

ANA PAULA BORGES GREGIO

Estudo do Papel de eIF5A na Síntese Proteica

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista - UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

Orientador: Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini

Co-orientador: Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli

Araraquara-SP
2010

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

G818e Gregio, Ana Paula Borges
Estudo do papel de eIF5A na síntese proteica. / Ana Paula Borges Gregio.
– Araraquara, 2010
98 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia
Orientador: Sandro Roberto Valentini
Co-orientador: Cleslei Fernando Zanelli

1.eIF5A. 2. Hipusina. 3. eEF2. I. Valentini, Sandro Roberto, orient. II. Zanelli, Cleslei Fernando, co-orient.. III. Título.

CAPES: 40300005

Dedico este trabalho aos meus pais, Celeste e Itair, pelo apoio incondicional em todos os momentos; ao meu irmão Guilherme, pela amizade e inspiração e à minha avó Teodora, pelo carinho e sabedoria.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Celeste, pela amizade, carinho, compreensão e por me ensinar que é possível conseguir tudo simplesmente com sorriso e educação.

Ao meu pai Itair, que me preparou para enfrentar as dificuldades da vida com seu "jeito durão", mas que na verdade é uma pessoa bondosa e um amigo daqueles que se pode contar em qualquer momento.

Aos meus pais, que sempre acreditaram que a educação é o melhor investimento e que deixaram seus sonhos e planos pessoais de lado para que eu e meu irmão pudéssemos realizar os nossos.

Ao meu irmão Guilherme com quem eu dividi os doces, os brinquedos, os sonhos e todos os momentos da vida.

À minha avó Teodora, pelo cuidado, carinho e por me mostrar que é possível ser forte e doce ao mesmo tempo. É graças a ela que estou aqui hoje.

Ao meu melhor amigo e namorado Rafael, pelo aprendizado, por compreender minhas ausências e por sempre acreditar nas minhas escolhas.

Ao Sandro, pela oportunidade, confiança e inspiração.

Ao Cleslei, pela amizade, paciência e fundamental participação neste trabalho.

A todas as pessoas que tive oportunidade de conhecer e conviver ao longo desses anos de laboratório: Zé Rodrigo, Su, Lelê, Lu, Veri, Roger, Gaia, Bião, Mari, Vanessa, Alan, Camila, Dani, Dan, Tati, Kdu, Fábio, Juks, Mike, Zé Rainha, Wagner, Malu, Marquinhos, Aline, Laura, Diana, Éric, Paulo, Padoca, Hermano, Fernando, Karina e Flávia.

A todas as auxiliares técnicas que passaram pelo lab, pela ajuda nas tarefas diárias.

À Profa. Dra. Sunnie Thompson, por me receber em seu laboratório nos EUA.

Às minhas roommates Demet e Vanessa pela amizade e apoio durante minha aventura nos EUA.

Aos amigos que sempre compreenderam minha ausência e meus atrasos (afinal, existe um fuso-horário entre o lab e o mundo lá fora): Fá, Prô, Anon, Katchaça, Eline, Lílian, She, Tati, Camila, Curumim, Carol, Maicon, Tadeu, Dai e Testa.

Às "meninas do Henrique": Amanda, Gel, Julia e Paula que trouxeram ânimo e me incentivaram nos momentos finais deste trabalho.

Ao Pedro e à equipe da Interação Idiomas: Andréia, Janaína, Ana Paula, Magda, Bárbara, Lu e Marcelo, pela amizade e ajuda na superação do desafio que o inglês representava.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, à FAPESP, ao CNPq e ao PADC-FCF pelo apoio institucional e financeiro para a realização deste trabalho.

A Deus e à vida.

RECOMEÇAR

Não importa onde você parou
em que momento da vida você cansou
o que importa é que sempre é possível e
necessário recomeçar.

Recomeçar é dar uma nova chance a si mesmo
é renovar as esperanças na vida e o mais importante
acreditar em você de novo.

Sofreu muito nesse período?
Foi aprendizado...

Chorou muito?
Foi limpeza da alma...

Ficou com raiva das pessoas?
Foi para perdoá-las um dia...

Acreditou que tudo estava perdido?
Era o início da tua melhora...

Recomeçar, hoje é um bom dia para começar novos desafios.

Aonde você quer chegar?
Sonhe alto! Queira o melhor do melhor!

Lembre-se, somos apaixonáveis
somos sempre capazes de amar muitas e muitas vezes
afinal de contas, nós somos o Amor.

"Porque eu sou do tamanho do que vejo e não do tamanho da minha altura".

Paulo Roberto Gaefke, com citação de Fernando Pessoa.

RESUMO

O provável fator de início de tradução 5A (eIF5A) é altamente conservado de arqueas a mamíferos e sofre uma modificação pós-traducional única e essencial, em que uma lisina específica é convertida em um resíduo de hipusina. Este fator já foi relacionado a início de tradução, transporte nucleocitoplasmático, decaimento de mRNA e proliferação celular, mas a função crítica de eIF5A na célula ainda não foi totalmente esclarecida. Ainda que o papel de eIF5A na tradução geral tenha sido questionado, dados recentes de nosso laboratório, incluindo os resultados deste trabalho, restabelecem uma função para eIF5A na tradução e evidenciam a sua atuação na etapa de alongação ao invés de início. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi ampliar os estudos do papel de eIF5A na síntese proteica. Para isso, foram realizadas análises de interação genética e de perfil polissomal de linhagens que combinam o alelo mutante de eIF5A, *tif51A-3*, e de fatores envolvidos na etapa de início (eIF4E, eIF3 e eIF5B) ou alongação (eEF2) da tradução. As análises de perfil polissomal utilizando mutantes duplos de eIF5A e de fatores de início de tradução mostram uma diminuição do efeito de perda de polissomos característico de mutantes de início de tradução. Além disso, o perfil polissomal de mutantes de eIF5A é bastante semelhante ao do mutante de alongação. Foi também observado que a depleção de eIF5A provoca uma diminuição significativa na síntese proteica total e um aumento no tempo de trânsito ribossomal, confirmando os resultados obtidos nas análises de perfil polissomal. Também foi avaliada a influência de eIF5A no processo de alongação da tradução utilizando-se repórteres contendo a IRES do vírus CrPV, a qual é independente de todos os fatores de início de tradução conhecidos. Foi observada uma diminuição da atividade da IRES em mutantes de eIF5A e de eEF2, com relação à linhagem selvagem. Além disso, foi dada continuidade à caracterização de outros dois mutantes de eIF5A, *tif51A^{K56A}* e *tif51A^{Q22H/L93F}*, capazes de produzir eIF5A estável na temperatura restritiva. Foi observado que a superexpressão de *EFT2* suprimiu o fenótipo de sensibilidade a temperatura e o defeito no perfil polissomal do mutante *tif51A^{K56A}*, enquanto provocou um efeito deletério no crescimento do mutante *tif51A^{Q22H/L93F}* e levou a uma diminuição das frações polissomais nos ensaios de perfil polissomal. Assim, os resultados aqui apresentados evidenciam que eIF5A é um fator de alongação da tradução e sugerem uma relação funcional com eEF2.

ABSTRACT

The putative eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) is highly conserved from archaea to mammals, essential for cell viability and it is the only cellular protein known to contain the essential amino acid hypusine. eIF5A has also been involved with nucleocytoplasmic transport, mRNA decay and cell proliferation, however its critical function in the cell is not completely understood. Although a role for eIF5A in general translation has been questioned, our recent findings, including those described in this study, showed that eIF5A has a function in protein synthesis and it is related with the elongation step of translation instead of initiation. Therefore, the aim of this study was to investigate the role of eIF5A in protein synthesis. For this purpose, we tested genetic interactions and performed polysomal profile analysis of yeast strains that combine the eIF5A mutant *tif51A-3* with translation initiation (eIF4E, eIF3 and eIF5B) or elongation (eEF2) mutants. The polysome profile analysis of the double mutants of eIF5A and canonical initiation mutants showed a decrease in polysome run-off. In addition, the polysome profile of eIF5A mutant is quite similar to that of the eEF2 mutant. Also, we observed that the depletion of eIF5A causes a significant decrease in total protein synthesis and an increase of the average ribosomal transit time. These results are in agreement with the polysome profile data. The influence of eIF5A in translation elongation was also evaluated using reporters containing the CrPV IRES, which is independent of all factors known to be involved in translation initiation. We observed a decrease in IRES activity in the eIF5A and eEF2 mutants, when compared to the wild type. In addition, two other conditional eIF5A mutants (*tif51A*^{K56A} and *tif51A*^{Q22H/L93F}) which produce stable eIF5A at the restrictive temperature were also analyzed. Interestingly, while the overexpression of *EFT2* improves the cell growth of the *tif51A*^{K56A} mutant, it has a deleterious effect upon growth of the *tif51A*^{Q22H/L93F} mutant. In agreement with the cell growth data, the polysome profile defect of the *tif51A*^{K56A} mutant is partially complemented by overexpression of *EFT2*, whereas polysome profile of the *tif51A*^{Q22H/L93F} mutant is aggravated. Taken together, the data presented herein support a function for eIF5A as an elongation factor and also suggest a functional relationship between eIF5A and eEF2.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema ilustrativo do mecanismo de início de tradução em eucariotos	20
Figura 2	Esquema ilustrativo do mecanismo de início de tradução mediado por IRES virais	21
Figura 3	Esquema ilustrativo do mecanismo de alongação de tradução em eucariotos	22
Figura 4	Esquema ilustrativo do mecanismo de terminação de tradução em eucariotos	23
Figura 5	Análise de interação genética e de perfil polissomal em mutantes simples e duplos dos fatores eIF5A e eIF4E	46
Figura 6	Análise de interação genética e de perfil polissomal em mutantes simples e duplos dos fatores eIF5A e eIF3	47
Figura 7	Análise de interação genética e de perfil polissomal em mutantes simples e duplos dos fatores eIF5A e eIF5B	48
Figura 8	Análise de interação genética e de perfil polissomal em mutantes simples e duplos dos fatores eIF5A e eEF2	49
Figura 9	Efeito da depleção de eIF5A na síntese proteica e no tempo de trânsito ribossomal	52
Figura 10	Análise da associação de eIF5A com componentes da maquinaria de tradução na presença de inibidores da síntese proteica	55
Figura 11	Análise da influência de eIF5A no processo de tradução mediado pela IRES do vírus CrPV, utilizando repórter <i>URA3</i>	60
Figura 12	Avaliação dos níveis de tradução mediada pela IRES do vírus CrPV em mutantes de eIF5A, utilizando repórter de luciferase	61
Figura 13	Caracterização dos dois mutantes de eIF5A que produzem a proteína estável na temperatura não permissiva	66
Figura 14	Análises de interação genética entre <i>TIF51A</i> (eIF5A) e <i>EFT2</i> (eEF2)	67
Figura 15	Análises de morfologia celular dos mutantes <i>tif51A</i> ^{K56A} e <i>tif51A</i> ^{Q22H/L93F}	68

Figura 16 Análise de perfil polissomal dos mutantes estáveis *tif51A*^{K56A} e *tif51A*^{Q22H/L93F} na ausência e na presença de *EFT2* em alto número de cópias 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Principais componentes envolvidos no início da tradução em eucariotos	18
Tabela 2	Leveduras utilizadas nos experimentos deste estudo	30
Tabela 3	Plasmídeos utilizados nos experimentos deste estudo	31

ABREVIACÕES UTILIZADAS

μCi - microCurie

μg - micrograma

μL - microlitro

$^{\circ}\text{C}$ - graus Celcius

cap - capacete de 7-metilguanilato

cm - centímetro

cpm - contagem por minuto

CrPV - Cricket Paralysis Virus

CuSO_4 - sulfato de cobre

DIC - "differential interference contrast" (microscopia de contraste de fase)

DNA - ácido desoxirribonucleico

D.O. - densidade ótica

DTT - ditioneitol

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

eEF1A - fator de alongação da tradução de eucariotos 1A

eEF2 - fator de alongação da tradução de eucariotos 2

eEF3 - fator de alongação da tradução de eucariotos 3

EF-P - fator de alongação da tradução P

eIF5A - fator de início de tradução de eucariotos 5A

eIF2 - fator de início de tradução de eucariotos 2

eIF3 - fator de início de tradução de eucariotos 3

eIF1 - fator de início de tradução de eucariotos 1

eIF1A - fator de início de tradução de eucariotos 1A

eIF4E - fator de início de tradução de eucariotos 4E

eIF4A - fator de início de tradução de eucariotos 4A

eIF4G - fator de início de tradução de eucariotos 4G

eIF4F - fator de início de tradução de eucariotos 4F

eIF4B - fator de início de tradução de eucariotos 4B

eIF5 - fator de início de tradução de eucariotos 5

eIF5B - fator de início de tradução de eucariotos 5B

eIF2B - fator de início de tradução de eucariotos 2B

eIF6 - fator de início de tradução de eucariotos 6
EMCV - "Encephalomyocarditis Virus"
eRF1 - fator de terminação da tradução de eucariotos 1
eRF3 - fator de terminação da tradução de eucariotos 3
Fluc - luciferase de vaga-lume
FSC- "forward light scatter" (espalhamento de luz frontal)
g - grama
GAP - "GTPase-activating protein"
h - hora
 ^3H - trício
HCl - ácido clorídrico
HCV - vírus da hepatite C
IgG - imunoglobulina G
IGR - "intergenic region" (região intergênica)
IRES - Internal Ribosome Entry Site
KAc - acetato de potássio
KCl - cloreto de potássio monobásico
kDa - quilodalton
 KH_2PO_4 - fosfato de potássio monobásico
L - litro
LiAc - acetato de lítio
 $\text{Met-tRNA}_i^{\text{Met}}$ - tRNA iniciador de metionina
 MgCl_2 - cloreto de magnésio
mg - miligrama
min - minuto
mL - mililitro
mM - milimolar
mRNA - RNA mensageiro
N - normal
NaOH - hidróxido de sódio
 Na_2HPO_4 - fosfato de sódio dibásico
ORF - "open reading frame"
PABP - "poly-A binding protein"

PBS - “phosphate buffered saline” (solução salina tamponada com fosfato)

PBST - PBS contendo 0,05% de Tween 20

PEG - polietilenoglicol

pH - potencial hidrogeniônico

PMSF - fluoreto de fenilmetilsulfonila

PMS - “post-mitochondrial supernatant”(sobrenadante pós-mitochondrial)

PRS - “post-ribosomal supernatant”(sobrenadante pós-ribossomal)

Rluc - luciferase de *Renilla*

RNA - ácido ribonucleico

RPM - rotação por minuto

SC – “synthetic complete” (meio sintético completo para levedura)

SDS-PAGE - eletroforese em gel de poli(acrilamida) na presença de SDS

SDS - dodecil sulfato de sódio

SSC - “side light scatter” (espalhamento de luz lateral)

S-SPO - “super-sporulation medium” (meio para esporulação de levedura)

TCA - ácido tricloroacético

TE - solução tampão contendo tris, 10 mM, e EDTA, 1 mM

Tris - tris-hidroximetilaminometano

tRNA - RNA transportador

5'-UTR - região 5'-não traduzida

UV - ultravioleta

YPD - “yeast extract, peptone, dextrose” (meio rico para levedura contendo extrato de levedura, peptona e glicose)

xg ou rcf - “relative centrifugation force” (aceleração gravitacional)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Síntese proteica em eucariotos.....	15
1.2. eIF5A.....	24
2. OBJETIVO GERAL	29
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1. Materiais	30
4.2. Métodos	33
4.2.1. Cruzamento e esporulação de leveduras.....	33
4.2.2. Dissecção e caracterização de tétrades.....	33
4.2.3. Teste de fenótipos de crescimento.....	34
4.2.4. Perfil polissomal de levedura.....	34
4.2.5. Transformação de leveduras.....	35
4.2.6. Ensaio de síntese proteica.....	36
4.2.7. Western blot.....	36
4.2.8. Tempo de trânsito ribossomal.....	37
4.2.9. Ensaio de copurificação de proteína.....	38
4.2.10. Ensaio de luminescência.....	39
4.2.11. Microscopia por contraste diferencial de fase (DIC).....	40
4.2.12. Análise de morfologia celular por citometria de fluxo.....	40
5. RESULTADOS	41
5.1. Avaliação do impacto no perfil polissomal de mutantes duplos de eIF5A com mutantes de fatores de alongação ou de início de tradução de eucariotos	41
5.2. Análise dos níveis de síntese proteica em mutantes de eIF5A	50
5.3. Análise do tempo de trânsito ribossomal em mutantes de eIF5A	50
5.4. Associação de eIF5A com ribossomos ativos na presença de inibidores de síntese proteica	53
5.5. Avaliação do efeito de eIF5A mutada na mediada por IRES de CrPV	56

5.6. Estudos de interação genética entre eIF5A e eEF2, utilizando os mutantes <i>tif51A</i>^{K56A} e <i>tif51A</i>^{Q22H/L93F}	62
6. DISCUSSÃO.....	70
7. CONCLUSÕES.....	79
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
ANEXO.....	89

Capítulo 1

1. INTRODUÇÃO

1.1. Síntese proteica em eucariotos

A expressão gênica é um processo altamente regulado em diversas etapas, sendo uma delas a síntese proteica. A tradução do mRNA em proteínas é uma atividade celular de alto gasto energético e que permite alterações rápidas nas concentrações de proteínas, sendo importante para a manutenção da homeostase e modulação de alterações na fisiologia celular. A tradução, assim como outros processos básicos da expressão gênica, é extremamente conservada ao longo da evolução e pode ser dividida em três etapas principais: início, alongação e terminação.

O início da tradução é o processo que forma ribossomos competentes e requer, em eucariotos, pelo menos nove fatores chamados de fatores de início de tradução de eucariotos (eIFs – ekaryotic translation initiation factors). Os principais componentes envolvidos no início da tradução estão apresentados na Tabela 1. O início da tradução, ilustrado na Figura 1, pode ser descrito como uma sequência de eventos envolvendo a formação do complexo ternário, composto pelo fator eIF2 ligado a uma molécula de GTP e Met-tRNA_i^{Met}. Uma vez formado, o complexo ternário se liga à subunidade ribossomal 40S, mediado pelos fatores eIF1, eIF1A e eIF3, originando o complexo de pré-iniciação 43S. Em seguida, o complexo 43S se liga ao “cap” através da interação com o complexo ligante do capacete (“cap binding complex”), composto pelos fatores eIF4B e eIF4F (fator heterotrimérico de eIF4A, eIF4E e eIF4G), originando o complexo 48S. eIF4A, juntamente com o fator eIF4B, desfaz as estruturas secundárias presentes na região 5'-não traduzida (5'-UTR) do mRNA. Uma vez ligado ao “cap”, o complexo 43S se move ao longo da região 5'-não traduzida (5'-UTR) do mRNA até o reconhecimento do códon iniciador, auxiliado por eIF1 e eIF1A. Neste momento, ocorre uma mudança conformacional no complexo iniciador levando à hidrólise da molécula de GTP ligada a eIF2, estimulada pela “GAP” (GTPase-activating protein) eIF5. Em seguida, os fatores eIF1, eIF2, eIF3 e eIF5 se dissociam do 40S e o fator eIF5B-GTP se liga. A ligação das subunidades 40S e 60S é estimulada por eIF5B, que hidrolisa uma segunda molécula de GTP, promovendo a ligação das subunidades ribossomais, formando um complexo 80S competente para a tradução. Por fim, ocorre a liberação de

eIF5B-GDP e eIF1A do 80S, completando assim a etapa inicial da tradução (Acker e Lorsch, 2008; Jackson e cols., 2010).

