybond de poro 0,45 µm (GE Healthcare) em um sistema de transferência semi-seco Trans-Blot (BioRad) por 60 min, com 2,35 mA de corrente por centímetro quadrado de área a ser transferida, utilizando um protocolo descontínuo: o papel filtro em contato com o ânodo foi embebido em tampão A (Tris base 300 mM, e metanol 20%), e o papel filtro em contato com o cátodo foi embebido em tampão B (Tris base 25 mM, glicina 40 mM, e metanol 20%). A membrana foi, em seguida, bloqueada em uma solução de 5% de leite em tampão TBST [Tween 20 0,05%, NaCl 150 mM e Tris-Cl 50 mM (pH = 7,6)] por, ao menos, uma hora e meia, e posteriormente utilizada para as subsequentes incubações com o anticorpo primário anti-FLAG M2 (Sigma F3165), na diluição 1:10.000; e anti-mouse IgG conjugado com HRP (Sigma A4416), também na diluição 1:10.000. As bandas foram reveladas com uso do substrato Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) e exposição da membrana a filme radiográfico Super HR-U 30 (Fujifilm) por diferentes intervalos, que variaram de 2 a 10 min, no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (ICB-UFMG).

4.16. Construção dos modelos tridimensionais de Hel2p e Rqc1p

A construção do modelo tridimensional de Hel2p e Rqc1p utilizando o servidor para predição de estrutura e função de proteínas I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) foi realizada através da submissão da estrutura primária das duas proteínas para análise. Para cada uma das proteínas analisadas foram gerados cinco modelos dos quais apenas um foi escolhido para a exibição nesta dissertação que é aquele que apresentava o maior valor de *C-score* dentre todos os modelos. O *C-score* um índice de confiança para estimar a qualidade dos modelos previstos pelo I-TASSER. É calculado com base na significância dos alinhamentos de gabarito de

segmentação, e nos parâmetros de convergência da estrutura simulações de montagem. O *C-score* encontra-se tipicamente na faixa de -5 a +2, em que um valor mais alto significa um modelo com alta confiança, e vice-versa.

5. RESULTADOS

5.1. Construção de modelos tridimensionais de Hel2p e Rqc1p

Uma vez que, dentre as proteínas estudadas neste trabalho – Rpl1bp, Asc1p, Hel2p, Rqc1p e Ltn1p – Hel2p e Rqc1p não possuem, até o presente momento, estruturas depositadas em bancos de dados específicos, decidimos realizar a predição de suas estruturas tridimensionais para a tentativa de prever as funções dessas proteínas, utilizando o servidor para predição de estrutura e função de proteínas I-TASSER (Item 4.16). Os modelos com maior *C-score* para Hel2p e Rqc1p estão apresentados na

Figura 4.

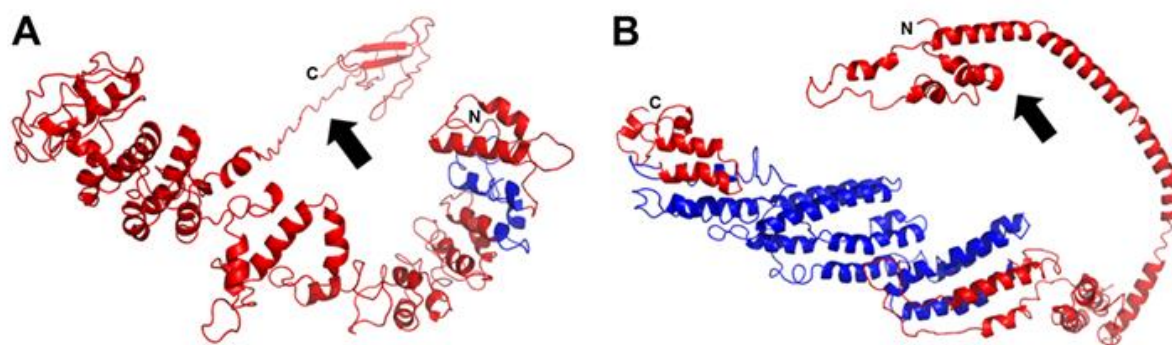


Figura 4. Representação do tipo fita de modelos tridimensionais de Hel2p e Rqc1p preditos pelo servidor para predição de estrutura e função de proteínas I-TASSER. Painel A: Predição da estrutura tridimensional de Hel2p. Em azul, o domínio *zinc finger* compreendido dentre os resíduos 59 a 111. Painel B: Predição da estrutura tridimensional de Rqc1p. Em azul, o domínio Tcf25, compreendido entre os resíduos 327 a 663. N: N-extremidade N-terminal; C: extremidade C-terminal. As setas indicam possíveis domínios proteicos dispostos na periferia das moléculas. As imagens acima foram geradas pelo *software* PyMOL (PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC).

Podemos observar que a predição estrutural para Hel2p (Fig. 4A) apresenta essa proteína como possuindo o comprimento de um eixo sobressaindo-se sobre seu outro, e sendo composta basicamente por alfa-hélices, possuindo um domínio *zinc finger* em sua região N-terminal (representado em azul), e também um possível domínio arranjado sob a forma de folhas-beta e *turns and loops* (indicado pela seta), que se encontra localizado na periferia da proteína, em sua extremidade N-terminal. A predição estrutural para Rqc1p (Fig. 4B) também sugere que esta proteína também possua um eixo sobressaindo-se ao outro, e uma extremidade N-terminal que possivelmente constitui um domínio. Considerando que a proteína Rqc1p faz parte do complexo RQC, é plausível que esse domínio em sua estrutura N-terminal seja responsável pela sua interação com as demais proteínas do complexo. Além disso, em azul está representado o domínio Tcf25 (resíduos 327 a 663), organizado em *helix-*

loop-helix, cujos portadores são considerados como repressores transcricionais (CAI et al., 2006). Finalmente, é notável que a estrutura secundária da Rqc1p é composta exclusivamente por alfa-hélices e por *turns and loops*.

5.2. Deleção de *LTNI* nos mutantes *rpl1bΔ*, *asc1Δ*, *hel2Δ* e *rqc1Δ*

Para o estudo do papel de proteínas ribossomais (Rpl1bp e Asc1p); de proteína associada ao ribossomo (Hel2p); e de proteínas do complexo RQC (Ltn1p e Rqc1p) na tradução em *S. cerevisiae*, foram utilizadas células da linhagem BY4741 carregando deleções gênicas para os genes que as codificam. As proteínas citadas foram escolhidas por terem sido descritas em outros trabalhos como promotoras de interrupção de síntese de proteínas a partir de mRNAs defeituosos. Como anteriormente abordado (Item 1.2), Rpl1b – proteína da subunidade 80S –, e Asc1p – proteína da subunidade 40S –, são capazes de interromper a tradução de mRNAs contendo trato de códons CGA, um códon raro de arginina neste organismo (GERBASI et al., 2004; LETZRING et al., 2013). Já Hel2p – uma proteína associada ao ribossomo – é capaz de interromper a tradução acidental da cauda poli(A) de mRNAs *non-stop* (YONASHIRO, TAHARA et al., 2016). A proteína Rqc1p, assim como a proteína Ltn1p, é parte integrante do complexo RQC (BRANDMAN et al., 2012). Dado que a Ltn1p é (i) a ubiquitina E3 ligase responsável pela ubiquitinação dos polipeptídeos defeituosos recém-sintetizados presos aos ribossomos; e que a ausência de sua atividade (ii) diminui sobremaneira a degradação de polipeptídeos *non-stop* e também (iii) aumenta a sensibilidade de *S. cerevisiae* à higromicina B (BENGTSON; JOAZEIRO, 2010), a combinação da deleção de *LTNI* com os genes que codificam as proteínas supracitadas abre a possibilidade do desenvolvimento de desenhos experimentais bastante promissores, dado que a ausência de *LTNI* nos mutantes *rpl1bΔ*, *asc1Δ*, *hel2Δ* e *rqc1Δ* pode, por exemplo, modular a sensibilidade destes mutantes à higromicina B, e também promover o acúmulo de proteínas *non-stop*, permitindo o estudo da expressão e do destino metabólico destas.