Apesar de a maioria dos mRNAs ter o início da tradução mediada pelo “cap”, alguns transcritos são traduzidos de maneira independente de “cap”, através dos elementos IRES (“Internal Ribosome Entry Sites”). IRES são sequências presentes na região 5'-não traduzida (5'-UTR) de alguns mRNAs e foram inicialmente identificadas em vírus (Pelletier e Sonenberg, 1988). No entanto, foram também descobertas IRES em transcritos de genes endógenos em diferentes organismos (Jackson, 2005). O recrutamento do ribossomo pelas IRES envolve a interação de vários sítios não-contínuos presentes na porção 5'-UTR do mRNA e varia de acordo com a sequência de nucleotídeos que compõe a IRES, como ilustra a Figura 2. Por exemplo, a IRES do vírus EMCV (Encephalomyocarditis Virus) necessita dos fatores de início de tradução eIF4G, eIF4A, eIF3 e eIF2, além de Met-tRNA_i, GTP e da subunidade 40S (Chen e Sarnow, 1995). A IRES do vírus da hepatite C (HCV) necessita apenas dos fatores de início de tradução eIF3 e eIF2, além de Met-tRNA_i, GTP e da subunidade 40S (Otto e Puglisi, 2004). Curiosamente, análises *in vitro* mostraram que a IRES do vírus CrPV (“Cricket Paralysis Virus”) é capaz de recrutar diretamente as subunidades ribossomais e os fatores de alongação, sem necessidade de nenhum fator de início de tradução (Jan e Sarnow, 2002). Essa capacidade foi também observada, recentemente, em ensaios *in vivo* (Deniz e cols., 2009). A relação dos supostos mRNAs endógenos que contêm IRES está crescendo apesar dos questionamentos rigorosos da comunidade científica. As IRES de mRNAs endógenos apresentam pouca relação estrutural entre si e seus mecanismos de estímulo do início da tradução não foram elucidados até o momento (Baranick e cols., 2008; Jackson e cols., 2010).

A etapa de alongação da tradução, ilustrada na Figura 3, tem início com o pareamento do anticódon presente no aminoacil-tRNA e do códon correspondente do mRNA, no sítio A (aminoacil) do ribossomo. Em eucariotos, este posicionamento é mediado pelo fator de alongação eEF1A. O correto pareamento códon-anticódon, leva à hidrólise de uma molécula de GTP ligada à eEF1A e à liberação deste fator. O centro peptidil-transferase da subunidade 60S é então ativado, catalisando a formação de uma ligação peptídica entre o aminoácido ligado ao tRNA posicionado no sítio A (aminoacil) e a cadeia polipeptídica nascente, posicionada no sítio P (peptidil). Logo após a formação da ligação peptídica, ocorre a translocação, etapa responsável pela

movimentação dos dois tRNAs e do mRNA através do complexo ribossomal, mantendo-se a janela de leitura. Mais detalhadamente, durante a formação da nova ligação peptídica, a cadeia polipeptídica nascente é transferida do tRNA posicionado no sítio A para o tRNA no sítio P, provocando alterações na conformação do ribossomo. Neste momento, os tRNAs nos sítios A e P passam para um estado “híbrido” em que seus anti-códons continuam pareados com os códons presentes nos sítios A e P, mas suas extremidades aceptoras se posicionam nos sítios P e E (“exit” - saída), respectivamente, assumindo configurações A/P e P/E. Ocorre, então, a ligação de eEF2-GTP. A molécula de GTP ligada ao eEF2 é hidrolisada, induzindo novas alterações conformacionais do ribossomo, que são seguidas pelo movimento dos tRNAs da configuração A/P para P/P e P/E para E/E, liberando o tRNA desacilado e deixando livre o sítio A (A/A), posicionado agora no códon seguinte do mRNA. Este ciclo se repete até que um códon de terminação seja posicionado no sítio A (Merrick, 1992). A maquinaria envolvida na etapa de alongação da tradução dos fungos difere dos demais eucariotos pela presença do fator eEF3. Apesar de essencial, a função deste fator não está completamente estabelecida. eEF3 possui atividades ATPásica e GTPásica e já foi envolvido com estímulo da interação de eEF1A + aminoacil-tRNA ao ribossomo (Kamath e Chakraborty, 1989), com a remoção do tRNA desacilado do sítio ribossomal E (Anand e cols., 2003) e, mais recentemente, com reciclagem das subunidades ribossomais (Kurata e cols., 2010).

O término da tradução (Figura 4) ocorre quando um códon terminador é translocado para o sítio ribossomal A, sinalizando para a liberação da cadeia polipeptídica do peptidil-tRNA localizado no sítio P. Esse processo é mediado pelos fatores de terminação da tradução eRF1 e eRF3. O fator eRF1 reconhece os códons de terminação e promove a liberação da cadeia polipeptídica através da interação com o centro peptidil-transferase da subunidade 60S. eRF3, por sua vez, interage com eRF1 e tem sua função relacionada à reciclagem deste fator. Além disso, dados indicam que a atividade GTPase de eRF3 está associada à função de eRF1, garantindo o reconhecimento dos códons de terminação e a eficiente liberação da cadeia polipeptídica (Kapp e Lorsch, 2004; Salas-Marco e Bedwell, 2004). Por fim, as subunidades ribossomais são recicladas para que possam ser utilizadas em um novo ciclo de tradução (Kapp e Lorsch, 2004).

Tabela 1. Principais componentes envolvidos no início da tradução em eucariotos.

Principais fatores de início de tradução

Nome	Função
eIF2	Envolvido na formação do complexo ternário eIF2-GTP-Met-tRNA _i ^{Met} , que se liga à subunidade ribossomal 40S, mediando o recrutamento do Met-tRNA _i ^{Met}
eIF3	Interage com a subunidade ribossomal 40S, eIF1, eIF4G e eIF5; promove a ligação do complexo ternário a 40S e a subsequente interação com o mRNA via eIF4G; atua na dissociação e na anti-associação das subunidades ribossomais, prevenindo a interação das subunidades 40S e 60S
eIF1	Envolvido com a fidelidade na seleção do códon iniciador, estimula a ligação do complexo ternário à subunidade 40S e o “scanning” ribossomal; previne a hidrólise prematura da molécula de GTP ligada à eIF2 por eIF5
eIF1A	Envolvido com a ligação do complexo ternário à subunidade 40S e, juntamente com eIF1, promove o “scanning” ribossomal e o reconhecimento do códon iniciador
eIF4E	Liga-se ao “cap” do mRNA
eIF4A	Helicase dependente de ATP
eIF4G	Interage com os fatores eIF4E, eIF4A, eIF3, PABP, e com o mRNA, aumentando a atividade helicase de eIF4A
eIF4F	Complexo ligante de “cap” (“cap binding complex”) composto pelos fatores eIF4E, eIF4A e eIF4G; envolvido na associação do complexo 43S com o mRNA e no “scanning” ribossomal
eIF4B	Proteína ligante de RNA que estimula a atividade helicase de eIF4A
eIF5	Atua como “GAP” (GTPase-activating protein) de eIF2, quando ocorre o reconhecimento do códon iniciador
eIF5B	GTPase estimuladora da ligação da subunidade 60S a 40S
eIF2B	“GEF” (Guanosine nucleotide Exchange Factor) que promove a troca de GDP por GTP em eIF2

Fatores auxiliares

Nome	Função
eIF6	Fator ligante da subunidade ribossomal 60S; previne a associação das subunidades 40S e 60S.
PABP	Liga-se à cauda poli A do mRNA; interage com eIF4G e promove a circularização do mRNA

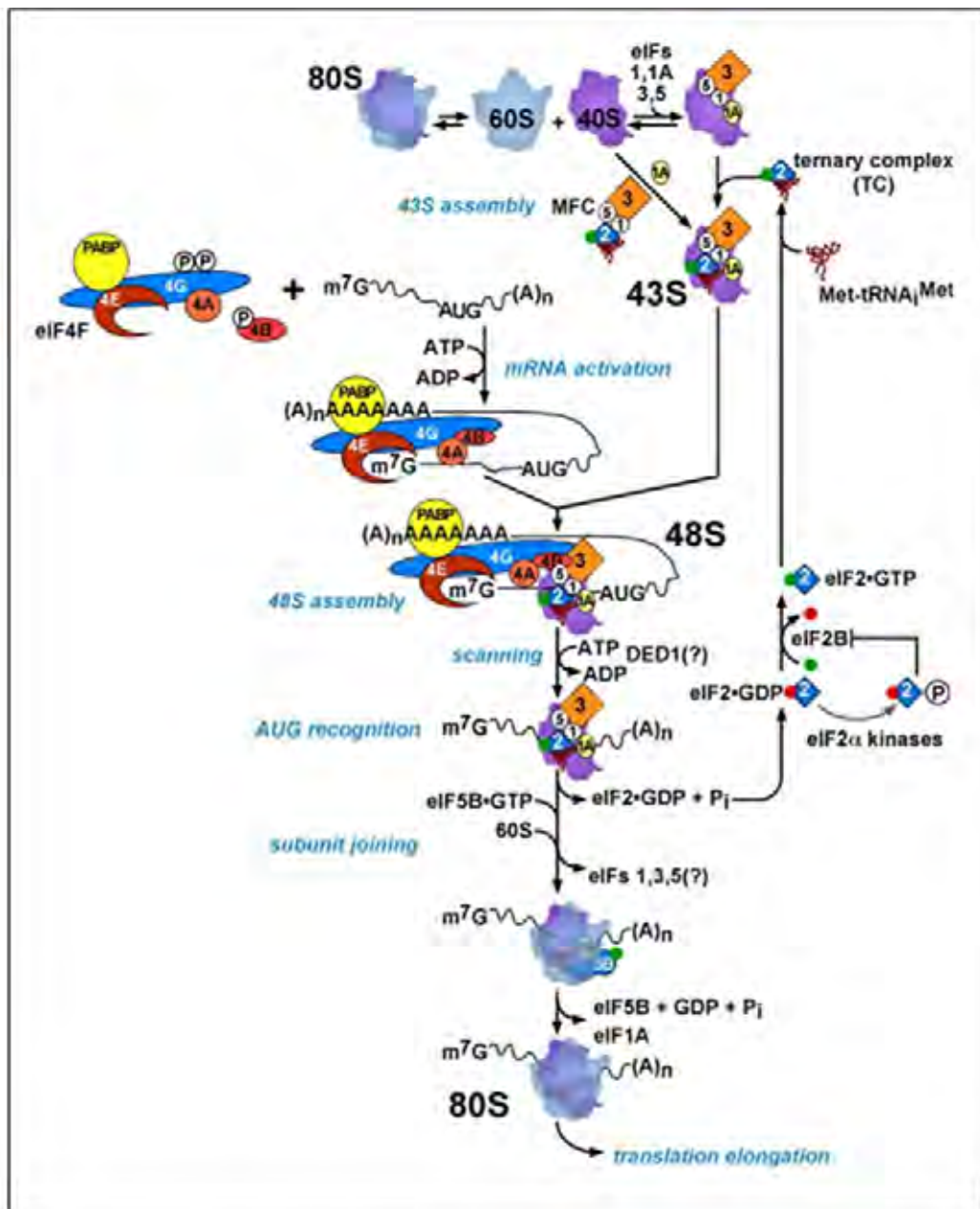


Figura 1. Esquema ilustrativo do mecanismo de início da tradução em eucariotos. Estão representados apenas os números ou números e letras que dão nome aos fatores de início de tradução de eucariotos após a sigla "eIF" (modificado de Sonenberg e Hinnebusch, 2007).

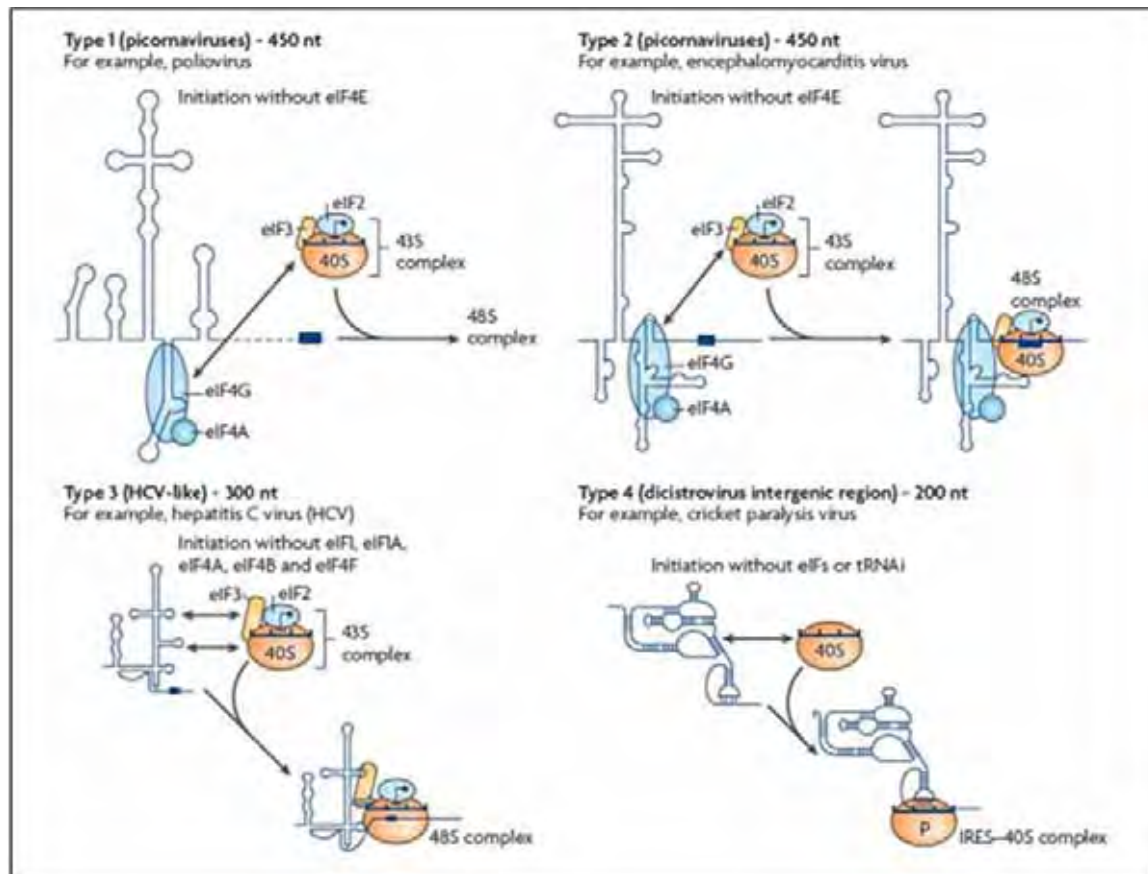


Figura 2. Esquema ilustrativo do mecanismo de início da tradução mediado por IRES virais. Representação das estruturas secundárias das IRES de diferentes classes de vírus e os elementos envolvidos no início da tradução independente de "cap" (Jackson e cols., 2010).

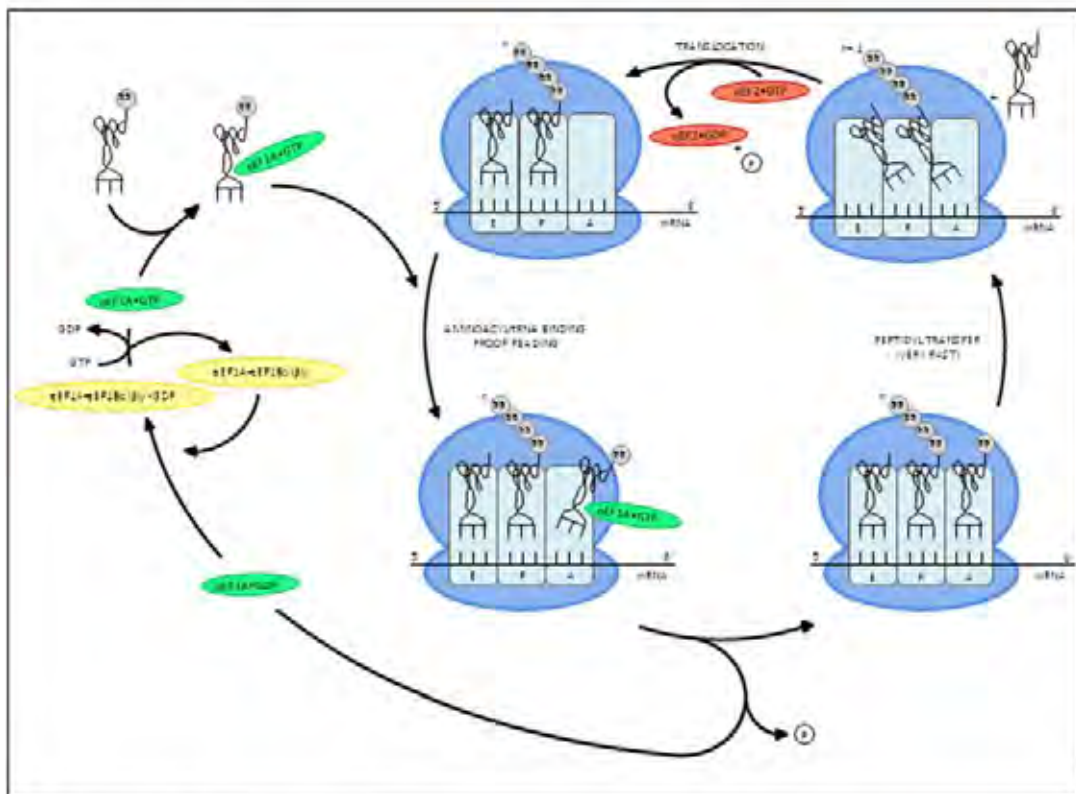


Figura 3. Esquema ilustrativo do mecanismo de elongação tradução em eucariotos (modificado de Merrick, 1992).

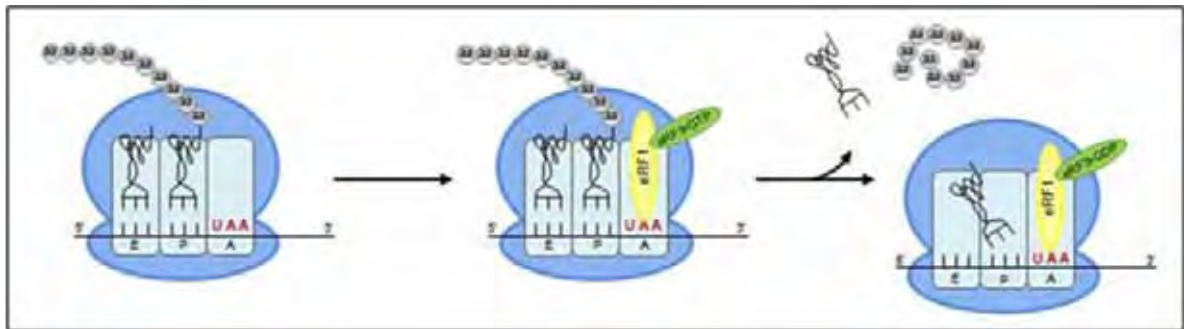


Figura 4. Esquema ilustrativo do mecanismo de terminação da tradução em eucariotos.

1.2. eIF5A

Muitos dos fatores que atuam nas diferentes etapas da tradução são conservados ao longo da evolução. Dentre eles destaca-se o provável fator de início de tradução de eucariotos 5A (eIF5A – *eukaryotic translation initiation factor 5A*), que é altamente conservado em arqueas e eucariotos e possui um homólogo estrutural em bactérias, EF-P. Assim, o entendimento da função desse tipo de fatores conservados deve contribuir de maneira importante para uma maior compreensão do processo de tradução na célula.

eIF5A foi originalmente purificado a partir de ribossomos de lisados de reticulócitos de coelho (Benne e Hershey, 1978) e foi considerado um fator de início de tradução devido à capacidade de estimular a síntese de metionil-puromicina *in vitro* (Benne e cols., 1978). O ensaio de metionil-puromicina mede a incorporação de metionina radioativa, a partir de Met-tRNA_i, à puromicina, através de catálise ribossomal, sendo, portanto, um ensaio bastante utilizado para avaliar a influência de diferentes fatores no início da tradução.