A partir da amplificação do gene *HIS3* de CEN.PK 113-7D por PCR, utilizando como molde o DNA genômico desta linhagem e também os oligonucleotídeos *forward* e *reverse* para o cassete de deleção (Item 4.5), obtivemos o cassete de deleção para substituir o gene *LTNI* nos mutantes simples de BY4741. A deleção gênica foi conduzida pela transformação desses mutantes com 2 µg do cassete de deleção (Item 4.11), o qual possui homologia com as regiões flanqueadoras 5' e 3' do gene *LTNI* permitindo, assim, a sua inserção por recombinação homóloga (Fig. 5A). O fato de a sequência de *HIS3* ter sido empregada como marca de seleção fez com que os transformantes – ou seja, os clones que tiveram o cassete

inserido em seu genoma – fossem capazes de crescer em meio de cultivo deficiente em histidina. Para então confirmarmos o êxito da deleção do gene *LTN1* nos mutantes *rpl1bΔ*, *asc1Δ*, *hel2Δ* e *rqc1Δ*, selecionamos um número variável (5-30) de colônias de transformantes His⁺, e então os cultivamos *overnight* em meio YPD, para que então tivessem seus DNAs genômicos extraídos (Item 4.4), para posterior genotipagem via PCR (Item 4.5). A utilização dos oligonucleotídeos *forward* e *reverse* para confirmação da deleção de *LTN1* (Item 4.5) garante a verificação da inserção do gene *HIS3* no *locus* de *LTN1* através da formação de um *amplicon* de 729 pares de bases (figura 5 B). O painel C da Figura 5 mostra o êxito da síntese deste *amplicon*, confirmando, portanto, a deleção do gene *LTN1* nos mutantes *rpl1bΔ*, *asc1Δ*, *hel2Δ* e *rqc1Δ*.

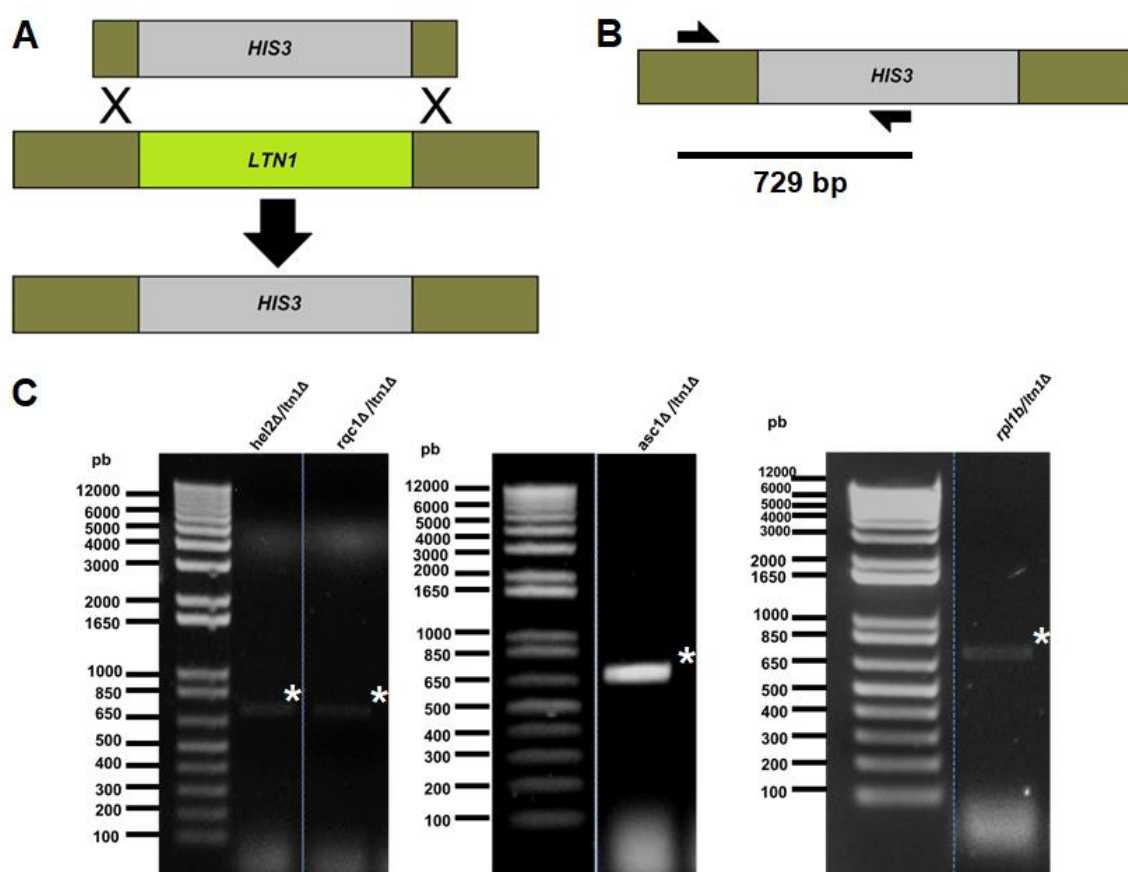


Figura 5. Deleção de *LTN1* nos mutantes *rpl1bΔ*, *asc1Δ*, *hel2Δ* e *rqc1Δ*. Painel A: Diagrama representativo do processo de recombinação homóloga que substitui o gene *LTN1* pelo gene *HIS3*, permitindo a seleção dos transformantes em meio SD desprovido de histidina. Painel B: Diagrama representativo da genotipagem dos transformantes via PCR. Foram testados, em média, 15 colônias de cada mutante para a obtenção de um clone apresentando a correta inserção do cassete de *HIS3* no *locus* de *LTN1*. Painel C: PCRs utilizando como molde o DNA genômico dos transformantes, com os oligonucleotídeos iniciadores para genotipagem mostrados na Tabela 2. Os asteriscos indicam a banda correspondente ao *amplicon* de 729 pb.

5.3. Ensaio de toxicidade à higromicina B

Como descrito anteriormente no item 1.2, a higromicina B é um antibiótico que promove a perda de fidelidade traducional e, portanto, *readthrough* dos códons de terminação, fazendo com que tanto os ribossomos procarióticos como os eucarióticos alcancem e traduzam cauda poli(A) de mRNAs (BOROVINSKAYA et al., 2008; BRODERSEN et al., 2000). Desta forma, este antibiótico torna-se uma importante ferramenta para a pesquisa da tolerância de diversos mutantes de levedura frente à geração de polipeptídeos contendo trato de poli-lisina em sua extremidade C-terminal, mesma característica dos polipeptídeos oriundos de mRNAs *non-stop*.

Desta forma, a célula WT e os mutantes *rpl1bΔ* e *asc1Δ*, carregando ou não deleções para *LTNI*, foram cultivados *overnight* em meio YPD, sendo, então, objeto de uma diluição seriada com Abs_{600nm} inicial de 0,2 sendo as diluições 1; 1:10; 1:100; 1:1000; 1:10000. Um volume de 3 μ L de cada diluição foi inoculado em placas de Petri meio YPD sólido, na ausência ou na presença de concentrações variáveis de higromicina B (Item 4.12). Após 3 dias de crescimento a 28 °C e 37 °C [sendo esta última a temperatura em que há ativação de *heat shock factor* em leveduras, o qual medeia respostas transcricionais a diversos tipos de estresse, inclusive o térmico (YAMAMOTO; MIZUKAMI; SAKURAI, 2005)], as placas de Petri foram fotografadas (Figura 6A). O mesmo foi realizado para os mutantes *hel2Δ* e *rqc1Δ*, carregando ou não deleções para *LTNI* (Figura 6B).

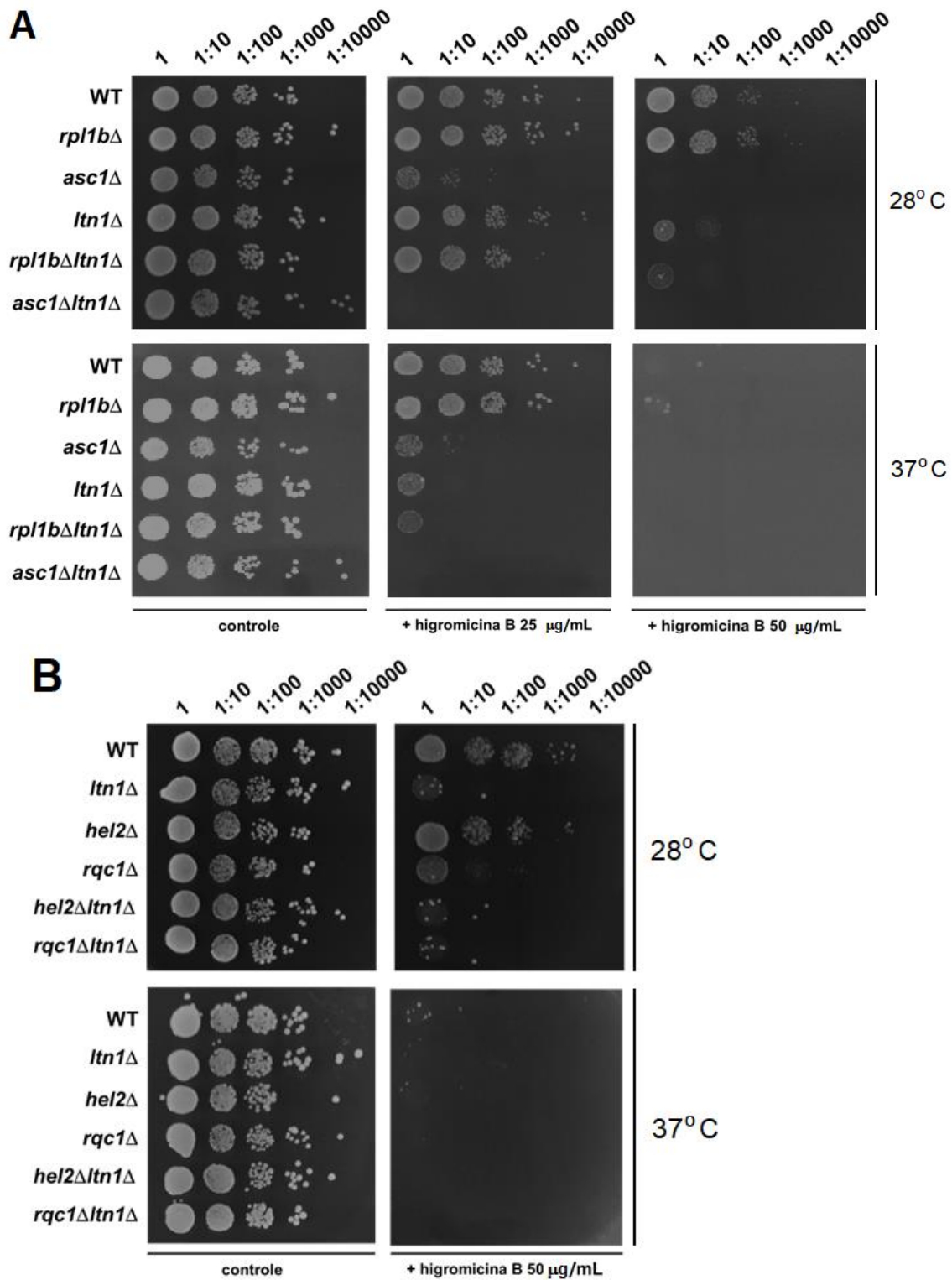


Figura 6. Ensaio de toxicidade à higromicina B. Painel A: crescimento em placa YPD controle, e suplementada com higromicina B 25 e 50 µg/mL, a 28 °C e 37 °C, da levedura WT, e dos mutantes *rpl1b*Δ e *asc1*Δ contendo ou não a deleção para *LTN1*. Painel B: crescimento em placa YPD controle, e suplementada com higromicina B 50 µg/mL, a 28 °C e 37 °C, da levedura WT, e dos mutantes *hel2*Δ e *rqc1*Δ contendo ou não a deleção para *LTN1*. As diluições indicadas no topo das imagens referem-se à Abs_{600nm} inicial de 0,2.

Podemos observar que o mutante *asc1Δ* apresenta marcante sensibilidade à higromicina B, porém não à temperatura. Além disso, a deleção de *LTN1* no mutante *asc1Δ* possui efeito sinérgico, promovendo uma sensibilidade ainda maior à higromicina B. Além disso, percebemos que o mutante *rpl1bΔ* apresenta fenótipo de sensibilidade à este antibiótico similar à célula WT, mostrando que o sequestro de ribossomos em mutantes *asc1Δ* e *ltl1Δ* é muito mais danoso do que neste mutante nulo para *RPL1B* (Figura 6A). Além disso, também verificamos que, enquanto o mutante *rqc1Δ* também apresenta elevada sensibilidade à higromicina B, o mutante *hel2Δ* não o faz na temperatura de 28 °C (Figura 6B).

5.4. Construção de repórteres para o estudo da interrupção traducional em *S. cerevisiae*

Com o propósito de estudar o destino metabólico de polipeptídeos defeituosos nas células *rpl1bΔ*, *asc1Δ*, *hel2Δ* e *rqc1Δ*, carregando ou não a deleção para *LTN1*, foram construídos repórteres capazes de provocar a interrupção da tradução, a consequente síntese de polipeptídeos defeituosos e o sequestro ribossomal.

Para obter os diferentes repórteres (Figura 7A), foram conduzidas PCRs utilizando como molde o DNA genômico da linhagem CEN.PK 113-7D de *S. cerevisiae*, conjuntamente com os respectivos oligonucleotídeos iniciadores descritos na Tabela 3. Tal como descrito nos Itens 4.7 e 4.8, os *amplicons* obtidos foram purificados e, sem seguida, digeridos com as endonucleases SacI e XbaI – as mesmas enzimas foram também utilizadas para a digestão do vetor pYES2, ao qual também foi adicionada fosfatase alcalina (Item 4.8). Os produtos de digestão foram purificados e cada inserto foi ligado ao vetor linearizado (Item 4.8). Em seguida, foi realizada a transformação de DH5α com cada produto de ligação (Item 4.9). Como intuito de verificar o sucesso da clonagem foi feita a extração de DNA plasmideal das bactérias transformantes, a partir do qual foi conduzida uma análise de restrição para pesquisa de clones positivos (Item 4.10). Os clones positivos foram selecionados, cultivados novamente, e tiveram o seu DNA plasmideal novamente extraído com kit comercial para tal (Item 4.10). Em todos os clones positivos foi observada a amplificação de fragmento de aproximadamente 750 pb a partir do uso dos próprios oligonucleotídeos utilizados para a obtenção de cada repórter (Figura 7B). Através da análise de restrição (com SacI e XbaI) desses mesmos plasmídeos foram observadas bandas correspondentes ao vetor pYES2 (de aproximadamente 6.000 pb), e também bandas correspondentes aos insertos liberados (de aproximadamente 750 pb) (Figura 7C).

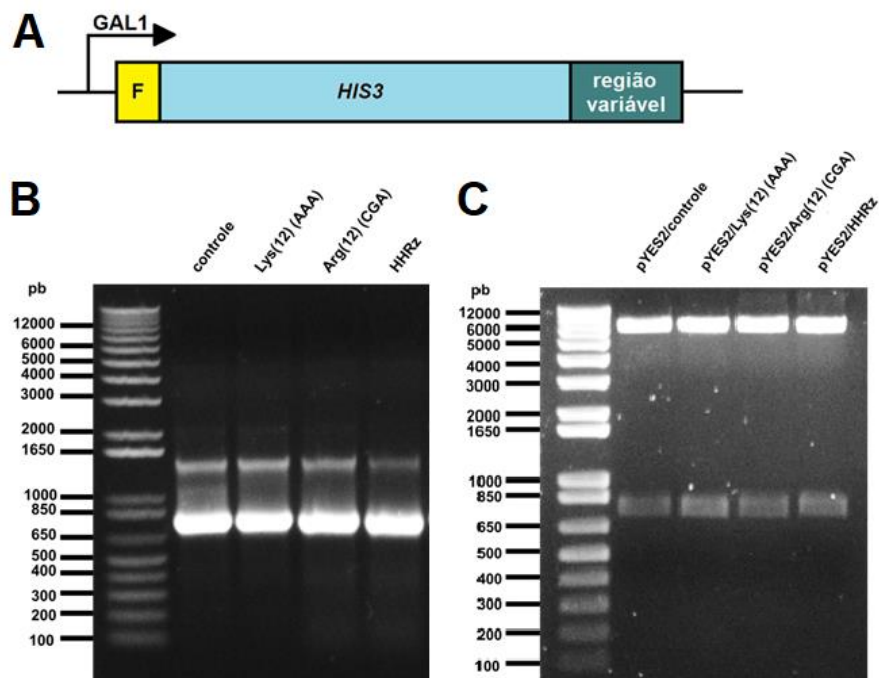


Figura 7. Construção de repórteres para o estudo da interrupção traducional em *S. cerevisiae*. Painei A: Figura esquemática representando a estrutura geral dos 4 repórteres construídos para este estudo: sequência nucleotídica para expressão de epítipo *FLAG* (em amarelo) na porção N-terminal da proteína-repórter, fusionada ao gene *HIS3* de levedura (em azul), que possui uma região nucleotídica variável em sua extremidade 3'. Essa região variável pode conter uma sequência de 2 códons de terminação em fase (controle); ou 12 códons AAA; ou 12 códons CGA; ou a sequência desoxinucleotídica que dá origem à ribozima *hammerhead*, RNA que possui atividade de auto-clivagem (Scott *et al.*, 2013). O promotor utilizado para a transcrição do mRNA a partir das construções (*GAL1*) encontra-se ativo quando há galactose como fonte de carbono no meio de cultura. Painei B: PCR para amplificação dos insertos correspondentes aos genes-repórter, utilizando os mesmos oligonucleotídeos iniciadores empregados para a clonagem. Painei C: análise de restrição utilizando enzimas *SacI* e *XbaI* dos plasmídeos contendo os repórteres, observando bandas de aproximadamente 6200 pb (correspondentes ao vetor pYES2), e bandas de aproximadamente 750 pb correspondentes aos insertos liberados.