Apesar da capacidade evidente de eIF5A estimular a síntese de metionil-puromicina *in vitro* utilizando-se tripletes AUG ou mRNA de globina, a não adição de eIF5A não mostrou nenhum impacto sobre a síntese de globina *in vitro*, discordando, assim, de resultados obtidos na ausência dos outros fatores de início de tradução eIF1, eIF1A, eIF3, eIF5B e eIF5, também testados (Benne e cols., 1978). Além disso, eIF5A não pareceu influenciar a formação *in vitro* de complexo ternário ou a ligação do mRNA de globina ou do Met-tRNA_i à subunidade 40S (Benne e cols., 1978).

A possibilidade de eIF5A atuar na elongação da tradução também foi considerada, porém nenhum efeito positivo foi observado com a adição de eIF5A em um sistema de síntese proteica para polimerização de poli-fenilalanina a partir de ácido poli-uridílico, ribossomos 80S e fatores de elongação eEF1 e eEF2 purificados (Benne e cols., 1978).

Apesar dos estudos iniciais sugerirem o envolvimento de eIF5A com o início da tradução, foi observada que a depleção desse fator em *S. cerevisiae* leva a uma pequena diminuição (30%) da taxa de síntese proteica (Duncan e Hershey, 1986; Kang

e Hershey, 1994; Zuk e Jacobson, 1998). Assim, estes dados levaram à conclusão de que eIF5A não seja um fator essencial na síntese proteica de forma geral.

Alternativamente, foi proposto que eIF5A seja um fator envolvido na tradução de um grupo específico de mensageiros, por exemplo, daqueles envolvidos na transição G1/S do ciclo celular (Kang e Hershey, 1994; Park e cols., 1997). Esta hipótese foi levantada devido à observação de que a inibição das duas enzimas envolvidas na modificação pós-traducional de eIF5A bloqueia a proliferação celular de diferentes linhagens de células de mamíferos (Hanauske-Abel e cols., 1994; Chen e cols., 1996; Shi e cols., 1996). Assim, apesar de eIF5A ter sido denominado inicialmente um fator de início de tradução, a sua função como tal não foi claramente demonstrada. Outras observações também evidenciam o envolvimento de eIF5A com proliferação celular. Por exemplo, a expressão de eIF5A é induzida em linfócitos T ativados (Bevec e cols., 1994). Além disso, experimentos utilizando *D. melanogaster* mostraram uma perda do controle no ciclo celular no início do desenvolvimento deste inseto em consequência da diminuição dos níveis de eIF5A (Lee e cols., 2001).

Além ser relacionado com início da tradução e ciclo celular, o fator eIF5A foi ainda envolvido com o decaimento de mRNA. Foi mostrado que mutantes condicionais de *S. cerevisiae* exibem defeito na degradação de mRNAs na temperatura não permissiva (Zuk e Jacobson, 1998; Valentini e cols., 2002). Entretanto, os resultados de decaimento de mRNA obtidos para os mutantes de nosso laboratório sugerem que esse possível papel de eIF5A seja secundário, pois o fenótipo de inibição do crescimento não se correlaciona com o defeito na degradação de mRNAs (Valentini e cols., 2002). Além disso, dados obtidos posteriormente em nosso laboratório, sugerem que a função de eIF5A esteja relacionada com a etapa de alongação da tradução (Zanelli e cols., 2006), o que justificaria um efeito indireto na degradação de mRNAs, uma vez que a parada do processo de alongação leva ao bloqueio da degradação de mRNAs (Beelman e Parker, 1994).

eIF5A foi também relacionado com transporte nucleocitoplasmático, atuando como um cofator celular da proteína Rev de HIV-1, envolvido na exportação dos mensageiros tardios deste vírus (Ruhl e cols., 1993; Bevec e cols., 1996; Bevec e Hauber, 1997; Elfgang e cols., 1999; Rosorius e cols., 1999), apesar de outros estudos não evidenciarem o envolvimento de eIF5A com transporte nucleocitoplasmático (Shi e cols., 1997; Henderson e Percipale, 1997; Valentini e cols., 2002; Jao e Chen, 2002).

A levedura *S. cerevisiae* é um importante organismo modelo para o estudo de genes conservados em eucariotos e foi o organismo utilizado em nosso laboratório para as análises descritas neste trabalho. Esta levedura possui no seu genoma dois genes que codificam para eIF5A, *TIF51A* (*HYP2*) e *TIF51B* (*ANB1*), os quais são regulados transcricionalmente pelos níveis de oxigênio, sendo expressos, respectivamente, em condições aeróbicas e anaeróbicas. Apesar dos dados sugerirem que os produtos dos genes *TIF51A* e *TIF51B* possam ser requeridos para a expressão específica de genes aeróbicos ou anaeróbicos, respectivamente, o significado funcional da regulação recíproca dos genes codificadores de eIF5A em levedura é obscuro. Ainda, foi observado que *TIF51A* pode ser substituído por *TIF51B* em condições aeróbicas e vice-versa, indicando que os produtos destes dois genes possuem a mesma função em levedura (Wohl e cols., 1993; Schwelberger e cols., 1993). Uma vez que *TIF51A* é essencial para o crescimento em condições aeróbicas (Schnier e cols., 1991; Wohl e cols., 1993; Valentini e cols., 2002) e que a deleção de *TIF51B* não influencia as taxas de crescimento de células haplóides em aerobiose (Wohl e cols., 1993), diversos mutantes condicionais de *S. cerevisiae* para o gene *TIF51A* foram descritos e caracterizados em nosso laboratório (Valentini e cols., 2002; Dias e cols., 2008).

eIF5A possui 17 kDa em levedura e sofre uma modificação pós-traducional única na célula, que corresponde à hipusinação de um resíduo de lisina (Chen e Liu, 1997; Park e cols., 1997). A formação do aminoácido hipusina (do inglês “hypusine: hydroxyputrescine-lysine”) ocorre através da transferência, pela desoxi-hipusina sintase (Dys1 em levedura, DHS em mamífero), de um grupo aminobutil da espermidina para o amino grupo livre de uma lisina específica, seguido de hidroxilação deste grupo pela desoxi-hipusina hidroxilase (Lia1 em levedura, DOHH em mamífero). O grau de conservação dos resíduos flanqueadores do sítio de hipusinação, nas diferentes espécies, revela a grande importância deste aminoácido raro (Chen e Liu, 1997; Magdolen e cols., 1994). Mutação neste resíduo (K51R em *S. cerevisiae*) leva à produção de eIF5A não hipusinado, que não permite o crescimento de células onde *TIF51A* foi nocauteado (Schnier e cols., 1991). Adicionalmente, o gene codificador da enzima desoxi-hipusina sintase é essencial para o crescimento de *S. cerevisiae* e também é altamente conservado desde arqueas a eucariotos (Park e cols., 1997; Sasaki e cols., 1996). Curiosamente, apesar de o gene codificador da enzima desoxi-

hipusina hidroxilase ser essencial em eucariotos superiores, este gene não é essencial em *S. cerevisiae*, sugerindo que a hidroxilação do resíduo de hipusina não afeta a função de eIF5A em levedura (Park e cols., 2009).

As estruturas tridimensionais de homólogos de eIF5A de arqueas, protozoários e, recentemente, de humanos e de levedura foram determinadas e revelaram várias características comuns (Kim e cols., 1998; Peat e cols., 1998; Yao e cols., 2003; Tong e cols., 2009; PDB 3CPF; PDB 3ERO). Segundo esses estudos, eIF5A se trata de uma proteína dividida em dois domínios predominantemente compostos por folhas beta. A comparação destes domínios com outras proteínas de estruturas tridimensionais conhecidas mostra que o domínio N-terminal, o qual contém a hipusina, possui um dobramento classificado como “Translation Protein SH3-like motif”, o qual também está presente em várias proteínas ribossomais (<http://supfam.org/SUPERFAMILY>; Gough e cols., 2001). O domínio C-terminal, por sua vez, é similar a dobramentos de proteínas que se ligam a ácidos nucleicos de fita simples (“Single-stranded Oligonucleotide Binding Fold”), o qual está presente em proteínas de diferentes funções celulares que se ligam a RNA ou DNA fita simples (<http://supfam.org/SUPERFAMILY>; Gough e cols., 2001). Alguns estudos propõem que eIF5A possui atividade de ligação a RNA (Xu e Chen, 2001; Xu e cols., 2004), mas o papel funcional e a relevância biológica dessa capacidade de ligar RNA não estão estabelecidos.

Apesar de não existir proteína homóloga de eIF5A em bactérias, o fator de alongação da tradução de bactérias EF-P é um homólogo estrutural de eIF5A, como mencionado anteriormente, sendo que a estrutura de eIF5A de arquea é superponível aos dois primeiros domínios de EF-P (Hanawa-Seutsugu e cols., 2004). EF-P é essencial para a viabilidade celular e possui efeito estimulatório na formação de ligações peptídicas tendo sido considerado, portanto, um fator de alongação da tradução (Glick e Ganoza, 1975). Assim como eIF5A, EF-P é capaz de estimular a síntese de metionil-puromicina *in vitro* e tem sua função alterada por inibidores da atividade peptidil-transferase do ribossomo (Ganoza e cols., 2002). Entretanto, dados recentes mostram que EF-P está envolvido no correto posicionamento do tRNA iniciador, atuando apenas na formação da primeira ligação peptídica (Blaha e cols., 2009). Curiosamente, foi observado que EF-P de um sub-grupo de bactérias sofre uma modificação pós-traducional em um resíduo específico de lisina na posição 34, correspondente ao sítio de hipusinação de eIF5A. Esta modificação, denominada

lisilação, é análoga à hipusinação e envolve a incorporação do radical lisil de uma lisina ao grupamento amino da lisina 34 de EF-P pelas enzimas YjeA e YjeK (Navarre e cols., 2010; Yanagisawa e cols., 2010; Bailly e Crécy-Lagard, 2010).

Embora a função de eIF5A como fator de início de tradução não tenha sido claramente demonstrada, estudos realizados por nosso laboratório e por outros, revelaram a associação de eIF5A com ribossomos traducionalmente ativos e trouxeram este fator de volta ao cenário da tradução (Jao e Chen, 2006; Zanelli e cols., 2006). Ensaios de copurificação seguidos de espectrometria de massas revelaram que eIF5A interage com as proteínas ribossomais P0, S5 e L11 e com o fator de alongação de tradução 2 (eEF2), componentes da maquinaria de tradução. Ainda, foi mostrado que eIF5A interage especificamente com monossomos funcionalmente ativos, e que mutantes condicionais de eIF5A apresentam defeito no perfil polissomal e são sensíveis a inibidores da tradução (Zanelli e cols., 2006). Além disso, a análise de diferentes mutantes condicionais de eIF5A demonstrou uma diminuição na síntese proteica total nas condições não-permissivas de crescimento (Cano e cols., 2008; Dias e cols., 2008). O envolvimento de eIF5A com a etapa de alongação da tradução ao invés de início, como proposto na caracterização inicial deste fator, foi o enfoque deste trabalho de doutorado, na tentativa de contribuir para o esclarecimento do papel de eIF5A na síntese proteica.

2. OBJETIVO GERAL

Analisar o papel de eIF5A no mecanismo de síntese proteica, mais especificamente, na etapa de alongação da tradução.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.1. Avaliar o impacto no perfil polissomal de mutantes duplos de eIF5A com mutantes de fatores de alongação ou de início de tradução de eucariotos.
- 3.2. Analisar os níveis de síntese proteica em mutantes de eIF5A.
- 3.3. Analisar o tempo de trânsito ribossomal em mutantes de eIF5A.
- 3.4. Avaliar a associação de eIF5A com ribossomos ativos na presença de inibidores de síntese proteica.
- 3.5. Avaliar se eIF5A mutada altera a tradução mediada por IRES de CrPV.
- 3.6. Ampliar os estudos de interação genética entre eIF5A e eEF2, utilizando os mutantes *tif51A*^{K56A} e *tif51A*^{Q22H/L93F}.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

As linhagens e plasmídeos utilizados estão descritos, respectivamente, nas Tabelas 2 e 3. A manutenção e cultivo das linhagens de *S. cerevisiae* e *E. coli*, bem como o preparo dos meios de cultura e soluções seguiram procedimentos padrão (Guthrie e Fink 1991; Ausubel e cols., 2004).

Tabela 2. Leveduras utilizadas nos experimentos deste estudo.

Levedura	Genótipo	Origem
SVL14	<i>MAT_a ade2 his3 leu2 trp1 ura3 can1 tif51A-1</i>	Coleção do laboratório
SVL32	<i>MAT_a ade2 his3 leu2 trp1 ura3 can1 tif51A-3</i>	Coleção do laboratório
W303 (SVL82)	<i>MAT_a ade2 his3 leu2 trp1 ura3</i>	Coleção do laboratório
SVL102	<i>MAT_α ade2 his3 leu2 trp1 ura3 tif51A-3</i>	Coleção do laboratório
SVL105	<i>MAT_a leu2 trp1 ura3 [pYGEX]</i>	Coleção do laboratório
SVL106	<i>MAT_a leu2 trp1 ura3 [pYGEX-TIF51A]</i>	Coleção do laboratório
SVL347	<i>MAT_a ade2 his3 trp1 ura3 cdc33::LEU2 [cdc33-42/TRP1/CEN]</i>	Altmann e Trachsel, 1989
SVL447	<i>MAT_α ade2 his3 leu2 trp1 ura3 tif51A-3::URA3 ssd1::LEU2</i>	Coleção do laboratório
SVL700	<i>MAT_α ade2 his3 leu2 trp1 ura3 cca1-1</i>	Peltz e cols., 1992
SVL731	<i>MAT_a ade2 his3 leu2 trp1 ura3 ProtA-7xHis-TIF51A</i>	Coleção do laboratório
VZL821	<i>MAT_α leu2 ura3 trp1 his3 tif51A::HIS3 tif51B::KanMX4 [pVZ708]</i>	Coleção do laboratório
VZL822	<i>MAT_α leu2 ura3 trp1 his3 tif51A::HIS3 tif51B::KanMX4 [pVZ734]</i>	Coleção do laboratório
VZL829	<i>MAT_a ade1 leu2 ura3 prt1-1</i>	Nielsen e cols., 2004
VZL837	<i>MAT_α leu2 ura3 trp1 his3 tif51A::HIS3 tif51B::KanMX4 [pSV146]</i>	Coleção do laboratório

VZL839	<i>MAT_a ade3 his3 leu2 ura3 fun12::kanMX4</i>	Sunnie Thompson
VZL844	<i>MAT_α ade2 leu2 trp1 ura3</i>	Este trabalho
VZL845	<i>MAT_α ade2 leu2 trp1 ura3 tif51A-3 prt1-1</i>	Este trabalho
VZL846	<i>MAT_a ade2 his3 leu2 ura3</i>	Este trabalho
VZL847	<i>MAT_a ade2 his3 ura3 tif51A-3::URA3 cdc33::LEU2 [cdc33-42/TRP1/CEN]</i>	Este trabalho
VZL850	<i>MAT_a his3 leu2 trp1 ura3 fun12::kanMX4 tif51A-3</i>	Este trabalho
VZL851	<i>MAT_α ade2 his3 leu2 ura3 fun12::kanMX4</i>	Este trabalho
VZL852	<i>MAT_a ade2 his3 leu2 trp1 ura3 can1 tif51A-3 [LEU2/CEN]</i>	Este trabalho
VZL854	<i>MAT_a ade2 his3 leu2 trp1 ura3 can1 tif51A-3 [eft2^{H699K}/LEU2/CEN]</i>	Este trabalho
VZL855	<i>MAT_a ade2 his3 leu2 trp1 ura3 can1 [LEU2/CEN]</i>	Este trabalho
VZL857	<i>MAT_a ade2 his3 leu2 trp1 ura3 [eft2^{H699K}/LEU2/CEN]</i>	Este trabalho
VZL865	<i>MAT_a ade2 his3 leu2 ura3</i>	Este trabalho
VZL866	<i>MAT_α leu2 his3 trp1 ura3 tif51A-3</i>	Este trabalho
VZL957	<i>MAT_a ade2 his3 leu2 trp1 ura3 can1 tif51A-1 [LEU2/CEN]</i>	Este trabalho
VZL958	<i>MAT_a ade3 his3 leu2 ura3 fun12::kanMX4 [LEU2/CEN]</i>	Este trabalho
VZL987	<i>MAT_α leu2 ura3 trp1 his3 tif51A::HIS3 tif51B::KanMX4 [pSV1040]</i>	Coleção do laboratório

Tabela 3. Plasmídeos utilizados nos experimentos deste estudo.

Plasmídeo	Descrição	Origem
pYGEX (pSV20)	Vetor de expressão de proteína de fusão com GST em levedura: <i>URA3/2μ</i>	Pamela Silver
pRS314 (pSV58)	<i>TRP1/CEN</i>	Pamela Silver
pRS315 (pSV59)	<i>LEU2/CEN</i>	Pamela Silver

pRS425 (pSV64)	<i>LEU2/2μ</i>	Pamela Silver
pRS426 (pSV65)	<i>URA3/2μ</i>	Pamela Silver
pSal1 (pVZ1034)	<i>LEU2/2μ</i>	Sunnie Thompson
pSV36	<i>TIF51A</i> clonado em pYGEX	Coleção do laboratório
pSV146	<i>TIF51A</i> clonado em pRS315	Coleção do laboratório
pSV181	<i>PKC1</i> clonado em pRS426	Coleção do laboratório
pSV262	<i>EFT2</i> clonado em pRS426	Coleção do laboratório
pSV500	vetor pRS314 sem o sítio de restrição <i>SalI</i>	Coleção do laboratório
pVZ708	<i>tif51A</i> ^{Q22H/L93F} clonado em pSV500	Coleção do laboratório
pVZ734	<i>tif51A</i> ^{K56A} clonado em pSV500	Coleção do laboratório
pVZ853	<i>HA- eft2</i> ^{H699K} / <i>LEU2/2μ</i>	Ortiz e Kinzy, 2005
pVZ1035	<i>LEU2-CrPV-IRES-ΔAUG-URA3</i>	Sunnie Thompson
pVZ1036	<i>LEU2-CrPV-IRESmut-ΔAUG-URA3</i>	Sunnie Thompson
pVZ1037	<i>Rluc-CrPV-IRES-ΔAUG-Fluc</i>	Sunnie Thompson
pVZ1038	<i>Rluc-CrPV-IRESmut-ΔAUG-Fluc</i>	Sunnie Thompson
pVZ1040	<i>tif51A</i> ^{K56A} clonado em pSV500	Coleção do laboratório
pVZ1104	<i>eft2</i> ^{H699K} clonado em pRS315	Coleção do laboratório

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Cruzamento e esporulação de leveduras

4.2.1.1. Cruzamento

As cepas haplóides de *S. cerevisiae* desejadas foram cruzadas na superfície de ágar YPD (extrato de levedura 10 g/L, peptona 20 g/L e ágar 20 g/L) e incubadas por uma noite a 25°C. A seleção dos diplóides foi realizada pela transferência, com veludo estéril, do crescimento obtido na placa de YPD para a placa de meio duplo seletivo, de acordo com as marcas auxotróficas do diplóide. As placas foram incubadas a 25°C. Após o crescimento, os diplóides foram isolados em meio duplo seletivo.