Após os testes preliminares (Figura 7B e C) que indicaram o sucesso da clonagem, solicitamos, para cada construção, o sequenciamento de cada repórter, considerando a importância da obtenção das sequências corretas para a análise adequada dos resultados das etapas posteriores (Item 4.10). Os resultados dos sequenciamentos das construções evidenciaram que a clonagem foi realizada a contento. Os resultados dos sequenciamentos de cada construção apresentaram as sequências codificantes do epítipo *FLAG*, das regiões flangeadoras 5' e 3' (Figura 8)

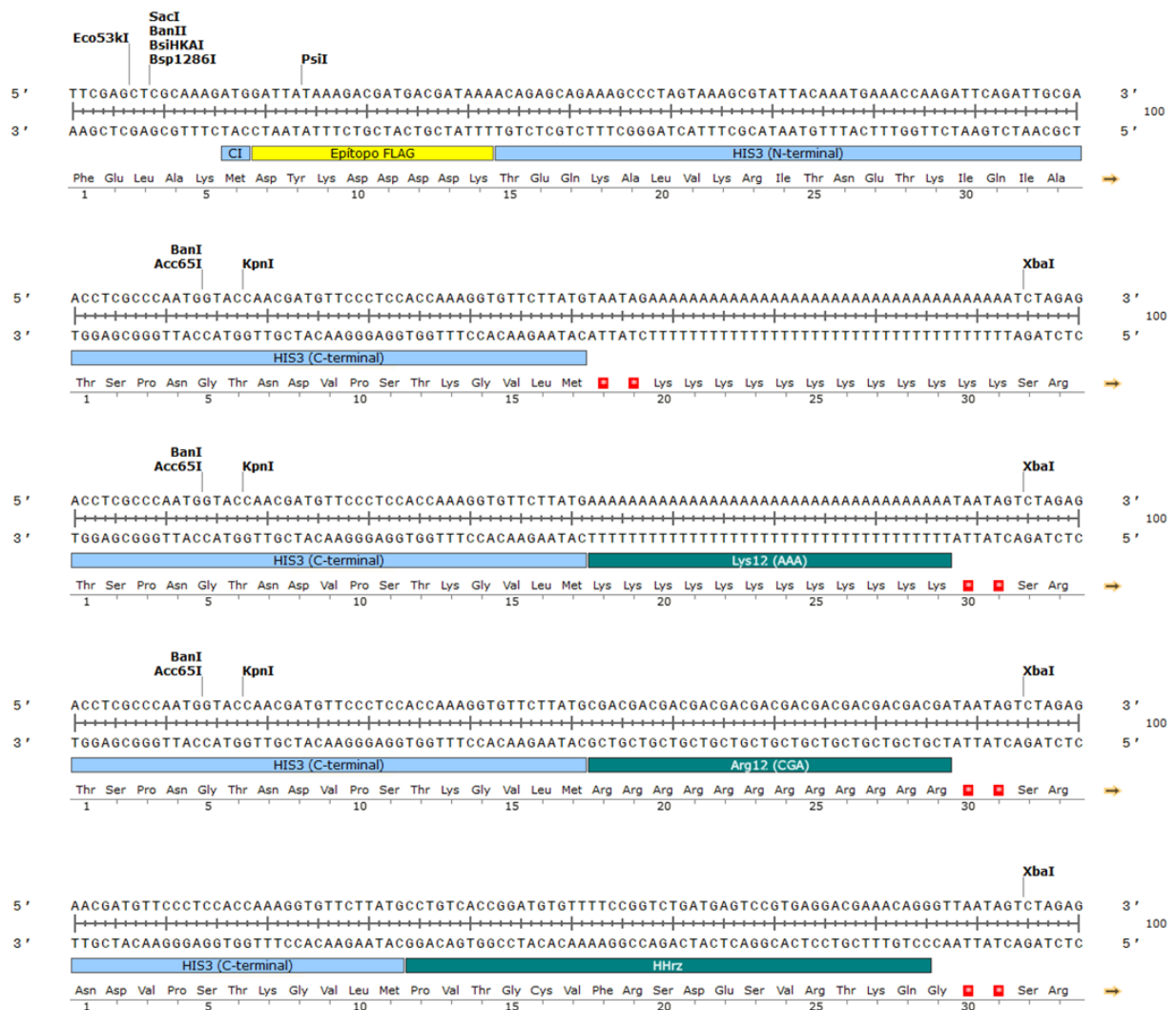


Figura 8. Resultados do sequenciamento dos repórteres. De cima para baixo: região 5' comum a todos os repórteres, contendo sequência para expressão de epítipo *FLAG* (em amarelo); porção 3' do repórter controle, possuindo dois códons de terminação em fase (em vermelho) após o término do gene *HIS3*; porção 3' do repórter contendo trato de 12 códons AAA e dois códons de terminação em fase (em vermelho); porção 3' do repórter contendo trato de 12 códons CGA e dois códons de terminação em fase (em vermelho); porção 3' do repórter contendo sequência desoxinucleotídica que dará origem à ribozima *hammerhead*, seguida de dois códons de terminação em fase (em vermelho). Apenas 100 bases estão aqui representadas, para o bem da clareza. Os sequenciamentos foram realizados pela empresa Myleus Biotecnologia (Belo Horizonte, MG), através de sequenciamento tipo Sanger por eletroforese capilar em aparelho ABI3730 (Life Technologies), utilizando polímero POP7 e BigDye v3.1.

5.5. Verificação do crescimento celular de transformantes de *S. cerevisiae*

A célula WT e os mutantes de *S. cerevisiae* foram transformados com as construções plasmídeais para cada repórter (Item 4.11). A partir dos transformantes obtidos, realizamos um ensaio para testar o crescimento em meio contendo galactose como única fonte de carbono (meio SGal suplementado com leucina e metionina; Item 4.3), inoculando 1×10^4 células por

spot. Observamos então que todos os transformantes cresceram de maneira satisfatória, com exceção dos mutantes *rpl1bΔ* e *rpl1Δltn1Δ*, infelizmente inviabilizando o prosseguimento dos ensaios que necessitam da indução da expressão das proteínas repórteres com galactose nesses dois mutantes (Figura 9).

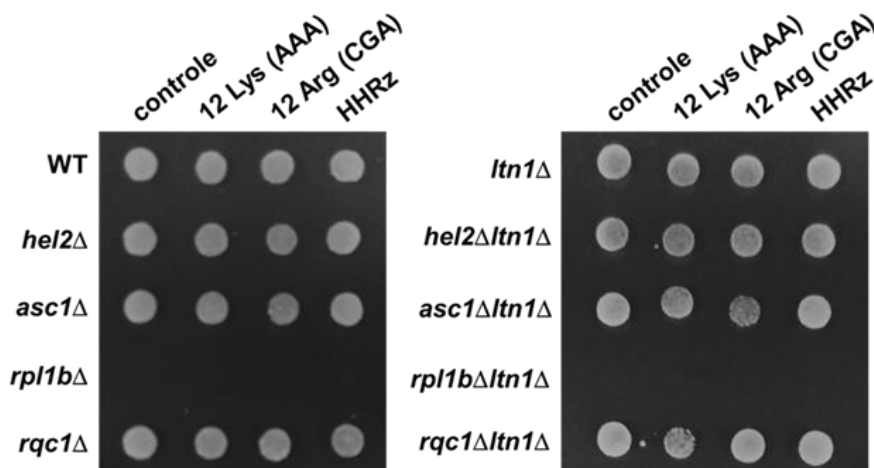


Figura 9. Teste de crescimento em meio sólido SGal. As células transformantes foram cultivadas *overnight* em meio líquido SD. As culturas tiveram a sua Abs_{600nm} determinada. O número de 1×10^4 células por *spot* foi inoculado em meio SGal suplementado com leucina e metionina [a suplementação com histidina não foi necessária pelo fato de tanto a proteína-repórter (Fig. 7) como os duplos mutantes (Fig. 5) possuírem o gene *HIS3*, tornando-os prototróficos para esse aminoácido]. As placas foram incubadas por 3 dias a 28 °C, ao fim dos quais as imagens foram obtidas.

Procedemos com duas novas transformações dos mutantes *rpl1bΔ* e *rpl1Δltn1Δ* para investigar se a ausência de crescimento era um problema específico daquela batelada; porém, nenhum dos transformantes, com nenhum repórter, em nenhuma das duas transformações adicionais, apresentou crescimento em galactose. Curiosamente, não há relatos na literatura descrevendo tal fenótipo em células deficientes em *RPL1B*.

5.6. Determinação do destino metabólico de polipeptídeos recém-sintetizados presos ao ribossomo.

Com a finalidade de verificarmos os níveis de expressão proteica dos repórteres controle *FLAG-HIS3-stop-codon*; *FLAG-HIS3-12 Lys (AAA)*; *FLAG-HIS3-12 Arg (CGA*, um códon raro nesse organismo) e *FLAG-HIS3-HHRz* (Fig. 8) em *S. cerevisiae* apresentando diferentes *backgrounds* genéticos, realizamos transformações de leveduras WT, e mutantes com deleção para os genes *HEL2*, *ASCI* e *RQCI*, contendo ou não uma deleção adicional para o gene *LTN1*, tal como descrito no Item 4.11. Após a transformação, os transformantes foram selecionados em meio SD desprovido de uracila, que é o marcador auxotrófico do plasmídeo

pYES2 (Item 4.11). Etapas de crescimento em meio SGal desprovido de uracila, obtenção do extrato proteico total e *Western blotting* foram conduzidos segundo os itens 4.13, 4.14 e 4.15.

A expressão de um repórter contendo um trato de 12 lisinas ou 12 argininas codificadas pelo códon CGA, bem como de um repórter que possui atividade de ribozima *hammerhead* – que apresenta auto-clivagem –, promove a interrupção da tradução. Para a eletroforese de proteínas, utilizamos géis de poliacrilamida 10 ou 12%, os quais proveram resoluções diferentes para bandas de interesse, como será discutido logo abaixo.

Para a célula WT e para cada mutante (*asc1Δ*, *hel2Δ*, *rqc1Δ*, *asc1Δltn1Δ*, *hel2Δltn1Δ*, e *rqc1Δltn1Δ*) expressando cada um dos quatro repórteres, foram realizados ao menos três replicatas biológicas independentes. Infelizmente, devido a variáveis não identificadas (tais como ausência de sinal nas membranas, padrão errático de migração no gel de poliacrilamida, ausência de crescimento celular, entre outros), fomos impedidos de prover maior robustez aos dados de *Western blotting* através do estudo dos efeitos de cada repórter em todos os mutantes de forma adequada. Variações do desenho experimental foram realizadas, tais como a utilização de géis de poliacrilamida de ainda menor concentração do que 10% (foram utilizados também géis de 8% e 6%), mudanças no protocolo de transferência (diferentes tampões de transferência, amperagem e tempo de transferência foram empregados), as quais, porém, não se mostraram bem-sucedidas. Testamos ainda diferentes condições para a quantificação de proteína através do método de Bradford (variámos os volumes adicionados de amostra ao tubo de ensaio); diferentes concentrações de anticorpos primários e secundários, além de diferentes volumes de substrato quimioluminescente (também diferentes tempos de exposição da membrana a este); entretanto, apesar de todos esses esforços, não alcançamos êxito em padronizar esse ensaio. De fato, esperávamos ver a aparição de agregados proteicos de alto peso molecular em mutantes com deleção no gene *LTN1* expressando o repórter *FLAG-HIS3-12 Lys* (AAA), devido ao fato de a ausência *Ltn1p* promover a ativação de uma via de agregação proteica utilizando como substratos os polipeptídeos defeituosos recém-sintetizados oriundos deste repórter (YONASHIRO, TAHARA et al., 2016); entretanto, observamos esses agregados em apenas uma das 6 replicatas biológicas.

Assim, optamos por seguir com as combinações repórter-células que apresentaram maior reprodutibilidade e maior consistência ao longo do período exploratório. Desta forma, prosseguimos nosso estudo com a determinação do destino metabólico de proteínas defeituosas sintetizadas a partir dos repórteres *FLAG-HIS3-12 Arg* (CGA) e *FLAG-HIS3-HHRz* (Figura 10).

Observamos que células com deleção do gene *LTN1* expressando *FLAG-HIS3-HHRz* apresentam bandas de 24 kDa (peso correspondente à proteína-repórter) mais intensas do que as células WT, *asc1Δ* e *rqc1Δ*, mas não do que no mutante *hel2Δ*, sugerindo que a ausência de atividade de Ltn1p nesses mutantes (*asc1Δltn1Δ*, *hel2Δltn1Δ*, e *rqc1Δltn1Δ*) prejudica a degradação do polipeptídeo sintetizado a partir desse repórter clivado em sua região codificante, e que a atividade de Hel2p é importante para a degradação destes (Figura 10A). Outra característica observada foi a formação de bandas de baixa migração eletroforética, correspondentes a agregados proteicos de alto peso molecular que contém propriedades comuns a agregados do tipo beta-amilóide (YONASHIRO; TAHARA et al., 2016) em todos os mutantes apresentando deleção no gene *LTN1* (Figura 10A). A formação desses agregados se correlaciona com a ativação de uma resposta de estresse na célula, indicando que esses agregados criam um sinal que induz a célula a se proteger em resposta ao acúmulo de mais proteínas anormais.

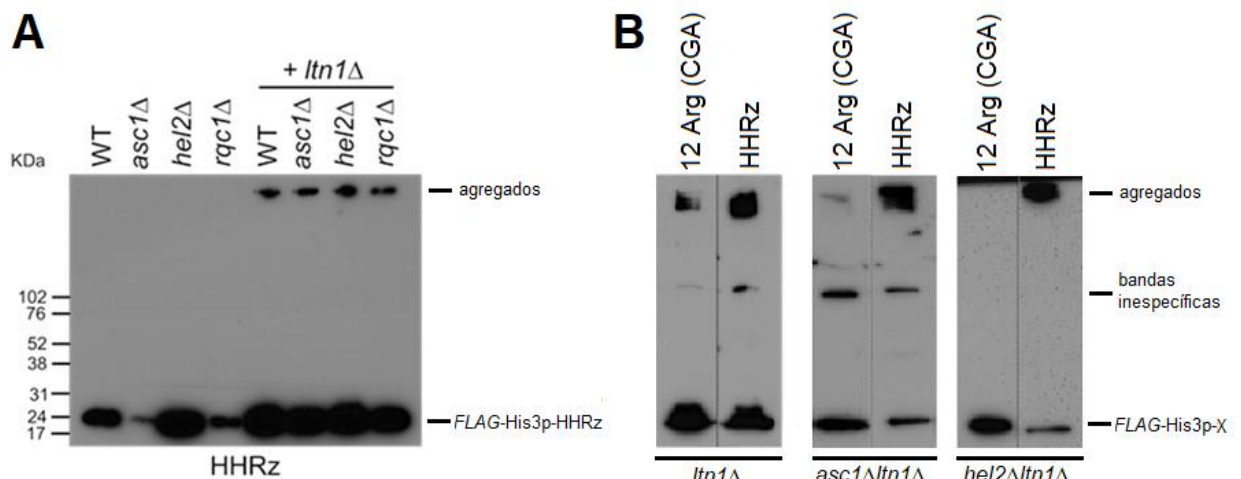


Figura 10. Determinação do destino metabólico de polipeptídeos recém-sintetizados presos aos ribossomos. Painel A: *FLAG-blot* para verificação da presença de *FLAG-His3p-HHRz* em *S. cerevisiae* WT, e nos mutantes *asc1Δ*, *hel2Δ*, e *rqc1Δ* contendo ou não deleção do gene *LTN1*. Diluição do anticorpo primário anti-*FLAG*: 1:10.000; diluição do anticorpo secundário anti-mouse IgG conjugado com HRP: 1:10.000. Os números à esquerda da figura representam a migração do marcador de peso molecular utilizado na eletroforese, sendo os valores indicados expressos em kDa. A figura é representativa de ao menos 3 repetições biológicas independentes. Gel utilizado continha 12% de poliácridamida. Quantidade de proteína utilizada em cada poço: 50 µg (Bradford; Item 4.14). Painel B: *FLAG-blot* para verificação da presença de *FLAG-His3p-12 Arg (CGA)* e *FLAG-His3p-HHRz* em *S. cerevisiae ltn1Δ*, *asc1Δltn1Δ*, e *hel2Δltn1Δ*. X = 12 Arg (CGA) ou HHRz. A figura é representativa de 3 repetições biológicas independentes. Géis utilizados continham 10% de poliácridamida. Quantidade de proteína utilizada em cada poço: 50 µg (Bradford; Item 4.14).