4.2.1.2. Esporulação

Os diplóides foram cultivados em meio S-SPO líquido (extrato de levedura 2,5 g/L; acetato de potássio 15 g/L; adenina, uracil e tirosina 0,04 g/L; histidina, leucina, lisina, triptofano, metionina e arginina 0,02 g/L; fenilalanina 0,1 g/L e treonina 0,35 g/L) a 25°C, sob agitação até a formação de ascos.

4.2.2. Dissecção e caracterização de tétrades

Foram centrifugados momentaneamente 200 µL da cultura submetida à esporulação. Após a remoção do sobrenadante, as células foram suspensas em 100 µL de sorbitol 20%. Então, foram adicionados 3 µL de zimoliase (10 mg/mL) e a reação foi incubada à temperatura ambiente por 15 minutos. A seguir, foi adicionado 1 mL de sorbitol 20% e as células foram mantidas em gelo até a dissecção. Os ascos foram dissecados em microscópio de dissecção, utilizando placa de meio YPD, a qual foi incubada a 25°C até a obtenção de colônias. O genótipo das células haplóides obtidas foi caracterizado utilizando-se diferentes meios de cultura seletivos. O fator de acasalamento foi definido através do cruzamento com cepas de fator de acasalamento conhecido e seleção dos diplóides em meio seletivo. O fenótipo de sensibilidade a temperatura foi checado pelo crescimento em meio YPD em diferentes temperaturas de incubação.

4.2.3. Teste de fenótipos de crescimento

As leveduras a serem analisadas foram cultivadas na temperatura permissiva em 10 mL de meio seletivo até aproximadamente $1-2 \times 10^7$ células/mL. Após centrifugação a 3.000 xg por 10 minutos e remoção do meio de cultura, as células foram suspensas na concentração de $2,5 \times 10^8$ células/mL. 200 μ L da suspensão foram transferidos para um poço de microplaca. A suspensão foi diluída seriadamente (1:10) em meio líquido seletivo apropriado. Utilizando um pipetador multicanal, 4 μ L da suspensão original e das diluições foram aplicados nos meios de cultura apropriados. As placas foram então incubadas nas temperaturas e meios de cultura desejados.

4.2.4. Perfil polissomal de levedura

4.2.4.1 – Preparação do gradiente de sacarose

Os gradientes de sacarose foram preparados adicionando-se, subsequentemente, em tubo de polialômero (14x89 mm/13,2 mL - Beckman), 2,1 mL de soluções de sacarose 10%, 20%, 30%, 40% e 50% em tampão adequado (Tris - HCl 20 mM pH 7,5; KAc 50 mM; MgCl₂ 10 mM; DTT 1 mM e ciclo-heximida 100 μ g/mL), partindo-se da menor concentração e em sentido crescente de concentração, utilizando-se uma seringa de 3 mL e agulha de extremidade não-perfurante de 15 cm. Em seguida, os gradientes foram incubados a 4°C por 12 horas para permitir o equilíbrio entre as fases.

4.2.4.2 – Preparação do extrato e centrifugação dos gradientes

As linhagens de interesse foram inoculadas em 200 mL de meio de cultura adequado e incubadas até a D.O._{600nm}=0,2 a 25°C. As culturas foram então transferidas para um banho com agitação a 37°C por 3 horas. Após esse período de incubação, as células foram tratadas com ciclo-heximida, para uma concentração final de 100 μ g/mL de cultura, durante 5 minutos. Em seguida, as culturas foram centrifugadas em garrafas previamente geladas, a 3.500 xg por 5 minutos a 4°C. As células foram lavadas com 2,5 mL de tampão de lise (Tris-HCl 20 mM pH 7,5; KCl 50 mM; MgCl₂; 10 mM; DTT 1 mM e ciclo-heximida 100 μ g/mL) e, então, transferidas para tubo cônico de 15 mL e centrifugadas a 3.500 xg, por 5 minutos a 4°C. Para realizar a lise, o precipitado de células foi ressuscitado em 350 μ L de tampão de lise adicionado de inibidores de protease (“EDTA-free, Complete Protease Inhibitors Cocktail” - Roche) e inibidor de RNase (1 μ L/mL de “RNasin” - Promega), transferido para um tubo de 1,5 mL contendo 1 g de pérolas de vidro e submetido à agitação em aparelho Fastprep (três ciclos de 30

segundos, na velocidade 6.0, com intervalos de 1 minuto). O lisado obtido foi transferido para um novo tubo e, em seguida, centrifugado a 14.000 xg por 15 minutos a 4°C, para clarificação. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL e a D.O._{260nm} da amostra foi determinada.

4.2.4.3 – Fracionamento dos gradientes

Um volume de lisado equivalente a 20 D.O._{260nm} foi aplicado sobre o gradiente de sacarose e centrifugado a 39.000 rpm por 3 horas a 4°C em rotor SW-41Ti, utilizando ultracentrífuga Beckman. Para o fracionamento dos gradientes de sacarose contendo o extrato de levedura separado por densidade, foram utilizados sistemas da Amersham Pharmacia Biotech e da Bio-Rad, utilizando-se um fluxo contínuo de 1 mL/minuto de solução de sacarose 60% e a D.O._{260nm} foi determinada por um leitor UV conectado ao sistema. Por fim, as frações dos perfis polissomais gerados foram quantificados com o auxílio do software NIH Image J.

4.2.5. Transformação de leveduras

4.2.5.1. Preparação de *S. cerevisiae* competente

As leveduras de interesse foram inoculadas em 50 mL de meio líquido YPD a 25°C-30°C sob agitação, até uma densidade de $1-2 \times 10^7$ células/mL. Em seguida, a cultura foi centrifugada por 5 minutos a 3.500 xg. O sobrenadante foi descartado e as células foram suspensas em 1 mL de água estéril e novamente centrifugadas a 3.500 xg por 10 segundos. As células foram então novamente lavadas com água e uma vez com a solução acetato de lítio/TE (LiAc 100 mM pH7, 5; Tris 10 mM pH 7,5; EDTA 1 mM). Finalmente, as células foram suspensas em acetato de lítio/TE em uma concentração de 2×10^9 células/mL.

4.2.5.2. Transformação

Um volume de 50 µL de células competentes foi misturado com 1 µg do DNA plasmidial e 50 µg de DNA carreador (DNA de esperma de salmão). Em seguida, foram adicionados 300 µL da solução acetato de lítio/TE/PEG 4.000 (40% de PEG 4.000 em acetato de lítio/TE). Essa mistura foi agitada fortemente para homogeneização e incubada a 25°C por 30 minutos, sob agitação. Após esse período, as células foram submetidas a choque térmico a 42°C por 15 minutos e centrifugadas a 3.500 xg por 10 segundos. O sobrenadante foi descartado e as células suspensas em 1 mL de TE pH

7,5. A seguir, as células foram plaqueadas em meio seletivo e incubadas a 25°C até a obtenção de colônias.

4.2.6. Ensaio de síntese proteica

As linhagens selvagem (SVL82) ou *tif51A-3* (SVL32) foram cultivadas em 50 mL de meio YPD a 25°C até $D.O_{260nm}=0,2$. Em seguida, foram adicionados 10 μ Ci/mL de [³H]-leucina (Perkin Elmer/NEN) e as células foram incubadas a 25°C durante 1 h, sob agitação. Alíquotas de 10 mL das culturas foram centrifugadas a 4°C e congeladas a -80°C. O restante foi então transferido para a temperatura não permissiva (38°C) por 4 h. Durante o período de incubação, alíquotas de 10 mL foram coletadas após 1, 2, 3 e 4 h, centrifugadas a 4°C e congeladas a -80°C. Todas as alíquotas de células congeladas foram ressuspensas em solução de ácido tricloroacético (TCA) a 15% e incubadas em gelo durante 15 min. Em seguida, as amostras foram aquecidas a 100°C por 15 min e novamente incubadas em gelo por 10 min. O precipitado formado foi coletado por centrifugação a 15.000 xg por 10 min a 4°C e lavado duas vezes com solução de TCA a 10% para remoção da [³H]-leucina não incorporada. Os precipitados obtidos foram então ressuspensos em 0,1 mL de NaOH 0,2 M. Alíquotas de 50 μ L foram utilizadas para determinação da radioatividade incorporada às proteínas com o auxílio de um cintilador (Beckman). A concentração total de proteína foi determinada pelo método de Bradford (Bio Rad), utilizando-se alíquotas de 5 μ L. O total de proteína sintetizada foi calculado para cada amostra como contagens por minuto por micrograma (cpm/ μ g) de proteína total.

4.2.7. Western blot

As linhagens de interesse foram inoculadas em 5 mL de meio YPD e incubadas a 25°C por 12-16 horas. As culturas foram então normalizadas para $D.O_{600nm}=0,2$ em 50 mL e incubadas na temperatura permissiva (25°C) por 4 horas. Em seguida, as culturas foram divididas em volumes iguais, uma parte foi incubada a 25°C e a outra a 38°C por 4 horas. As células foram coletadas por centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e as células foram lisadas sob agitação em 250 μ L de tampão (Tris HCl pH 7,5 20 mM; DTT 2 mM; PMSF 2 mM; coquetel de inibidor de protease; EDTA 2 mM) e aproximadamente 5 mg de pérolas de vidro. A concentração de proteína total foi determinada pelo método de Bradford.

As amostras proteicas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) e transferidas para membrana de nitrocelulose. A membrana foi bloqueada à temperatura ambiente por 60 minutos em tampão PBST (PBS 1X, 0.25% Tween-20) contendo 5% de leite desnatado, sob agitação. A membrana foi então incubada por 2 horas à temperatura ambiente com uma diluição adequada de anticorpo primário em PBST contendo 5% de leite desnatado. Posteriormente, a membrana foi lavada 3 vezes por cinco minutos com PBST. A seguir, a membrana foi incubada por 45 minutos com anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase em PBST contendo 5% de leite desnatado. Após três novas lavagens de cinco minutos com PBST, a membrana foi tratada com reagentes quimioluminescentes (ECL - GE Biosciences) e exposta a filme autorradiográfico. Na análise dos níveis de eIF5A do ensaio de síntese proteica, foram utilizados os anticorpos primários anti-eIF5A e anti-Pub1, produzidos anteriormente em nosso laboratório. Nos ensaios de copurificação, foram utilizados os anticorpos primários anti-eIF5A, anti-eEF2, anti-P0, anti-L5 e anti-Pab1, também produzidos em nosso laboratório e o anticorpo GST da empresa Sigma-Aldrich.

4.2.8. Tempo de trânsito ribossomal

As linhagens selvagem (SVL82) ou *tif51A-3* (SVL32) foram cultivadas em 300 mL de meio YPD a 25°C até $D.O_{260nm}=0,2$. As culturas foram então transferidas para a temperatura não permissiva (38°C) e incubadas por 3 h. As células foram coletadas por centrifugação a 17.000 xg por 5 min e, em seguida, ressuspendidas em 6 mL de YPD contendo 12,5 µCi/mL de [³H]-leucina (Perkin Elmer/NEN). Após 2, 4, 6, 8, 10 e 12 min a 38°C, alíquotas de 1 mL foram transferidas para tubos de microcentrífuga contendo 0,5 mL de tampão PBS (NaCl 140 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 10 mM; KH₂PO₄ 1,8 mM; pH 7,4) gelado adicionado de 0,1 mg/mL de ciclo-heximida. As células foram incubadas em gelo por 2 min, coletadas por centrifugação, lavadas com PBS e, finalmente, congeladas em nitrogênio líquido. Após coleta de todos os pontos, 400 µL de tampão de lise (Tris-HCl 10 mM pH 7,5; NaCl 10 mM; MgCl₂ 15 mM; DTT 1 mM; ciclo-heximida 0,1 mg/mL e pepstatina, leupeptina, aprotinina e quimostatina 5 µg/mL) foram adicionados ao precipitado de células. A lise foi efetuada por agitação com pérolas de vidro utilizando o aparelho Fastprep (três ciclos de 30 s, na velocidade 6.0, com intervalos de 1 minuto). O lisado obtido foi transferido para um novo tubo e, em

seguida, centrifugado a 15.000 xg por 10 minutos a 4°C, para clarificação. Aproximadamente 350 µL do sobrenadante pós-mitocondrial (PMS) foram transferidos para um novo tubo de microcentrífuga. Para determinar a incorporação de [³H]-leucina nas proteínas totais (nascentes e completas), foi adicionado 1 mL de acetona gelada às alíquotas de 150 µL de PMS para precipitação das proteínas. Após 1 h de incubação a -20°C, o precipitado foi coletado por centrifugação a 15.000 xg por 10 min a 4°C. Os precipitados foram lavados duas vezes com acetona gelada e então, ressuspensos em 0,1 mL de NaOH 0,2 N. Os 150 µL restantes do PMS foram misturados com 350 µL de tampão polissomal (Tris-HCl 25 mM pH 7,5; NaCl 25 mM; MgCl₂ 10 mM; Triton X-100 0,05%; sacarose 0,14 M e ciclo-heximida 0,1 mg/mL) e submetidos à ultracentrifugação a 200.000 xg por 1 h a 4°C em rotor SW-41Ti, utilizando ultracentrífuga Beckman, para precipitação dos ribossomos. Em seguida, foi adicionado 1 mL de acetona gelada a alíquotas de 250 µL do sobrenadante pós-ribossomal (PRS) para determinar a incorporação de [³H]-leucina nas proteínas completas. As amostras foram então processadas como descrito acima para o PMS. Alíquotas de 50 µL foram utilizadas para quantificação da radioatividade com auxílio de um cintilador Beckman. A radioatividade para cada ponto foi representada pela média de três medições. A radioatividade do PMS e do PRS foram apresentadas em função do tempo. A medida de incorporação de [³H]-leucina nas proteínas foi obtida por análises de regressão linear. Finalmente, a média de trânsito ribossomal foi determinada pela diferença entre as linhas correspondentes a PMS e PRS, multiplicada por 2.

4.2.9. Ensaio de copurificação de proteína

4.2.9.1. Proteína de fusão com GST

As linhagens de interesse expressando eIF5A em fusão com GST foram cultivadas em 5 mL de meio seletivo, acrescido de glicose (2%) a 30°C por uma noite. Em seguida, a D.O._{600nm} foi determinada e a cultura foi então diluída em 500 mL de meio SC-ura acrescido de rafinose (2%) e cultivada até a obtenção de D.O._{600nm} = 0,020 e, em seguida, incubada sob agitação a 30°C até D.O._{600nm} = 0,4-0,5. Para indução da expressão da proteína de fusão, foi adicionada galactose 2% e a cultura foi incubada por 4 horas. Posteriormente, as culturas foram centrifugadas a 2.500 xg, a 4°C por 15 minutos e a massa de células obtida foi lavada duas vezes com 25 mL de PBS 1X gelado. As células foram pesadas e congeladas a -80°C. Para efetuar a lise, as

amostras foram descongeladas em gelo e foi adicionado um volume de tampão de lise (KAc 100 mM; MgAc 2 mM; tampão HEPES 30 mM; PMSF – fluoreto de fenilmetanosufonil 1 mM; PLAC 40 μ L; β -mercaptoetanol 7 mM) equivalente à massa de células e pérolas de vidro na proporção de 5 g de pérolas de vidro para cada 1 g de massa celular. Em seguida, as amostras foram submetidas à agitação manual por 1 minuto, 5 vezes, com intervalos de 1 minuto em gelo. Após a lise, o extrato celular obtido foi centrifugado por 20 minutos a 20.000 xg a 4°C e, em seguida, o sobrenadante foi coletado. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford. A proteína de fusão foi então purificada por afinidade com glutathion-sepharose (GE Biosciences), segundo as recomendações do fabricante. A resina contendo as proteínas purificadas foi suspensa em 100 μ L de tampão de corrida 2X e, finalmente, as proteínas foram separadas por SDS-PAGE seguido de ensaio de western blot.

4.2.9.2. Proteína de fusão com proteína A

As linhagens de interesse expressando eIF5A em fusão com a proteína A foram cultivadas em 50 mL de meio YPD a 30°C sob agitação até $D.O_{600nm}=0,5$. As células foram coletadas por centrifugação a 3.000 xg por 3 minutos e, em seguida, lavadas com tampão IPP150 (10mM Tris-HCl, pH 8; 150mM NaCl; 0,11% NP40). As células foram então suspensas em 1 mL de tampão IPP150 e foram adicionados aproximadamente 5 mg de pérolas de vidro. As amostras foram submetidas à agitação vigorosa para efetuar a lise celular. O extrato obtido foi centrifugado a 15.000 xg por 20 minutos, o sobrenadante foi coletado e a concentração proteica total foi determinada pelo método de Bradford. Em seguida, a proteína de fusão foi purificada por afinidade com resina de IgG-Sepharose (GE Biosciences). Como controle, o extrato proteico foi incubado com resina de proteína A-Sepharose (GE Biosciences). Finalmente, as amostras foram submetidas à SDS-PAGE seguido de ensaio de western blot.

4.2.10. Ensaio de luminescência

As linhagens de interesse foram transformadas com os plasmídeos repórteres contendo os genes codificadores de luciferase de *Renilla* (*Rluc*) e de vaga-lume (*Fluc*) e cultivadas em meio seletivo sob agitação a 25 °C até $D.O_{600nm}= 0,6-1,0$. As culturas foram então transferidas para a temperatura não-permissiva (38°C) e incubadas por 3

h. Em seguida, um volume correspondente a 1 D.O._{600nm} de células foi coletado e centrifugado a 3.000 xg por um minuto. O precipitado de células foi lavado com PBS 1x e ressuspendido em 250 µL de “Passive Lysis Buffer” (Promega) e incubado à temperatura ambiente por 2 minutos. Os ensaios de luminescência foram realizados utilizando o “Dual-Luciferase Reporter Assay System” (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante e a luminescência determinada utilizando-se o luminômetro “Glo Max 20/20” (Promega).

4.2.11. Microscopia por contraste diferencial de fase (DIC)

As linhagens selvagem (VZL837), *tif51A*^{K56A} (VZL822) e *tif51A*^{Q22H/L93F} (VZL821) foram transformadas com o vetor pRS426 (pSV65) ou com a construção pSV262 (*EFT2/URA3/2µ*). Essas linhagens foram então cultivadas a 25°C em meio SC-ura até atingirem D.O._{600nm}=0,4, incubadas a 38°C durante 2 h e observadas em um microscópio Nikon TE300. As imagens foram capturadas com o programa Image-Pro Plus (Media Cybernetics).

4.2.12. Análise de morfologia celular por citometria de fluxo

As linhagens selvagem (VZL837), *tif51A*^{K56A} (VZL822) e *tif51A*^{Q22H/L93F} (VZL821) foram transformadas com o vetor pRS426 (pSV65) ou com a construção pSV262 (*EFT2/URA3/2µ*). Essas linhagens foram então cultivadas a 25°C em meio SC-ura até atingirem D.O._{600nm}=0,4, incubadas a 38°C durante 3 h e analisadas em um citômetro de fluxo Canto (Becton Dickson - BD). Foram analisados os parâmetros físicos de espalhamento de luz lateral (SSC - “side light scatter”) e espalhamento de luz frontal (FSC- “foward light scatter”). Os resultados obtidos foram analisados com o auxílio do software Diva.

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação do impacto no perfil polissomal de mutantes duplos de eIF5A com mutantes de fatores de alongação ou de início de tradução de eucariotos

Análises de polissomos são frequentemente empregadas em estudos de síntese proteica com o objetivo de ampliar o conhecimento dos mecanismos que regulam a tradução e dos fenômenos que alteram este processo. Assim, diferenças nas proporções de polissomos e monossomos podem indicar defeitos nas etapas de início ou de alongação da tradução.