Em um segundo momento, utilizando gel poliácridamida de menor concentração – 10%, que permitiu uma maior migração dos agregados de alto peso molecular levando à uma melhor visualização destes – o destino metabólico das proteínas-repórter sintetizadas pelo

repórter HHRz foi comparado com aquele das proteínas-repórter advindas do repórter *FLAG-HIS3-12 Arg (CGA)* em mutantes *ltn1Δ*, *asc1Δltn1Δ*, e *hel2Δltn1Δ* (Figura 10B). Confirmamos novamente a agregação da proteína-repórter *FLAG-His3p-HHRz* em células desprovidas de Ltn1p e também, interessantemente, observamos a formação de agregados de polipeptídeos *FLAG-His3p-Arg 12 (CGA)* nos mutantes *ltn1Δ* e *asc1Δltn1Δ*, porém não no mutante *hel2Δltn1Δ*. Desta forma, podemos concluir que a deleção de *HEL2* em células *ltn1Δ* impede a formação dos agregados proteicos a partir de um repórter que possui um trato de 12 códons *CGA*, mas não para um repórter apresentando auto-clivagem em sua região codificante (*FLAG-HIS3-HHRz*), sugerindo a participação de Hel2p na via de agregação proteica de polipeptídeos presos aos ribossomos pela falta de um tRNA^{Arg} de anti-códon GCU (correspondente ao códon *CGA*), mas não de polipeptídeos presos aos ribossomos pela interrupção da tradução provocada pela ausência do próximo códon no mRNA (condição promovida pela auto-clivagem da HHRz). Além disso, a quantidade aumentada da proteína repórter *FLAG-His3p-12 Arg (CGA)* em relação à quantidade de *FLAG-His3p-HHRz* (Figura 10A) sugere (i) o acúmulo da proteína-repórter tal como gerada pelos ribossomos, ou seja, na forma de monômeros, e (ii) a sua incapacidade de ser substrato de Tae2p, a proteína do complexo RQC responsável pela adição de cauda de alanina-treonina à extremidade C-terminal do polipeptídeo *non-stop* preso ao ribossomo 60S, evento que é o início da via de agregação de polipeptídeos defeituosos recém-sintetizados (OSUNA et al., 2017).

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho foi conduzida a construção de genes-repórter de diferentes naturezas que provocam a interrupção da tradução: um repórter contendo um trato de 12 códons AAA, suficiente para a promoção da interrupção traducional em *S. cerevisiae* (ITO-HARASHIMA et al., 2007); um segundo repórter contendo um trato de 12 códons CGA (LETZRING et al., 2013); e um terceiro repórter que apresenta a sequência da ribozima *hammerhead* (SCOTT; HORAN; MARTICK, 2013) em sua sequência codificante que, por apresentar auto-clivagem, gera um repórter desprovido de códon de terminação. A interrupção traducional e o sequestro ribossomal provocados por esses repórteres recrutam o complexo RQC para o ribossomo 60S, com o objetivo de ubiquitinar e extrair o polipeptídeo defeituoso recém-sintetizado, para que este possa ser, então, direcionado ao proteassomo para degradação (BENGTSON; JOAZEIRO, 2010). Desta forma, esses três repórteres tornam-se importantes para a condução do estudo do destino metabólico dos polipeptídeos defeituosos recém-sintetizados em células contendo deleções de genes que promovem a interrupção traducional em situações excepcionais, como a proteína da subunidade 60S Rpl1bp (PLANTA; MAGER, 1998; Figura 2); a proteína da subunidade 40S Asc1p (CHANTREL et al., 1998; Figura 3), e a proteína associada ao ribossomo Hel2p (SINGH et al., 2012; Figura 4A). Além disso, os repórteres também podem prestar auxílio para o entendimento de como proteínas do complexo RQC – a E3 ubiquitina ligase Ltn1p (Braun et al., 2007) e a proteína Rqc1p (BRANDMAN et al., 2012) – desempenham seus papéis biológicos.

Inicialmente, com o objetivo de testar qual o impacto da deleção desses genes supracitados na capacidade de tolerar a geração de polipeptídeos *non-stop* e o sequestro ribossomal, empregamos a higromicina B, antibiótico aminoglicosídico que provoca a perda da fidelidade traducional através da ocorrência de *frameshifting* e a consequente formação de polipeptídios defeituosos (BOROVINSKAYA et al., 2008). De fato, em 2010, Bengtson e Joazeiro observaram que deleção de Ltn1p provoca um aumento na sensibilidade de *S. cerevisiae* a este antibiótico, sugerindo que o *frameshift* e a consequente produção de polipeptídeos *non-stop* promovem alta toxicidade a células desprovidas de atividade de Ltn1p. Fomos capazes de reproduzir esses resultados com êxito (Figura 6, 28 °C), e também de observar que a deleção do gene *RQC1* também promove o mesmo fenótipo observado para células *ltn1Δ* (Figura 6B). Esse achado sugere que a ausência de atividade de Rqc1p afeta *S. cerevisiae* na presença de higromicina B na mesma extensão que a ausência da atividade de Ltn1p. Além disso, interessantemente, parece haver um efeito sinérgico promovido pela

deleção simultânea desses dois genes (Figura 6, 28 °C). Além disso, enquanto o mutante *asc1Δ* mostrou-se especialmente sensível à higromicina B células desprovidas de *RPL1B* e *HEL2* não o fizeram (Figura 6A, 28 °C). Adicionalmente, a deleção do gene *LTN1* aos mutantes simples fez com que todos os duplos mutantes tivessem o fenótipo de sensibilidade à higromicina B bastante acentuado (Figura 6, 28 °C); de fato, o mutante *asc1Δltm1Δ* não apresentou crescimento em meio suplementado com higromicina B 25 µg/mL (Figura 6A, 28 °C). Assim, concluímos que Asc1p e a atividade do complexo RQC previnem a toxicidade promovida pela higromicina B, uma droga que promove perda da fidelidade traducional (Figura 11A). Finalmente, percebemos que a temperatura de 37 °C, condição que promove a expressão de fatores de choque térmico em *S. cerevisiae* (YAMAMOTO; MIZUKAMI; SAKURAI, 2005), potencializa a ação tóxica da higromicina B (Figura 6, 37 °C).

Wolf e Grayhack demonstraram que *S. cerevisiae* desprovida de *ASC1* está sujeita a um *frameshift* promovido pela repetição de códons CGA, resultando na produção de polipeptídeos recém-sintetizados defeituosos (WOLF; GRAYHACK, 2015). De fato, *S. cerevisiae asc1Δltm1Δ* expressando o repórter *FLAG-HIS3-12 Arg* (CGA) mostra a formação de agregados proteicos de alto peso molecular, sintetizados provavelmente pelo acúmulo de *FLAG-His3p-12 Arg* (CGA) recém-sintetizadas presas aos ribossomos (Figura 10B); além disso, o mesmo repórter quando expresso em uma célula *ltm1Δ* – ou seja, um mutante que possui atividade de Asc1p – gerou agregados proteicos de alto peso molecular em aparente em maior quantidade, sugerindo que Asc1p está possivelmente envolvida com a via de agregação desses polipeptídeos defeituosos recém-sintetizados.