Os perfis polissomais de mutantes de fatores de início e de alongação da tradução já estão bem caracterizados. Defeitos no início da tradução provocam acúmulo de monossomos e, conseqüentemente, redução da fração polissomal (“polysome run-off”), enquanto defeitos na alongação da tradução promovem acúmulo da fração polissomal (Asano e cols., 2000; Anand e cols., 2003). Recentemente, foi verificado que o perfil polissomal de mutantes de eIF5A é bastante diferente do perfil de mutantes de início de tradução (Zanelli e cols., 2006). Com o objetivo de determinar em qual etapa da tradução eIF5A atua, foi proposta a análise do perfil polissomal de mutantes que combinem mutações em eIF5A e em fatores envolvidos na etapa de início ou de alongação da tradução. Para isso, foram escolhidos fatores que atuam em etapas bastante distintas do início da síntese proteica e o fator de alongação eEF2.

Um dos fatores de início de tradução escolhidos para a análise foi eIF4E, fator envolvido com o reconhecimento do mRNA pelo complexo ribossomal 43S. Para isso, foi realizado um cruzamento entre as linhagens SVL447 (*tif51A-3::URA3*) e SVL347 (*cdc33-42*). Após realização do cruzamento, os diplóides foram selecionados em meio seletivo SC-ura,-trp e submetidos à esporulação. As tétrades obtidas foram dissecadas em meio YPD e os esporos cultivados a 25°C. A seguir, os haplóides resultantes foram genotipados para confirmar a presença de tétrades verdadeiras. Um haplóide resultante contendo as mutações *tif51A-3* e *cdc33-42* foi selecionado e utilizado na comparação com a linhagem selvagem e com os mutantes parentais. Assim, diluições seriadas dessas linhagens foram cultivadas em meio YPD nas temperaturas de 25°C e 30°C. Como pode ser observado na Figura 5A, o haplóide que combina os alelos

tif51A-3 e *cdc33-42* apresenta um fenótipo de sensibilidade a temperatura mais severo do que as linhagens que possuem apenas o alelo *tif51A-3* ou *cdc33-42*. Essa intensificação do fenótipo de sensibilidade a temperatura revela uma interação genética entre *TIF51A* e *CDC33*, o que reforça o envolvimento de eIF5A com a tradução.

Para avaliar o impacto da combinação das mutações em eIF5A e eIF4E na síntese proteica, foi realizada a separação das frações ribossomais em gradiente de sacarose para determinação do perfil polissomal das linhagens selvagem (VZL844), *tif51A-3* (SVL447), *cdc33-42* (SVL347) e do duplo mutante *tif51A-3 cdc33-42* (VZL847). Como pode ser observado na Figura 5B, o perfil polissomal do mutante *tif51A-3* na temperatura não-permissiva apresenta uma redução do pico de 80S e um aumento nas frações polissomais, quando comparado à linhagem selvagem, o que confirma os dados obtidos anteriormente (Zanelli e cols., 2006). Já o perfil polissomal do mutante *cdc33-42* apresentou um aumento do pico de 80S e uma acentuada redução da fração polissomal, característicos de mutantes de fatores envolvidos no início da tradução (Asano e cols., 2000). Curiosamente, o perfil polissomal do duplo mutante *tif51A-3 cdc33-42* apresentou um aumento do pico de 80S e uma redução da fração polissomal, quando comparado com a linhagem selvagem, mas essa redução foi menor do que a apresentada pelo mutante *cdc33-42*. Enquanto o mutante *cdc33-42* apresentou 74% das frações ribossomais migrando como 80S e 19% como polissomos, o duplo mutante *tif51A-3 cdc33-42* apresentou 62% das frações ribossomais compostas por 80S e 33% por polissomos. Esse acúmulo de frações polissomais observado para o mutante *tif51A-3* é característico de fatores envolvidos na etapa de alongação da tradução, o que sugere a atuação de eIF5A na alongação ao invés de início da síntese proteica.

Paralelamente, foi realizado um cruzamento entre as linhagens mutantes *tif51A-3* (SVL102) e *prt1-1* (VZL829). O gene *PRT1* codifica uma das subunidades do fator de início de tradução eIF3, envolvido na formação do complexo pré-iniciador 43S. Os diplóides obtidos do cruzamento foram selecionados em meio seletivo SC-ade,-trp e submetidos à esporulação. As tétrades obtidas foram dissecadas em meio YPD e os esporos cultivados a 25°C. Em seguida, foi realizada a genotipagem para confirmação da presença de tétrades verdadeiras. Um haplóide resultante contendo as mutações *tif51A-3* e *prt1-1* foi selecionado e utilizado na comparação com linhagem selvagem e com os mutantes parentais. A Figura 6A apresenta a análise do fenótipo de sensibilidade a temperatura para essas linhagens nas temperaturas de 25°C, 30°C e

35°C. É possível observar que o haplóide que combina os alelos *tif51A-3* e *prt1-1* não apresentou alterações no fenótipo de sensibilidade a temperatura quando comparado com a linhagem que possui apenas *tif51A-3*, diferentemente do observado para o alelo *cdc33-42*.

Apesar de não ter sido observada interação genética entre *TIF51A* e *PRT1*, os perfis polissomais das linhagens selvagem (VZL846), *tif51A-3* (SVL102), *prt1-1* (VZL829) e do duplo mutante *tif51A-3 prt1-1* (VZL845) foram analisados. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 6B. Conforme esperado para um mutante de início de tradução, o perfil polissomal do mutante *prt1-1* apresentou um aumento do pico de 80S e uma significativa redução da fração polissomal, comparado ao perfil da linhagem selvagem. A quantificação das frações polissomais do mutante *prt1-1* mostrou que 76% das frações ribossomais migraram como 80S e que 17% migraram como polissomos. Por outro lado, o duplo mutante *tif51A-3 prt1-1* apresentou 72% das frações ribossomais migrando como 80S e 20% como polissomos. Apesar da quantificação das frações polissomais do duplo mutante *tif51A-3 prt1-1* apresentar um aumento sutil em relação ao mutante *prt1-1*, é possível observar aumento do número de ribossomos ligados a um mesmo mRNA na fração polissomal, reforçando o envolvimento de eIF5A com a etapa de alongação da tradução.

Outro fator escolhido para análise dos perfis polissomais de mutantes duplos foi eIF5B, fator envolvido na ligação das subunidades ribossomais, última etapa do início da tradução. Diferentemente dos outros genes utilizados neste trabalho, o gene *FUN12*, codificador de eIF5B, não é essencial para o crescimento celular em *S. cerevisiae*, de maneira que uma linhagem nocaute para *FUN12* (*fun12::kanMX4*) pôde ser utilizada.

Antes da realização do cruzamento, a linhagem SVL102 foi transformada com o vetor pRS425 (pSV64), que possui o gene *LEU2*, para possibilitar a seleção do diplóide. Os diplóides obtidos do cruzamento foram então selecionados em meio SC-leu,-trp, os quais foram submetidos à esporulação. As tétrades foram dissecadas em meio YPD e os esporos cultivados a 25°C. Em seguida, os haplóides resultantes foram genotipados para confirmar a presença de tétrades verdadeiras. Um haplóide resultante contendo a mutação *tif51A-3* e o nocaute *fun12::kanMX4* foi selecionado e utilizado na comparação com a linhagem selvagem e com os mutantes parentais. O fenótipo de sensibilidade a temperatura foi avaliado para essas linhagens através de

diluição seriada e cultivo em meio YPD nas temperaturas de 25°C, 30°C e 35°C. É possível observar na Figura 7A, a 25°C e 35°C, que o duplo mutante *tif51A-3 fun12::kanMX4* apresenta níveis de crescimento menores do que as linhagens que possuem apenas os alelos *tif51A-3* ou *fun12::kanMX4*, indicando uma interação genética entre *TIF51A* e *FUN12*.

Em seguida, foi realizada a separação das frações ribossomais em gradiente de sacarose para determinação do perfil polissomal das linhagens selvagem (VZL865), *tif51A-3* (VZL866), *fun12::kanMX4* (VZL851) e do duplo mutante *tif51A-3 fun12::kanMX4* (VZL850). Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 7B e estão de acordo com o observado para os mutantes de início de tradução analisados anteriormente (*cdc33-42* e *prt1-1*). Pode-se observar que o mutante *fun12::kanMX4* apresentou 45% das frações polissomais migrando como 80S e 45% como polissomos, revelando um aumento dos níveis de 80S e uma diminuição de polissomos em relação à linhagem selvagem. Já o duplo mutante *tif51A-3 fun12::kanMX4* apresentou níveis de 80S semelhantes à linhagem selvagem (35%) e um aumento da fração polissomal (54%), comparado a linhagem que possui apenas o nocaute de *FUN12*.

Ainda, com o objetivo de definir a atuação de eIF5A na síntese proteica, foi proposta a análise do perfil polissomal de linhagens que combinam mutações em eIF5A e em fatores de alongação da tradução.

Inicialmente, foi proposta a obtenção de uma linhagem contendo mutantes dos genes que expressam as proteínas eIF5A e eEF3. Apesar de estar presente apenas em fungos, nesses organismos eEF3 é essencial para a viabilidade celular (Anand e cols., 2003). No entanto, apesar de o mutante de eEF3 (*yef3^{F650S}*) apresentar as marcas auxotróficas correspondentes ao genótipo descrito e o fenótipo de sensibilidade a temperatura, o perfil polissomal observado para a linhagem *yef3^{F650S}* não está de acordo com os dados da literatura (Anand e cols., 2003). O perfil polissomal analisado apresentou um aumento do pico de 80S ao invés de redução e uma pequena redução da fração polissomal ao invés de um considerável aumento, quando comparado à linhagem selvagem (dados não mostrados). Diante disso, os estudos com o mutante *yef3^{F650S}* foram abandonados.

Alternativamente, para analisar o efeito da combinação de mutantes de eIF5A e de um fator de alongação da tradução no perfil polissomal, foi utilizado um plasmídeo que contém o alelo dominante negativo de eEF2, *eft2^{H699K}*. O fenótipo dominante

negativo do alelo *eft2*^{H699K} não se deve a defeitos na expressão deste gene, mas sim à redução dos níveis de eEF2 selvagem nas linhagens que apresentam este plasmídeo (Ortiz e Kinzy, 2005). Para analisar a possibilidade de interação genética entre eIF5A e eEF2, as linhagens SVL82 (*TIF51A*) e SVL32 (*tif51A-3*) foram transformadas com os plasmídeos pRS315 (pSV59, *LEU2/CEN*) e pVZ853 (*eft2*^{H699K}/*LEU2/CEN*). Em seguida, as linhagens selvagem, *tif51A-3*, *eft2*^{H699K} e o duplo mutante *tif51A-3 eft2*^{H699K} foram submetidos a diluições seriadas e cultivados em meio SC-leu a 25°C e 30°C. Como pode ser observado na Figura 8A, a linhagem que combina os alelos *tif51A-3* e *eft2*^{H699K} apresenta um fenótipo de sensibilidade a temperatura mais severo do que as linhagens que possuem apenas o alelo *tif51A-3* ou *eft2*^{H699K}.

Conforme proposto, o perfil polissomal da linhagem que combina os genes mutantes *tif51A-3* e *eft2*^{H699K} (VZL854) foi obtido e comparado aos perfis das linhagens selvagem (VZL855), *tif51A-3* (VZL852) e *eft2*^{H699K} (VZL857). Como mostra a Figura 8B, é possível observar que o duplo mutante *tif51A-3 eft2*^{H699K} mostrou que 39% das frações ribossomais migraram como 80S e que 53% migraram como polissomos. De maneira semelhante, o mutante *eft2*^{H699K} apresentou 32% das frações ribossomais migrando como 80S e 50% como polissomos. Essa semelhança entre os perfis polissomais de *tif51A-3* e *eft2*^{H699K} separadamente evidencia o envolvimento de eIF5A com a elongação da tradução. Finalmente, o perfil polissomal do duplo mutante *tif51A-3 eft2*^{H699K} é bastante semelhante ao observado para as linhagens que possuem apenas o alelo *tif51A* ou *eft2*^{H699K}, o que sugere uma relação funcional próxima entre eIF5A e eEF2.

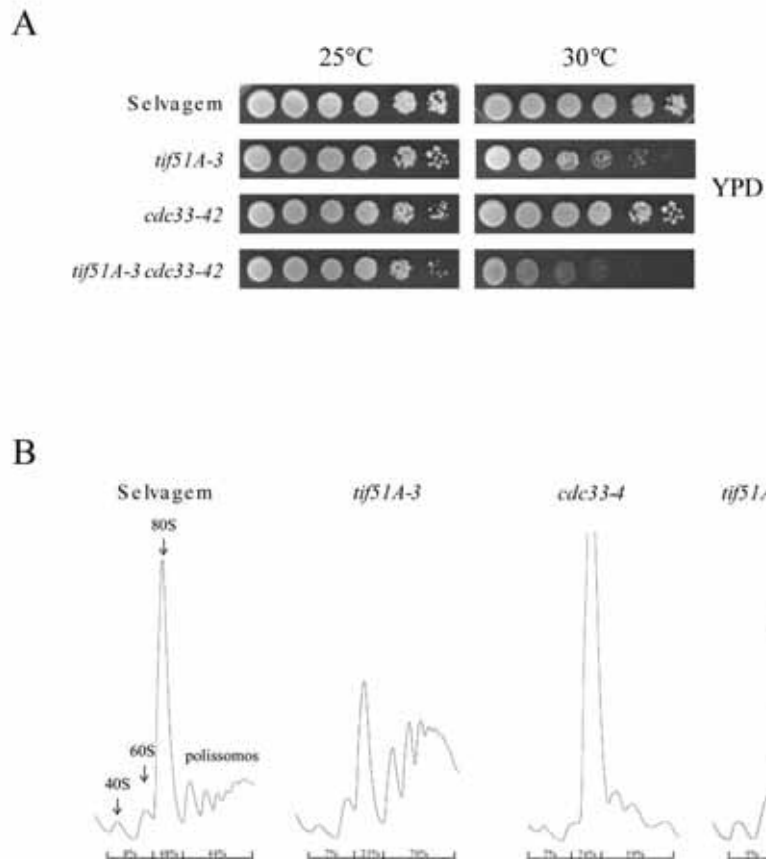
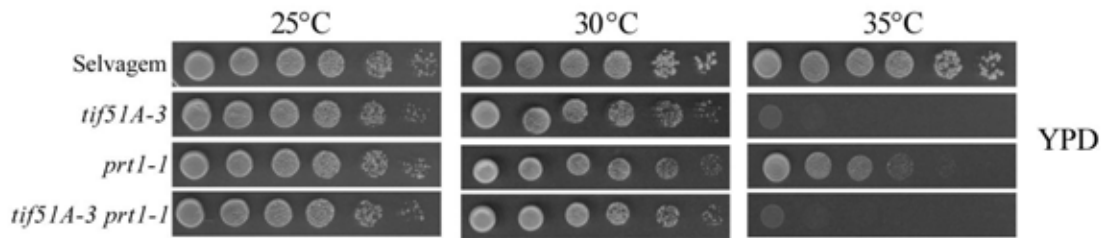


Figura 5. Análise de interação genética e de perfil polissomal em mutantes simples e duplos dos fatores eIF5A e eIF4E. **A.** Diluições seriadas das linhagens selvagem (VZL846), *tif51A-3* (SVL447), *cdc33-42* (SVL347) e *tif51A-3 cdc33-42* (VZL847) foram realizadas, inoculadas em meio YPD e incubadas nas temperaturas de 25°C e 30°C. **B.** Extratos celulares das mesmas linhagens foram fracionados por centrifugação em gradiente de sacarose. Os gráficos representam a leitura de absorbância a 254nm dos gradientes.

A



B

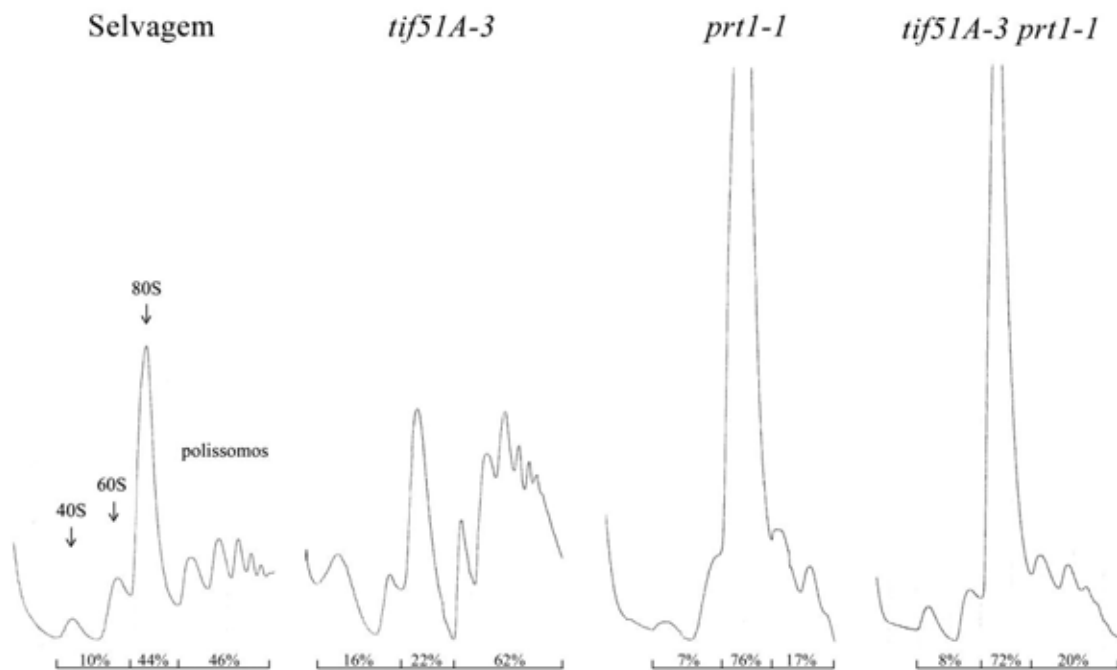


Figura 6. Análise de interação genética e de perfil polissomal em mutantes simples e duplos dos fatores eIF5A e eIF3. A. Diluições seriadas das linhagens selvagem (VZL844), *tif51A-3* (SVL102), *prt1-1* (VZL829) e *tif51A-3 prt1-1* (VZL845) foram realizadas, inoculadas em meio YPD e incubadas nas temperaturas de 25°C, 30°C e 35°C. B. Extratos celulares das mesmas linhagens foram fracionados por centrifugação em gradiente de sacarose. Os gráficos representam a leitura de absorbância a 254nm dos gradientes.

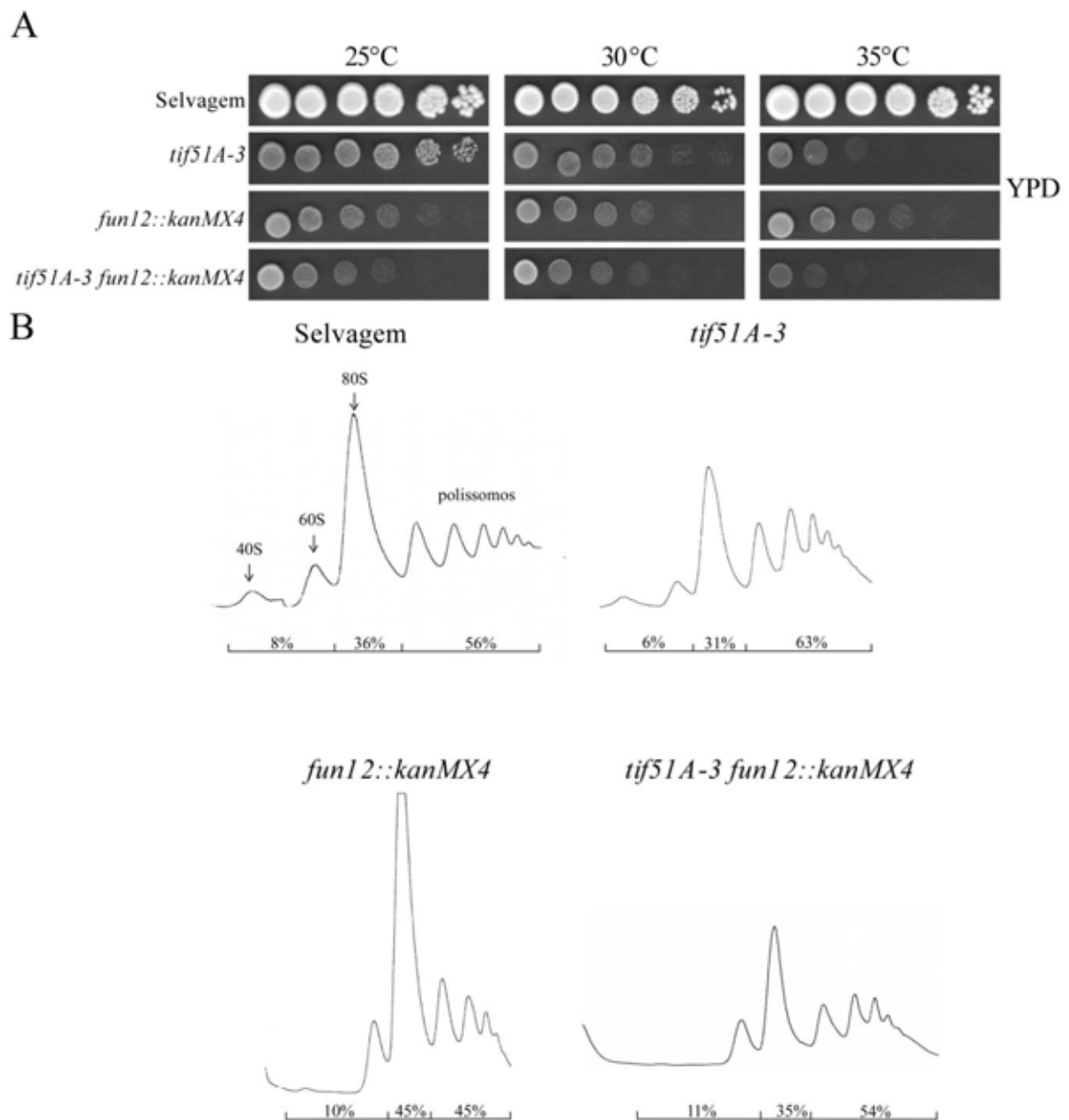


Figura 7. Análise de interação genética e de perfil polissomal em mutantes simples e duplos dos fatores eIF5A e eIF5B. A. Diluições seriadas das linhagens selvagem (VZL865), *tif51A-3* (VZL866), *fun12Δ* (VZL851) e *tif51A-3 fun12Δ* (VZL850) foram realizadas, inoculadas em meio YPD e incubadas nas temperaturas de 25°C, 30°C e 35°C. **B.** Extratos celulares das mesmas linhagens foram fracionados por centrifugação em gradiente de sacarose. Os gráficos representam a leitura de absorbância a 254nm dos gradientes.

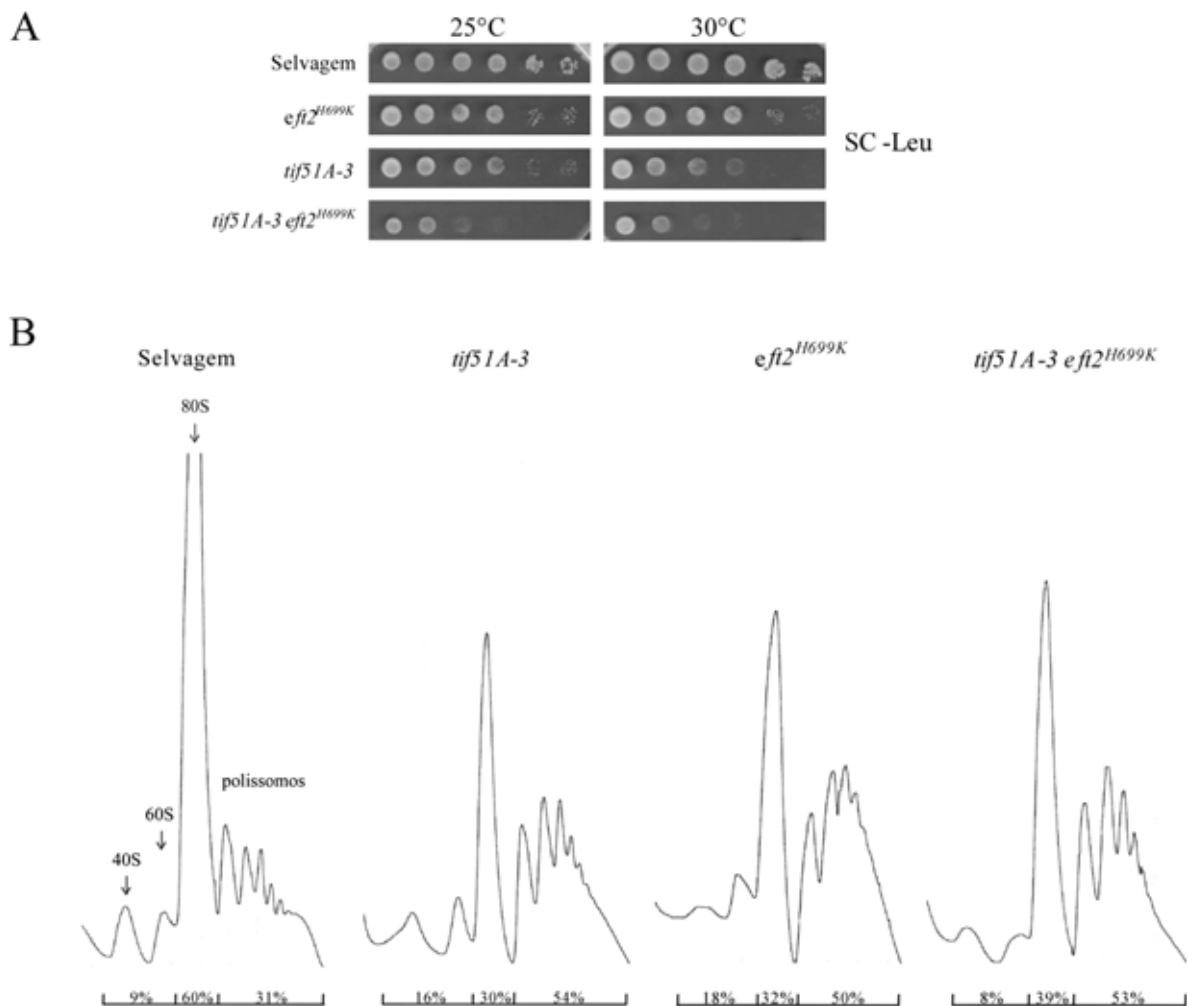


Figura 8. Análise de interação genética e de perfil polissomal em mutantes simples e duplos dos fatores eIF5A e eEF2. A. Diluições seriadas das linhagens selvagem (VZL855), *tif51A-3* (VZL852), *eft2^{H699K}* (VZL857) e do duplo mutante *tif51A-3 eft2^{H699K}* (VZL854) foram realizadas, inoculadas em meio SC-Leu e incubadas nas temperaturas de 25°C e 30°C. **B.** Extratos celulares das mesmas linhagens foram fracionados por centrifugação em gradiente de sacarose. Os gráficos representam a leitura de absorvância a 254nm dos gradientes.

5.2. Análise dos níveis de síntese proteica em mutantes de eIF5A

Para confirmar e ampliar as evidências do envolvimento de eIF5A com a alongação da tradução foi realizado o ensaio de síntese proteica total. Para isso, foram determinados os níveis de incorporação de [³H]-leucina na temperatura não permissiva para as linhagens selvagem (SVL82) e *tif51A-3* (SVL32). Como pode ser observado na Figura 9A, o mutante *tif51A-3* apresentou uma redução de aproximadamente 50% na incorporação de aminoácido marcado após 3 h de cultivo na temperatura não permissiva, o que está diretamente relacionado com a depleção de eIF5A (Figura 9B). Este resultado também reforça o envolvimento de eIF5A com síntese proteica e está de acordo com dados recentes obtidos utilizando diferentes mutantes condicionais de eIF5A (Dias e cols., 2008; Saini e cols., 2009).

5.3. Análise do tempo de trânsito ribossomal em mutantes de eIF5A

Com o objetivo de evidenciar a atuação de eIF5A na etapa de alongação da tradução, foi determinado o tempo de trânsito ribossomal da linhagem *tif51A-3* (SVL32) na temperatura não-permissiva. O tempo de trânsito ribossomal é o tempo em que a cadeia polipeptídica nascente permanece ligada ao ribossomo ativo, ou seja, é a soma do tempo de alongação e terminação da tradução de um determinado mRNA. Assim, o tempo de trânsito ribossomal foi determinado pela comparação de incorporação de [³H]-leucina entre a fração de proteínas totais (“post-mitocondrial supernatant” - sobrenadante pós-mitocondrial) e a fração de polipeptídeos completos, liberados do ribossomo (“post-ribossomal supernatant” - sobrenadante pós-ribossomal). O tempo médio de trânsito ribossomal determinado para a linhagem selvagem (SVL82) foi de 66 s, enquanto para o mutante *tif51A-3* foi de aproximadamente 96 s, um aumento de cerca de 50%, como apresentado na Figura 9C, o que está de acordo com a redução de aproximadamente 50% na síntese proteica total apresentada pelo mutante *tif51A-3*, na temperatura não permissiva. Este experimento mostra que a etapa de alongação de tradução está de fato alterada na linhagem *tif51A-3*, o que está de acordo com os defeitos observados nos ensaios de síntese proteica e de perfil polissomal para o mutante de eIF5A.

Os resultados apresentados até aqui (itens 5.1, 5.2 e 5.3), somados aos resultados obtidos pela doutoranda Juliana Sposto Avaca, foram reunidos no artigo “eIF5A has a function in the elongation step of translation in yeast”, publicado na revista “Biochemical and Biophysical Research Communications” (anexo).

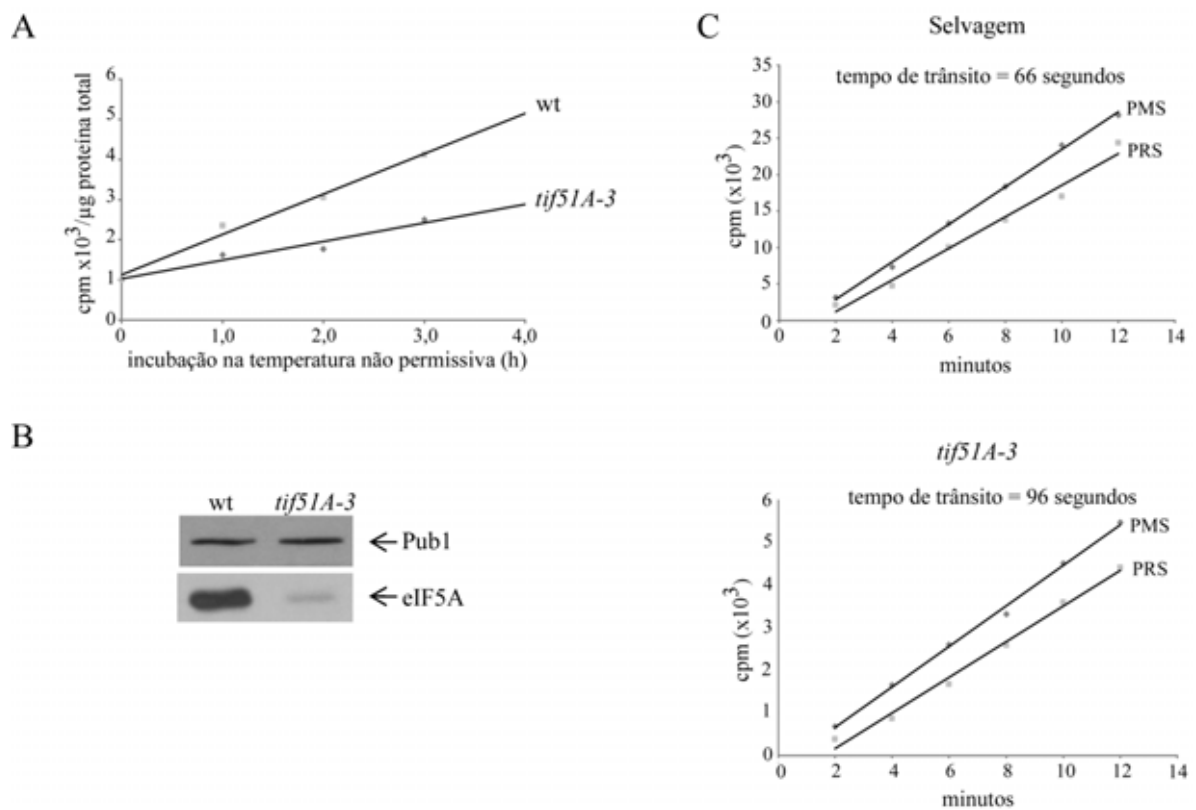


Figura 9. Efeito da depleção de eIF5A na síntese proteica e no tempo de trânsito ribossomal. **A.** As linhagens selvagem e *tif51A-3* foram cultivadas até D.O._{260nm}=0,2 a 25°C em YPD e, em seguida, foi adicionada [³H]-leucina e as culturas foram incubadas a 25°C por 1 h. Alíquotas iniciais foram coletadas e as culturas foram então transferidas para 38°C por 4 h, sendo coletadas alíquotas a cada hora. A incorporação de aminoácido radioativo foi determinada e os resultados estão apresentados como cpm/μg de proteína total. **B.** Ensaio de western blot realizado com as linhagens selvagem e *tif51A-3* na temperatura não permissiva. A proteína Pub 1 foi utilizada como controle de carregamento. **C.** Tempo de trânsito ribossomal determinado pela comparação de incorporação de [³H]-leucina entre a fração de proteínas totais (“post-mitocondrial supernatant” - sobrenadante pós-mitocondrial) e a fração de polipeptídeos completos, liberados do ribossomo (“post-ribossomal supernatant” - sobrenadante pós-ribossomal), obtido por análises de regressão linear.

5.4. Associação de eIF5A com ribossomos ativos na presença de inibidores de síntese proteica

Foi mostrado que eIF5A interage com monossomos funcionalmente ativos e que mutantes dessa proteína são sensíveis a diferentes inibidores da síntese proteica (Zanelli e cols., 2006). Com o objetivo de verificar se o fenótipo de sensibilidade aos inibidores de síntese proteica está relacionado com a perda da interação entre eIF5A e a maquinaria de tradução, foram realizados ensaios de copurificação na presença dos inibidores da tradução paromomicina e ciclo-heximida.

Neste ensaio foram utilizadas as linhagens SVL105 e SVL106, que expressam respectivamente GST (pYGEX) e a proteína de fusão GST-eIF5A (pYGEX-*TIF51A*), sob controle do promotor induzível por galactose. Após 3 horas de indução da expressão com galactose 2%, as culturas foram tratadas com paromomicina (1 mg/mL) ou ciclo-heximida (0,1 mg/mL), durante 5 minutos, a 30°C, sob agitação. Extratos proteicos foram obtidos a partir das culturas tratadas ou não tratadas (controle), quantificados e, em seguida, quantidades normalizadas destes extratos foram submetidas ao processo de purificação por afinidade à resina de glutationa-sepharose. A copurificação foi analisada por ensaios de western blot. Os resultados obtidos neste ensaio estão apresentados na Figura 10A. As canaletas identificadas por “NL” contêm alíquotas da fração não ligada (sobrenadante). As canaletas identificadas por “L” contêm amostras da fração purificada pela resina de glutationa-sepharose. É possível observar que o tratamento com os inibidores da síntese proteica não desfaz a interação de eIF5A com as proteínas eEF2, P0 e L5, componentes da maquinaria de tradução. Há um aumento sutil na interação entre GST-eIF5A e eEF2 no extrato obtido da cultura tratada com ciclo-heximida. Entretanto, esse efeito observado não se reproduziu em diferentes réplicas desse ensaio.

Para analisar se os inibidores de síntese proteica exercem algum efeito na interação entre eIF5A e Pab1p, foi utilizada a linhagem SVL731, que possui a região codificadora da Proteína A integrada na região 5' de *TIF51A*, gerando a proteína de fusão ProtA-eIF5A. Não foi possível utilizar as linhagens que expressam GST (SVL105) e GST-eIF5A (SVL106) devido à interação inespecífica observada entre Pab1 e GST (dados não mostrados). A linhagem SVL731 foi cultivada até fase exponencial de

crescimento e então tratada com paromomicina (1 mg/mL) ou ciclo-heximida (0,1 mg/mL), durante 5 minutos, a 30°C, sob agitação. Os extratos proteicos obtidos foram submetidos à purificação por afinidade à resina de IgG-sepharose, como descrito anteriormente. Esses mesmos extratos foram incubados com resina de Proteína A-sepharose como controle negativo da copurificação, para garantir que a possível interação observada entre ProtA-eIF5A e Pab1 seja específica para eIF5A. A copurificação foi analisada por SDS-PAGE seguido de ensaios de western blot. A Figura 10B apresenta os dados obtidos. As canaletas “NL” correspondem à fração não ligada (sobrenadante). As canaletas “L” correspondem à fração purificada pelas resinas. A interação com eEF2 também foi analisada para validar este método de purificação. Conforme observado para as proteínas testadas anteriormente, o tratamento com os inibidores da síntese proteica testados não desfaz a interação entre Pab1 e eIF5A. Pode-se concluir então, que o fenótipo de sensibilidade aos inibidores da síntese proteica observados em estudos anteriores (Zanelli e cols., 2006) não está relacionado com alterações na interação do fator eIF5A com os componentes da maquinaria de tradução analisados.