Brandman e colaboradores (BRANDMAN et al., 2012), assim como Yonashiro, Tahara e colaboradores (YONASHIRO; TAHARA et al., 2016) observaram que Hel2p participa da interrupção da tradução devido à formação de sequências polibásicas no peptídeo nascente, que é então ubiquitinado pelo complexo RQC, sendo posteriormente degradado. Interessantemente, uma vez que a quantidade de *FLAG-His3p- HHRz* é maior na célula *hel2Δ* do que na célula WT, os nossos resultados sugerem que Hel2p também pode ser importante para a degradação de proteínas que não contém sequências polibásicas, mas que estão incompletas devido à ausência do próximo códon no mRNA (Figura 10A), situação aqui mimetizada pela presença da ribozima *hammerhead* na região codificante do repórter (Figura 8). Além disso, verificamos que mutantes *hel2Δltm1Δ* expressando o repórter *FLAG-HIS3-12 Arg* (CGA) não apresentaram a formação de agregados proteicos de alto peso molecular,

diferentemente do mutante simples *ltn1* Δ (Figura 10B) no qual se observou a presença destes. Logo, essas observações sugerem que Hel2p é importante para que os polipeptídeos gerados pela expressão de *FLAG-HIS3-12 Arg (CGA)* sejam substrato da via de agregação proteica na ausência de atividade de Ltn1p (Figura 11B).

O estudo dos mecanismos traducionais e seu controle de qualidade são de grande importância pelo fato de que camundongos deficientes em listerin (Ltn1p em *S. cerevisiae*) possuem marcante neurodegeneração, apresentando fenótipos típicos da esclerose lateral amiotrófica (CHU et al., 2009). Assim sendo, a possibilidade de confirmação da correlação entre defeitos no sistema RQC com doenças neurodegenerativas – muitas das quais possuem agregados proteicos como marcas fenotípicas, tais como, doença de Parkinson, doença de Alzheimer, doença de Huntington, e doença de Creutzfeldt-Jakob, muitos dos quais são grandes ameaças à saúde e ao bem-estar humano no mundo (KUMAR; NAWROTH; TYEDMERS, 2016) – deixa em aberto a possibilidade de, no futuro, estabelecer que defeitos no controle de qualidade em síntese de proteína podem ser uma das causas do estabelecimento de doenças neurodegenerativas.

7. CONCLUSÕES

- 1) Células *rqc1Δ* e *asc1Δ*, além do mutante *ltn1Δ*, possuem marcante sensibilidade à higromicina B;
- 2) A integridade do complexo RQC é fundamental para se mitigar o efeito tóxico da higromicina em *S. cerevisiae*;
- 3) Hel2p parece estar envolvida na degradação de polipeptídeos incompletos (aqueles que são codificados por um mRNA que sofreu clivagem em sua região codificante);
- 4) Em uma condição de deficiência de atividade do complexo RQC, Hel2p é necessária para a iniciação da via de agregação proteica de polipeptídeos recém-sintetizados defeituosos presos ao ribossomo que carregam região codificada por códons raros.

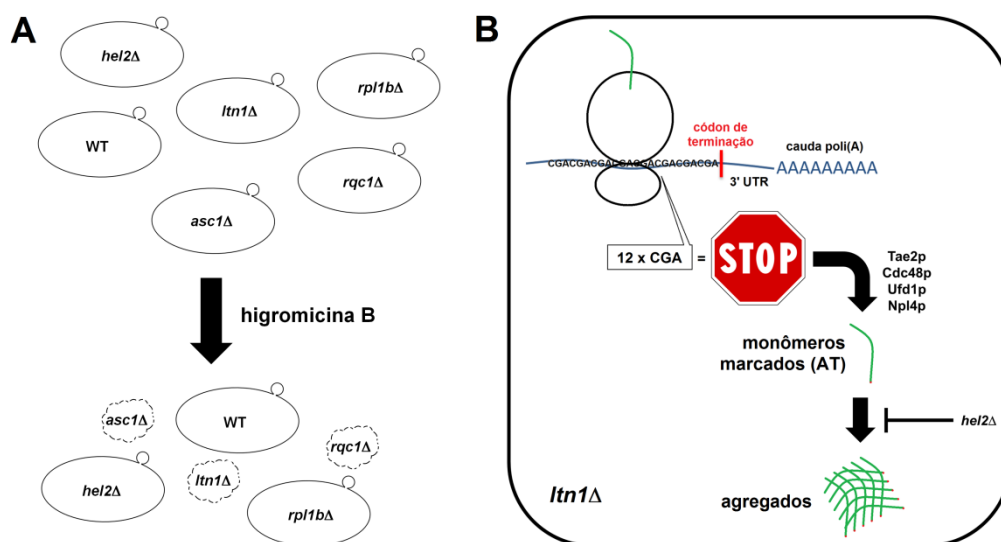


Figura 11. Efeitos da deleção de *ASCI*, *RQC1*, *LTN1* e *HEL2* em *S. cerevisiae*. Painel A: Os mutantes *asc1Δ*, *rqc1Δ* e *ltn1Δ* mostraram marcante sensibilidade à higromicina B. Painel B: Trato de 12 códons CGA interrompem a tradução, que em células *ltn1Δ* promove a marcação dos polipeptídeos presos aos ribossomos com uma cauda de alanina-treonina (AT) por Tae2p, iniciando a via de agregação proteica. Na ausência de Hel2p, a agregação desses polipeptídeos FLAG-His3p-Arg 12 (CGA), nesse contexto, é abolida.

8. PERSPECTIVAS

- 1) Identificar e isolar a variável que hoje promove a falta de reprodutibilidade (tais como ausência de sinal nas membranas, padrão errático de migração no gel de poliacrilamida, ausência de crescimento celular, entre outros) nos procedimentos laboratoriais;
- 2) Obter repórteres-controle (i) para o repórter carregando ribozima *hammerhead*; (ii) e para o repórter que possui códons raros de arginina;
- 3) Realizar imunoprecipitação, via *FLAG*, dos repórteres visando à identificação das proteínas co-imunoprecipitadas para o início da elucidação dos mecanismos de degradação e agregação dos polipeptídeos defeituosos recém-sintetizados.

9. BIBLIOGRAFIA

- AKIMITSU, N.; TANAKA, J.; PELLETIER, J. Translation of nonSTOP mRNA is repressed post-initiation in mammalian cells. v. 26, n. 9, p. 2327–2338, 2007.
- ATKINSON, G. C.; BALDAUF, S. L.; HAURYLIUK, V. and their termination factor-derived components. v. 18, p. 1–18, 2008.
- BASERGA, S. J. Ribosome Biogenesis in the Yeast. v. 195, n. November, p. 643–681, 2013.
- BENGTSON, M. H.; JOAZEIRO, C. A P. Role of a ribosome-associated E3 ubiquitin ligase in protein quality control. **Nature**, v. 467, n. 7314, p. 470–473, 2010.
- BOROVINSKAYA, M. A. et al. Structural basis for hygromycin B inhibition of protein biosynthesis. p. 1590–1599, 2008.
- BRACHMANN, C. B. et al. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: A useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. **Yeast**, v. 14, n. 2, p. 115–132, 1998.
- BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. v. 254, p. 248–254, 1976.
- BRANDMAN, O. et al. A Ribosome-Bound Quality Control Complex Triggers Degradation of Nascent Peptides and Signals Translation Stress. **Cell**, v. 151, n. 5, p. 1042–1054, 2012.
- BRANDMAN, O.; HEGDE, R. S. HHS Public Access. v. 23, n. 1, p. 7–15, 2016.
- BRAUN, M. A et al. Identification of Rkr1, a nuclear RING domain protein with functional connections to chromatin modification in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and cellular biology**, v. 27, n. 8, p. 2800–11, 2007.
- BRODERSEN, D. E. et al. The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B, on the 30S ribosomal subunit. **Cell**, v. 103, n. 7, p. 1143–1154, 2000.
- CAI, Z. et al. of serum response factor q. v. 343, p. 973–981, 2006.
- CALOGERO, R. A et al. Selection of the mRNA translation initiation region by *Escherichia coli* ribosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 17, p. 6427–6431, 1988.
- CHANTREL, Y. et al. The transcriptional regulator Hap1p (Cyp1p) is essential for anaerobic or heme-deficient growth of *Saccharomyces cerevisiae*: Genetic and molecular characterization of an extragenic suppressor that encodes a WD repeat protein. **Genetics**, v. 148, n. 2, p. 559–569, 1998.
- CHU, J. et al. A mouse forward genetics screen identifies LISTERIN as an E3 ubiquitin ligase involved in neurodegeneration. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 7, p. 2097–2103, 17 fev. 2009.