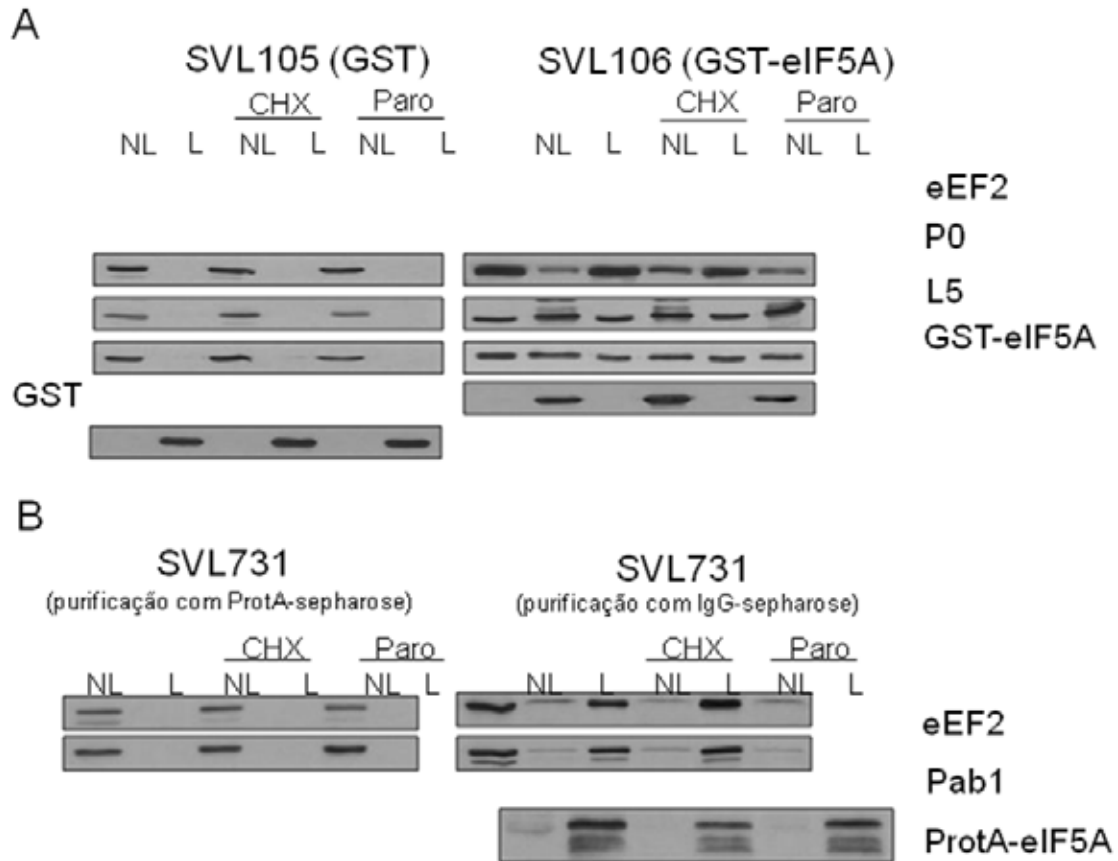


Figura 10. Análise da associação de eIF5A com componentes da maquinaria de tradução na presença de inibidores da síntese proteica. A. Após o período de indução de expressão com galactose, as culturas das leveduras SVL105 e SVL106 foram tratadas com 1 mg/mL de paromomicina (Paro) ou 1 µg/mL de ciclo-heximida (CHX), durante 5 minutos, a 30°C, sob agitação. Os extratos proteicos dessas culturas foram obtidos, normalizados e incubados com resina de glutationa-sepharose. As canaletas apresentam os sobrenadantes após a purificação (canaletas “NL”, fração não ligada) e alíquotas das amostras após purificação com glutationa-sepharose (canaletas “L”, fração ligada). **B.** A levedura SVL731 foi cultivada até a fase exponencial de crescimento e então tratada com 1 mg/mL de paromomicina (Paro) ou 1 µg/mL de ciclo-heximida (CHX), durante 5 minutos, a 30°C, sob agitação. Os extratos proteicos foram obtidos, normalizados e incubados com resina de IgG-sepharose (esquerda) ou Proteína A-sepharose (direita). As canaletas apresentam os sobrenadantes após a purificação (canaletas “NL”, fração não ligada) e alíquotas das amostras após purificação (canaletas “L”, fração ligada).

5.5. Avaliação do efeito de eIF5A na tradução mediada por IRES de CrPV

Conforme descrito anteriormente, alguns vírus e mRNAs celulares possuem sequências não codificadoras na extremidade 5' capazes de iniciar a tradução independentemente do "cap". Essas sequências são denominadas IRES (Internal Ribosome Entry Sites). A IRES do vírus CrPV recruta diretamente as subunidades ribossomais 40S e 60S sendo capaz de iniciar a tradução de forma independente dos fatores de início canônicos.

Com o objetivo de avaliar a influência de eIF5A no processo de tradução mediado pela IRES do CrPV, foi estabelecida uma colaboração com a Dra. Sunnie Thompson sendo que os reagentes utilizados nos experimentos descritos a seguir foram obtidos durante o estágio de doutorado sanduíche na Universidade do Alabama.

Assim, diferentes mutantes de eIF5A foram transformados com plasmídeos que possuem os genes *LEU2* e *URA3* como repórteres discistrônicos e a IRES do vírus CrPV na região intergênica. A transcrição desse repórter é controlada pelo promotor do *CUP1*, induzível por cobre. Para evitar uma atividade promotora inespecífica da região IGR, as construções utilizadas foram geradas baseadas na capacidade de a IRES do CrPV iniciar a tradução em um códon para alanina ao invés de metionina (Schuler e cols., 2006). Assim, como representado na Figura 11A, o códon iniciador AUG do gene repórter *URA3* foi deletado e o transcrito desse repórter tem sua tradução iniciada no códon de alanina subsequente.

As linhagens selvagem (SVL82), *tif51A-1* (SVL14) e *tif51A-3* (SVL32) foram então transformadas com os novos plasmídeos contendo os genes *LEU2* e *URA3* e a IRES do vírus CrPV (IRES, pVZ1035) ou sua forma mutada (IRESmut, pVZ1036), afuncional, ou com o vetor (pSal1, pVZ1034), que não possui o repórter dicistrônico. Como controle positivo da expressão do repórter dependente da IRES, foi utilizada uma linhagem nocaute para *FUN12* (VZL839), gene codificador do fator de início de tradução de eucariotos 5B (eIF5B), que apresenta maior atividade da IRES de CrPV, comparado ao selvagem (Deniz e cols., 2009).

Para analisar o efeito de um mutante de alongação na tradução mediada por IRES, foi utilizado o mutante *cca1-1* (SVL700), que apresenta defeitos na maturação de tRNAs e alterações de perfil polissomal semelhantes às observadas para os mutantes de eIF5A, quando cultivados na temperatura não permissiva (Peltz e cols., 1992).

Essas linhagens foram então cultivadas a 25°C em meio SC-leu adicionado de 100 mM CuSO₄ até atingirem D.O._{600nm}=1,0. Em seguida, as células foram lavadas com meio SC-leu-ura adicionado de 100 mM CuSO₄ e incubadas a 25°C durante 30 min para depletar a uracila presente no meio de cultura anterior. Diluições seriadas das linhagens descritas acima foram cultivadas em meio SC-leu ou SC-leu-ura a 25°C. Não foi possível determinar uma temperatura semi-permissiva para o cultivo das linhagens analisadas, uma vez que os diferentes alelos de *TIF51A* e o mutante *cca1-1* apresentam níveis de sensibilidade a temperatura bastante distintos. Além disso, o nocaute $\Delta fun12$ não apresenta fenótipo de sensibilidade a temperatura, mas de crescimento lento (dados não mostrados)

Como a tradução mediada por IRES de CrPV compete com a dependente de “cap”, a tradução de mensageiros que contêm IRES é privilegiada em linhagens que apresentam defeitos no início da tradução mediada por “cap”. Assim, se eIF5A atua como um fator de alongação e não de início, como proposto recentemente, o crescimento em meio SC-leu-ura não é esperado.

Como pode ser observado na Figura 11B, todas as linhagens analisadas foram capazes de crescer em meio de cultura contendo uracila. No entanto, apenas a linhagem nocaute para *FUN12* contendo o plasmídeo IRES apresentou ativação e crescimento em meio sem uracila. É importante ressaltar que, devido ao fenótipo de crescimento lento (“slow growth”), o nocaute $\Delta fun12$ foi cultivado por um período de tempo maior (6 dias) do que as linhagens selvagem, *tif51A-1*, *tif51A-3* e *cca1-1* (3 dias) no meio SC-leu. Para o teste de ativação da IRES, todas as linhagens foram cultivadas em meio SC-leu-ura durante 10 dias e, ainda assim, apenas o nocaute $\Delta fun12$ contendo o repórter IRES apresentou crescimento.

Com o objetivo de analisar de maneira quantitativa os resultados descritos acima, foram utilizadas construções plasmidiais contendo outros dois genes repórteres, sob controle do promotor de *PGK1*, onde a primeira ORF codifica a luciferase de *Renilla* (*Rluc*), cuja tradução é dependente de “cap” e a segunda ORF codifica luciferase de vaga-lume (*Fluc*), cuja tradução é mediada pela IRES de CrPV. Para evitar atividade promotora críptica da região intergênica, o códon iniciador AUG foi deletado, como ilustrado na Figura 12A, sendo a tradução desse transcrito iniciada no códon para alanina subsequente. Essa deleção gera um transcrito monocistrônico mais curto, porém, igualmente ativo.

Assim, as linhagens selvagem (SVL82), *tif51A-1* (SVL14) e *tif51A-3* (SVL32) foram transformadas com os repórteres contendo os genes codificadores de luciferase de *Renilla* e de vaga-lume e a IRES do vírus CrPV (IRES, pVZ1037) ou sua forma mutada (IRESmut, pVZ1038). Como para o ensaio descrito anteriormente, a linhagem nocaute para *FUN12* (VZL839) foi utilizada como controle positivo e a linhagem *cca1-1* (SVL700) como um mutante para alongação da tradução. Essas linhagens foram então cultivadas a 25°C em meio SC-ura até atingirem D.O._{600nm}=1,0. Em seguida, as células foram incubadas a 38°C durante 4 h e um volume equivalente a 1 D.O._{600nm}, de cada linhagem, foi coletado e utilizado para quantificação das luciferases produzidas, com a utilização do kit “Dual–Luciferase Reporter Assay System” (Promega).

A Figura 12B apresenta a atividade média da luciferase de vaga-lume (*Fluc*), já normalizada para os valores de luminescência obtidos para o primeiro repórter (*Rluc*), e o desvio padrão para as diferentes linhagens analisadas. O resultado aqui apresentado foi obtido de quatro ensaios independentes. Como já observado anteriormente pelo grupo da Dra. Sunnie Thompson, é possível observar uma pequena ativação da tradução mediada por IRES na linhagem selvagem, aproximadamente 3 vezes maior do que a observada para os níveis basais (IRESmut). Assim, é possível observar uma diminuição da atividade de *Fluc* nas linhagens *tif51A-1*, *tif51A-3* e *cca1-1* contendo o repórter IRES, quando comparadas à linhagem selvagem. Por sua vez, o controle positivo $\Delta fun12$ apresentou um aumento da tradução mediada por IRES de aproximadamente 60%, com relação à linhagem selvagem.

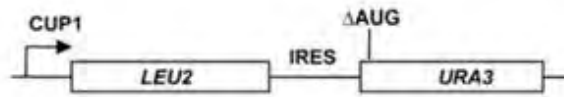
Conforme apresentado anteriormente, o perfil polissomal de mutantes de eIF5A mostrou-se bastante semelhante ao observado para a linhagem que possui o alelo dominante negativo de eEF2 (*eft2^{H699K}*). Diante disso, com o objetivo de realizar uma análise comparativa da influência de eIF5A e de eEF2 no processo de tradução mediado pela IRES do CrPV, os ensaios de luminescência utilizando os repórteres de luciferase (*Fluc* e *Rluc*) foram também realizados na presença do alelo dominante negativo *eft2^{H699K}*.

Assim, as linhagens selvagem (VZL855), *tif51A-1* (VZL957), *eft2^{H699K}* (VZL857) e $\Delta fun12$ (VZL958) foram transformadas com as construções contendo os genes codificadores de luciferase de *Renilla* e de vaga-lume e a IRES do vírus CrPV (IRES, pVZ1037) ou sua forma mutada (IRESmut, pVZ1038) na região intergênica. Essas linhagens foram então cultivadas a 25°C em meio SC-ura até atingirem D.O._{600nm}=1,0.

Em seguida, as linhagens foram incubadas a 38°C durante 4 h e um volume equivalente a 1 D.O. $_{600nm}$, de cada linhagem, foi coletado e utilizado para quantificação das luciferases produzidas.

A Figura 12C apresenta a atividade média da luciferase de vaga-lume (*Fluc*), normalizada para os valores de luminescência obtidos para o primeiro repórter (*Rluc*), e o desvio padrão para as diferentes linhagens analisadas, obtido de quatro ensaios independentes. Assim como observado no ensaio anterior, houve uma diminuição da tradução mediada por IRES na linhagem *tif51A-1* e um aumento da atividade *Fluc* para o controle positivo $\Delta fun12$, com relação à linhagem selvagem. Curiosamente, o mutante *eft2*^{H699K} apresentou níveis de tradução mediada por IRES semelhantes aos obtidos para o mutante *tif51A-1*, fortalecendo os dados de relação funcional entre eIF5A e eEF2.

A



B

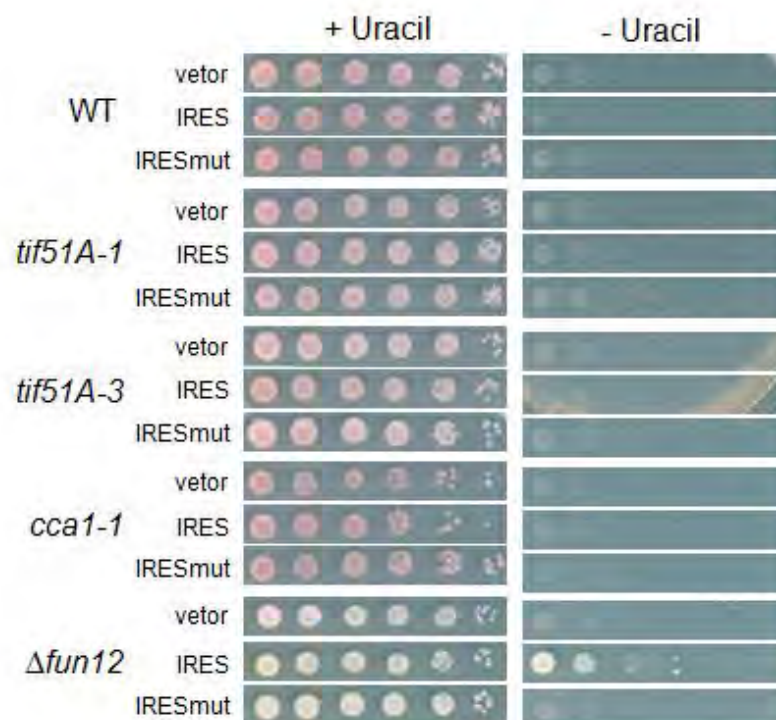
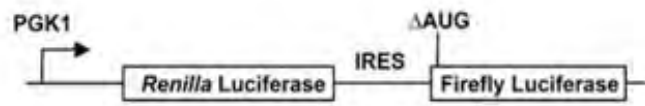
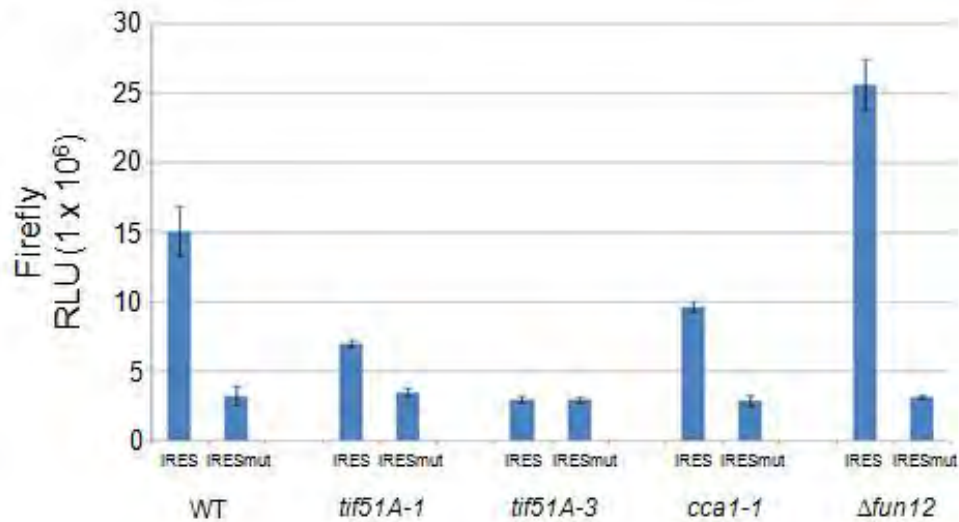


Figura 11. Análise da influência de eIF5A no processo de tradução mediado pela IRES do vírus CrPV, utilizando repórter *URA3*. A. Ilustração do gene repórter dicistrônico utilizado no ensaio. B. Foram realizadas diluições seriadas das linhagens selvagem, *tif51A-1*, *tif51A-3*, *cca1-1* e $\Delta fun12$, transformadas com plasmídeos contendo os genes repórteres *LEU2* e *URA3* e a IRES na região intergênica (IRES) ou sua forma mutada (IRESmut) ou com o vetor vazio (vetor), que não possui o repórter dicistrônico. As culturas diluídas foram incubadas em SC-leu e SC-leu-ura suplementados com $CuSO_4$ na temperaturas de 25°C.

A



B



C

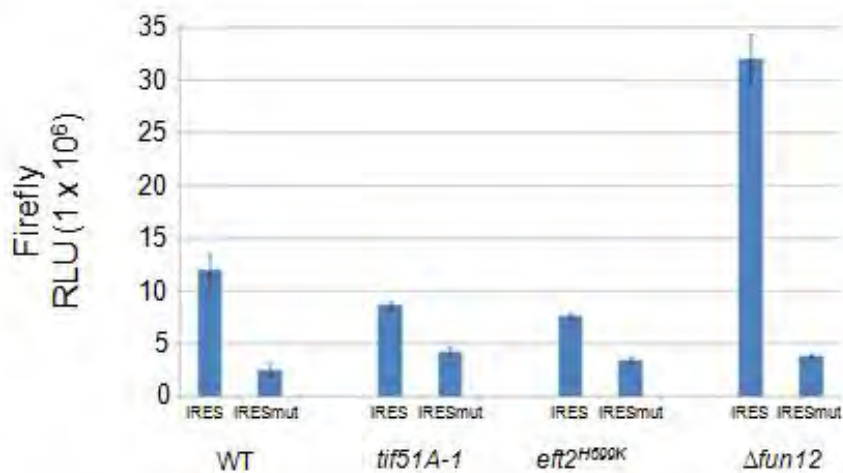


Figura 12. Avaliação dos níveis de tradução mediada pela IRES do vírus CrPV em mutantes de eIF5A, utilizando repórter de luciferase. **A.** Ilustração do gene repórter dicistrônico utilizado neste ensaio. **B.** Quantificação dos níveis de luminescência gerada pela atividade da IRES nas linhagens selvagem, *tif51A-1*, *tif51A-3*, *cca1-1* e $\Delta fun12$ transformadas com os repórteres contendo os genes codificadores de luciferase de *Renilla* e de vaga-lume e a IRES do vírus CrPV na região intergênica (IRES) ou sua forma mutada (IRESmut). **C.** Mesmo experimento descrito em B, mas utilizando as linhagens selvagem, *tif51A-1*, *eft2^{H699K}* e $\Delta fun12$.

5.6. Estudos de interação genética entre eIF5A e eEF2, utilizando os mutantes *tif51A*^{K56A} e *tif51A*^{Q22H/L93F}

Os mutantes de eIF5A utilizados até o momento neste estudo apresentam fenótipo de sensibilidade a temperatura relacionado à degradação de eIF5A na temperatura não permissiva. Dois novos mutantes de eIF5A, *tif51A*^{K56A} e *tif51A*^{Q22H/L93F}, foram obtidos e descritos em nosso laboratório. Estes alelos diferem dos utilizados anteriormente, pois, apesar de apresentarem fenótipos de sensibilidade a temperatura, não apresentam degradação de eIF5A mutada quando cultivados na temperatura não-permissiva (Dias e cols., 2008). A substituição K56A presente no alelo *tif51A*^{K56A} está localizada na alça de hipusinação, no domínio N-terminal de eIF5A, enquanto o mutante *tif51A*^{Q22H/L93F} apresenta substituições tanto no domínio N-terminal como no C-terminal, conforme ilustrado na Figura 13A.