- DE DEKEN, R. H. The Crabtree Effect: A Regulatory System in Yeast. **Journal of General Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 149–156, 1966.
- DEVER, T. E.; GREEN, R. Phases of Translation in Eukaryotes. 2012.
- DEVER, T. E.; KINZY, T. G.; PAVITT, G. D. Mechanism and Regulation of Protein Synthesis in. v. 203, n. May, p. 65–107, 2016.
- DOBSON, C.; KARPLUS, M. The fundamentals of protein folding: bringing together theory and experiment. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 9, p. 92–101, 1999.
- ELLIS, R. J.; HARTL, F. U. Principles of protein folding in the cellular environment. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 9, n. 1, p. 102–110, 1999.
- FRISCHMEYER, P. A.; HOOFF, A. VAN; DIETZ, H. C. An mRNA Surveillance Mechanism That Eliminates Transcripts Lacking Termination Codons. v. 295, n. March, p. 2258–2261, 2002.
- GE, Z. et al. Non-stop mRNA decay initiates at the ribosome. v. 78, n. September, p. 1159–1170, 2010.
- GERBASI, V. R. et al. Yeast Asc1p and mammalian RACK1 are functionally orthologous core 40S ribosomal proteins that repress gene expression. **Molecular and cellular biology**, v. 24, n. 18, p. 8276–87, 2004.
- GILLET, R.; FELDEN, B. Transfer RNA A₁ recognizes transfer-messenger RNA with specificity; a functional complex prior to entering the ribosome? **EMBO Journal**, v. 20, n. 11, p. 2966–2976, 2001.
- GOFFEAU, A. et al. Life with 6000 genes. **Science**, v. 274, n. 5287, p. 546–567, 1996.
- GRAILLE, M.; SÉRAPHIN, B. translation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 11, p. 727–735, 2012.
- GRANT, S. G. et al. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 12, p. 4645–4649, 1990.
- GREEN AND, R.; NOLLER, H. F. Ribosomes and Translation. **Annual Review of Biochemistry**, v. 66, n. 1, p. 679–716, 1997.
- HARJU, S.; FEDOSYUK, H.; PETERSON, K. R. Rapid isolation of yeast genomic DNA : Bust n TM Grab. v. 6, p. 1–6, 2004.
- HART, W. E.; ISTRAIL, S. Fast protein folding in the hydrophobic-hydrophilic model within three-eighths of optimal. In **Proceedings of the 27 th Annual ACM Symposium on the Theory of Computing**, v. 3, n. 1, p. 157–168, 1995.
- HUANG, K. et al. Solution structure of the MEF2A-DNA complex: structural basis for the modulation of DNA bending and specificity by MADS-box transcription factors. **Embo J**, v. 19, n. 11, p. 2615–2628, 2000.
- ITO-HARASHIMA, S. et al. Translation of the poly(A) tail plays crucial roles in nonstop mRNA surveillance via translation repression and protein destabilization by

- proteasome in yeast. **Genes & Development**, v. 21, n. 5, p. 519–524, 1 mar. 2007.
- KEILER, K. C.; WALLER, P. R. H.; SAUER, R. T. Role of a Peptide Tagging System in Degradation of Proteins Synthesized from Damaged Messenger RNA Author (s): Kenneth C . Keiler , Patrick R . H . Waller and Robert T . Sauer Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL. v. 271, n. 5251, p. 990–993, 1996.
- KIBBE, W. A. OligoCalc: An online oligonucleotide properties calculator. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. SUPPL.2, p. 43–46, 2007.
- KOZAK, M. How do eukaryotic ribosomes select imitation regions in messenger RNA? **Cell**, v. 15, n. December, p. 1109–1123, 1978.
- KUMAR, R.; NAWROTH, P. P.; TYEDMERS, J. Prion Aggregates Are Recruited to the Insoluble Protein Deposit (IPOD) via Myosin 2-Based Vesicular Transport. p. 1–31, 2016.
- LETZRING, D. P. et al. Translation of CGA codon repeats in yeast involves quality control components and ribosomal protein L1. v. 1, p. 1208–1217, 2013.
- LOUIS, E. J. Historical evolution of laboratory strains of *saccharomyces cerevisiae*. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2016, n. 7, p. 585–593, 2016.
- LU, J.; DEUTSCH, C. NIH Public Access. v. 384, n. 1, p. 73–86, 1996.
- LYUMKIS, D. et al. Structural basis for translational surveillance by the large ribosomal subunit-associated protein quality control complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 45, p. 15981–15986, 11 nov. 2014.
- MAXWELL BURROUGHS, A.; ARAVIND, L. A highly conserved family of domains related to the DNA-glycosylase fold helps predict multiple novel pathways for RNA modifications. **RNA Biology**, v. 11, n. 4, p. 360–372, 2014.
- NICO, P.; BOTT, L. C.; HOL, E. M. The ubiquitin-proteasome system in neurodegenerative diseases : precipitating factor , yet part of the solution. v. 7, n. July, p. 1–18, 2014.
- OCHOA, S. Initiation of Protein Synthesis in Prokaryotes and Eukaryotes 1. **Reactions**, v. 81, n. 6, 1977.
- OSUNA, B. A. et al. In vitro analysis of RQC activities provides insights into the mechanism and function of CAT tailing. **eLife**, v. 6, p. 1–19, 2017.
- PLANTA, R. J. J.; MAGER, W. H. H. The list of cytoplasmic ribosomal proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 14, n. 5, p. 471–477, 1998.
- PRETORIUS, I. S. Tailoring wine yeast for the new millennium : novel approaches to the ancient art of winemaking. n. Figure 1, p. 675–729, 2000.
- SCOTT, W. G.; HORAN, L. H.; MARTICK, M. The Hammerhead Ribozyme: Structure, Catalysis and Gene Regulation. p. 1–20, 2013.
- SHAO, S. et al. Structure and assembly pathway of the ribosome quality control complex. **Molecular Cell**, v. 57, n. 3, p. 433–445, 2015.

- SHAO, S.; HEGDE, R. S. Reconstitution of a Minimal Ribosome-Associated Ubiquitination Pathway with Purified Factors. **Molecular Cell**, v. 55, n. 6, p. 880–890, 2014.
- SHERMAN, B. F.; SHERMAN, M. F.; ENZYMOL, M. Getting Started with Yeast • Contents • v. 41, n. 2002, p. 3–41, 2003.
- SHERMAN, M. Y.; GOLDBERG, A. L. Cellular defenses against unfolded proteins: A cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. **Neuron**, v. 29, n. 1, p. 15–32, 2001.
- SHOEMAKER, C. J.; EYLER, D. E.; GREEN, R. NIH Public Access. v. 330, n. 6002, p. 369–372, 2010.
- SINGH, R. K. et al. Novel E3 Ubiquitin Ligases That Regulate Histone Protein Levels in the Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e36295, 2012.
- SITRON; COLE. Asc1, Hel2, and Slh1 couple translation arrest to nascent chain degradation. **Seikeigeka. Orthopedic surgery**, v. 20, n. 14, p. 1513–4, 2017.
- TANG, C. Simple models of the protein folding problem. **Physica A Statistical Mechanics and its Applications**, v. 288, p. 31–48, 2000.
- UEMURA, S. et al. Peptide bond formation destabilizes Shine-Dalgarno interaction on the ribosome. **Nature**, v. 446, n. 7134, p. 454–457, 2007.
- VASUDEVAN, P. et al. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. v. 92, p. 179–185, 2003.
- WINTERMEYER, W. et al. Mechanisms of elongation on the ribosome: dynamics of a macromolecular machine. **Biochemical Society transactions**, v. 32, n. Pt 5, p. 733–737, 2004.
- WOLF, A. S.; GRAYHACK, E. J. Asc1, homolog of human RACK1, prevents frameshifting in yeast by ribosomes stalled at CGA codon repeats. **Rna**, v. 21, n. 5, p. 935–945, 2015.
- YAMAMOTO, A.; MIZUKAMI, Y.; SAKURAI, H. Identification of a novel class of target genes and a novel type of binding sequence of heat shock transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 12, p. 11911–11919, 2005.
- YONASHIRO, R., TAHARA et al. The Rqc2 / Tae2 subunit of the ribosome-associated quality control (RQC) complex marks ribosome-stalled nascent polypeptide chains for aggregation. p. 1–16, 2016.
- YUSUPOVA, G. Z. et al. The path of messenger RNA through the ribosome. **Cell**, v. 106, n. 2, p. 233–241, 2001.
- ZARET, K. S. Pioneer transcription factors in cell fate specification. n. May, p. 1–11, 2014.
- ZARET, K. S. At the Revolution with Fred Sherman. *Mol Cell Biol*. 34(6), p. 922–925. 2014.