Assim, com o objetivo de ampliar a caracterização desses novos mutantes, verificou-se a possibilidade de complementação cruzada entre os alelos *tif51A*^{K56A} e *tif51A*^{Q22H/L93F}. Para isso, a linhagem selvagem (VZL837) foi transformada com o vetor pRS314 (pSV58) e as linhagens *tif51A*^{K56A} (VZL822) e *tif51A*^{Q22H/L93F} (VZL821) foram transformadas com o vetor pRS314 (pSV58) ou com as construções pVZ708 (*tif51A*^{Q22H/L93F}/TRP1/CEN) e pVZ734 (*tif51A*^{K56A}/LEU2/CEN), respectivamente. Em seguida, diluições seriadas dessas linhagens foram cultivadas em meio SC-leu-trp nas temperaturas de 25°C e 38°C. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 13B. As linhagens que combinam os alelos *tif51A*^{K56A} e *tif51A*^{Q22H/L93F} apresentaram um fenótipo de sensibilidade a temperatura tão severo quanto as linhagens que possuem apenas o alelo *tif51A*^{K56A} ou *tif51A*^{Q22H/L93F}, indicando que não há complementação entre estes alelos.

Como apresentado no item 5.1 deste trabalho, o mutante *tif51A*-3 e o alelo dominante negativo de eEF2, *eft2*^{H699K}, apresentam uma interação genética sintética. Assim, para analisar o efeito da combinação do alelo *eft2*^{H699K} com os mutantes estáveis de eIF5A, as linhagens selvagem (VZL837), *tif51A*^{K56A} (VZL822) e *tif51A*^{Q22H/L93F} (VZL821) foram transformadas com o plasmídeo pRS425 (pSV64) ou com a construção pVZ1104 (*eft2*^{H699K}/LEU2/2 μ). Estas linhagens foram então submetidas a diluições seriadas e cultivadas em meio SC-leu nas temperaturas de

25°C, 35°C e 38°C. Como apresentado na Figura 14A, a superexpressão do alelo *eft2*^{H699K} na linhagem *tif51A*^{K56A} apresentou um fenótipo de crescimento mais severo do que a linhagem que possui apenas o vetor, enquanto o mutante *tif51A*^{Q22H/L93F} contendo *eft2*^{H699K} não apresentou alterações no crescimento celular. O resultado obtido para o mutante *tif51A*^{K56A} é semelhante ao observado anteriormente para o alelo *tif51A*-3.

Ainda com o objetivo de ampliar os estudos de interação genética entre *TIF51A* e *EFT2*, foi avaliado o efeito da superexpressão de *EFT2* nos mutantes *tif51A*^{K56A} e *tif51A*^{Q22H/L93F}. Para tanto, as linhagens selvagem (VZL837), *tif51A*^{K56A} (VZL987) e *tif51A*^{Q22H/L93F} (VZL821) foram transformadas com o vetor pRS426 (pSV65) ou com a construção pSV262 (*EFT2/URA3/2μ*). O gene *PKC1* foi identificado anteriormente em nosso laboratório como um supressor em alto número de cópias do fenótipo de sensibilidade a temperatura do mutante *tif51A*-1 (Zanelli e Valentini, 2005). Uma vez que essa supressão não apresentou uma relação de especificidade alélica com os mutantes de *elF5A* testados, *PKC1* foi utilizado como controle de supressão fenotípica neste experimento. Assim, as linhagens *tif51A*^{K56A} (VZL987) e *tif51A*^{Q22H/L93F} (VZL821) foram transformadas com o plasmídeo contendo *PKC1* (pSV181, *PKC1/URA3/2μ*), submetidas a diluições seriadas e cultivadas em meio SC-ura nas temperaturas de 25°C e 38°C.

Conforme pode ser observado na Figura 14B, a superexpressão de *EFT2* foi capaz de suprimir parcialmente o fenótipo de sensibilidade a temperatura apresentado pelo mutante *tif51A*^{K56A}. Curiosamente, o mutante *tif51A*^{Q22H/L93F} expressando *EFT2* em alto número de cópias apresentou um defeito de crescimento mais severo do que o observado para a mesma linhagem contendo apenas o vetor vazio.

Ainda, foi analisada a morfologia celular dos mutantes estáveis de *elF5A* na presença ou ausência de *EFT2* em alto número de cópias. Para isso, as linhagens selvagem (VZL837), *tif51A*^{K56A} (VZL987) e *tif51A*^{Q22H/L93F} (VZL821) foram transformadas com o vetor pRS426 (pSV65) ou com a construção pSV262 (*EFT2/URA3/2μ*). Essas linhagens foram então cultivadas a 25°C em meio SC-ura até atingirem D.O._{600nm}=0,4, incubadas a 38°C durante 2 h e, por fim, visualizadas através de microscopia de contraste diferencial de fase (DIC). Imagens representativas das análises de microscopia estão apresentadas na Figura 15A. É possível observar um aumento de tamanho celular significativo para a linhagem *tif51A*^{K56A}, transformada apenas com o vetor vazio, quando cultivada na temperatura não-permissiva, em relação à linhagem

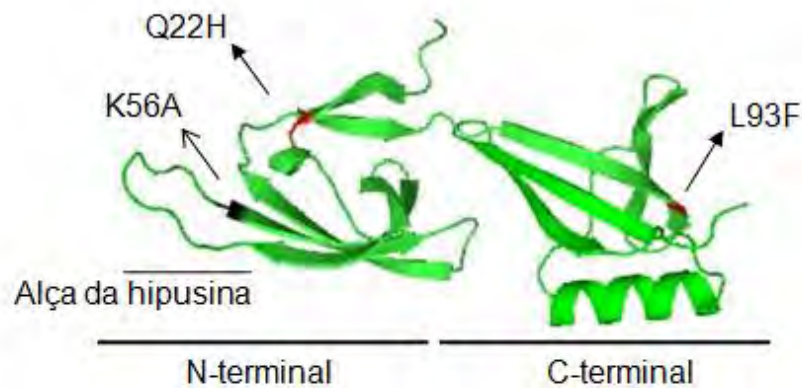
selvagem. Essa alteração de morfologia celular é revertida pela presença de *EFT2* em alto número de cópias, o que está de acordo com os dados de crescimento celular observados. Por outro lado, a linhagem *tif51A*^{Q22H/L93F} contendo apenas o vetor vazio não apresentou alterações de morfologia celular nas condições analisadas, quando comparada à linhagem selvagem. Curiosamente, a superexpressão de *EFT2* provocou um considerável aumento no tamanho celular desse mutante, mesmo na temperatura permissiva. Mais uma vez, estes dados estão de acordo com o observado nas análises de crescimento celular e indicam que a superexpressão de eEF2 provoca um efeito deletério no mutante *tif51A*^{Q22H/L93F}. Estes resultados indicam a existência de especificidade alélica na interação entre *TIF51A* e *EFT2*.

Para analisar de forma quantitativa as alterações de tamanho e morfologia celular observadas através de microscopia, fez-se uso da citometria de fluxo. Assim, os parâmetros físicos avaliados foram espalhamento de luz lateral (SSC - "side light scatter"), que reflete granulosidade, e espalhamento de luz frontal (FSC - "forward light scatter"), que reflete o tamanho celular. Esta análise foi realizada com as linhagens selvagem (VZL837), *tif51A*^{K56A} (VZL987) e *tif51A*^{Q22H/L93F} (VZL821) transformadas com o vetor pRS426 (pSV65) ou com a construção pSV262 (*EFT2/URA3/2μ*). Essas linhagens foram cultivadas a 25°C em meio SC-ura até D.O._{600nm}=0,4, transferidas para 38°C durante 3 h e, por fim, analisadas em citômetro de fluxo. Os resultados obtidos foram representados graficamente como granulosidade (SSC) em função de tamanho celular (FSC) e podem ser observados na Figura 15B. O quadrante ("gate") colorido em vermelho foi determinado com base na população predominante para a linhagem selvagem, cultivada na temperatura permissiva ou não-permissiva, e representa as populações celulares consideradas nas análises. Assim, é possível observar que a linhagem *tif51A*^{K56A}, contendo apenas o vetor vazio, apresenta aumento tanto de granulosidade como de tamanho celular, em relação à selvagem, sendo que essas alterações se acentuam na temperatura não-permissiva. Conforme observado anteriormente, a superexpressão de eEF2 na linhagem *tif51A*^{K56A} é capaz de reverter as alterações morfológicas observadas para este mutante, fazendo com que este apresente níveis de granulosidade e tamanho celular semelhantes aos obtidos para a linhagem selvagem. Por outro lado, o mutante *tif51A*^{Q22H/L93F} contendo apenas o vetor vazio, apresenta níveis de granulosidade e tamanho celular muito próximos dos obtidos para a linhagem selvagem, enquanto a superexpressão de *EFT2* neste mutante

provoca um aumento significativo dos níveis de granulosidade e tamanho celular, tanto na temperatura permissiva como na não-permissiva.

Com o objetivo de avaliar o impacto da superexpressão de *EFT2* na síntese proteica dos mutantes estáveis de *eIF5A*, foram analisados os perfis polissomais das linhagens selvagem (VZL837), *tif51A*^{K56A} (VZL822) e *tif51A*^{Q22H/L93F} (VZL821) contendo apenas o vetor vazio pRS426 (pSV65) ou das linhagens mutantes *tif51A*^{K56A} (VZL987) e *tif51A*^{Q22H/L93F} (VZL821) contendo *EFT2* em alto número de cópias (pSV262, *EFT2/URA3/2μ*). Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 16. Conforme observado recentemente para outros mutantes de *TIF51A* (Gregio e cols., 2009; Saini e cols., 2009), os perfis polissomais dos mutantes *tif51A*^{K56A} e *tif51A*^{Q22H/L93F} apresentaram redução do pico de 80S e estabilização da fração polissomal, em relação à linhagem selvagem. A quantificação das frações polissomais em relação ao monossomo (P/M) para os mutantes *tif51A*^{K56A} e *tif51A*^{Q22H/L93F} foi bastante semelhante, P/M=2,2±0,02 e P/M=2,0±0,2, respectivamente e indica que estes mutantes apresentam defeitos na elongação da tradução. Ainda, é possível observar que a superexpressão de *EFT2* suprime as alterações de perfil polissomal apresentadas pelo mutante *tif51A*^{K56A}, que apresentou uma relação polissomos/monossomo (P/M=1,6±0,1) próxima à obtida para a linhagem selvagem, indicando que a supressão parcial do fenótipo de sensibilidade a temperatura apresentado por este mutante está relacionada com o restabelecimento da tradução. No entanto, foi observado um agravamento do defeito de perfil polissomal apresentado pelo mutante *tif51A*^{Q22H/L93F} na presença de *EFT2* em alto número de cópias, que passou a apresentar aumento da fração 80S e redução da fração polissomal (P/M=1,4±0,07). Estes resultados e os anteriores aqui apresentados são discutidos a seguir.

A



B

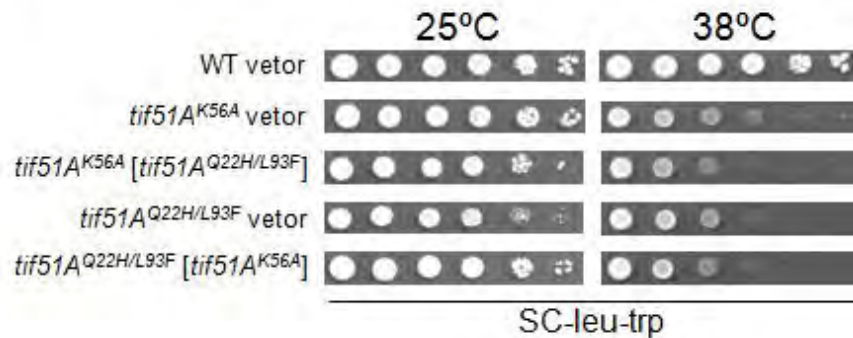


Figura 13. Caracterização dos dois mutantes de eIF5A que produzem a proteína estável na temperatura não permissiva. A. Localização dos resíduos mutados de eIF5A. Os domínios N-terminal e C-terminal, bem como a alça que contém a hipusina, estão indicados por barras horizontais no modelo da estrutura tridimensional de eIF5A de *S. cerevisiae* (PMDB PM0075091). A localização dos resíduos mutados em eIF5A^{K56A} e eIF5A^{Q22H/L93F} estão indicados em preto e vermelho, respectivamente. **(B)** Diluições seriadas das linhagens selvagem (VZL837) contendo o vetor vazio pRS314 (pSV58) e das linhagens *tif51A*^{K56A} (VZL822) e *tif51A*^{Q22H/L93F} (VZL821) contendo o vetor vazio ou *tif51A*^{Q22H/L93F} (pVZ708) e *tif51A*^{K56A} (pVZ734), respectivamente, foram inoculadas em meio SC-leu ou SC-trp e incubadas nas temperaturas permissiva e não permissiva.

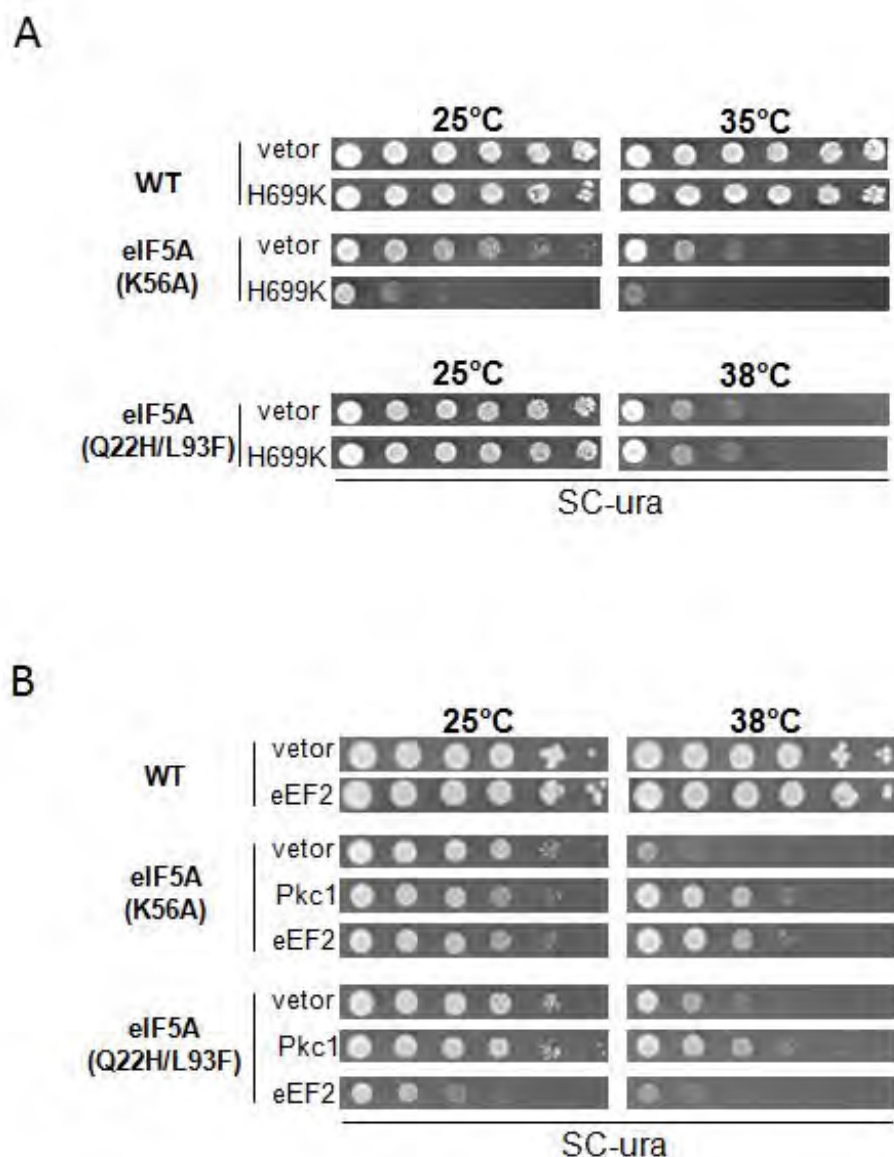
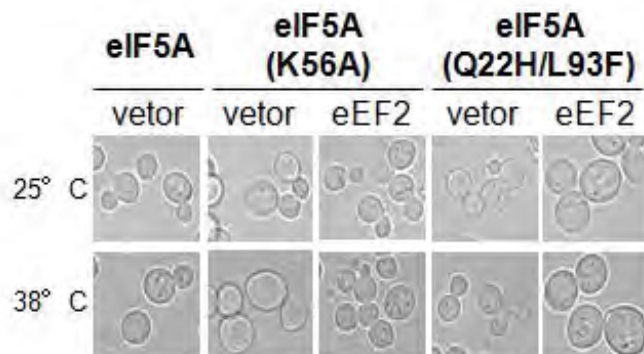


Figura 14. Análises de interação genética entre *TIF51A* (eIF5A) e *EFT2* (eEF2).
A. As linhagens selvagem (VZL837), *tif51A^{K56A}* (VZL822) e *tif51A^{Q22H/L93F}* (VZL821) foram transformadas com o plasmídeo pRS425 (pSV64) ou com a construção pVZ1104 (*eft2^{H699K}/LEU2/2μ*), submetidas a diluições seriadas 1:10 e cultivadas em meio SC-ura nas temperaturas de 25°C, 35°C e 38°C. **B.** As mesmas linhagens descritas acima foram transformadas com o vetor pRS426 (pSV65) ou com a construção pSV262 (*EFT2/URA3/2μ*), submetidas à diluição seriada 1:10 e cultivadas em meio SC-ura nas temperaturas de 25°C e 38°C. *PKC1* foi utilizado como um controle de supressão fenotípica.

A



B

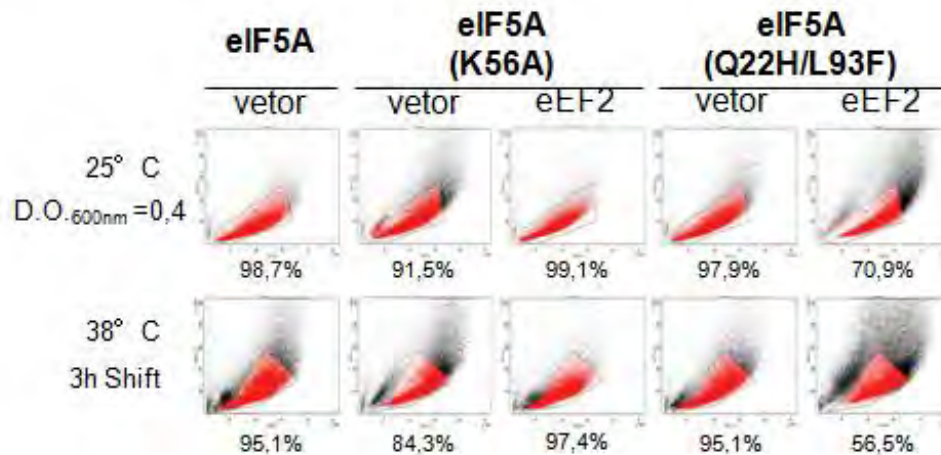


Figura 15. Análises de morfologia celular dos mutantes *tif51A*^{K56A} e *tif51A*^{Q22H/L93F}. (A) As linhagens selvagem (VZL837), *tif51A*^{K56A} (VZL822) e *tif51A*^{Q22H/L93F} (VZL821) contendo o vetor pRS426 (pSV65) ou a construção pSV262 (*EFT2/URA3/2μ*) foram cultivadas a 25°C em meio SC-ura até D.O._{600nm}=0,4, transferidas para 38°C durante 3 h e analisadas através de microscopia de contraste diferencial de fase (DIC). (B) As mesmas linhagens foram analisadas em citômetro de fluxo. Os resultados obtidos estão representados graficamente como granulidade (SSC, eixo Y) em função de tamanho celular (FSC, eixo X).

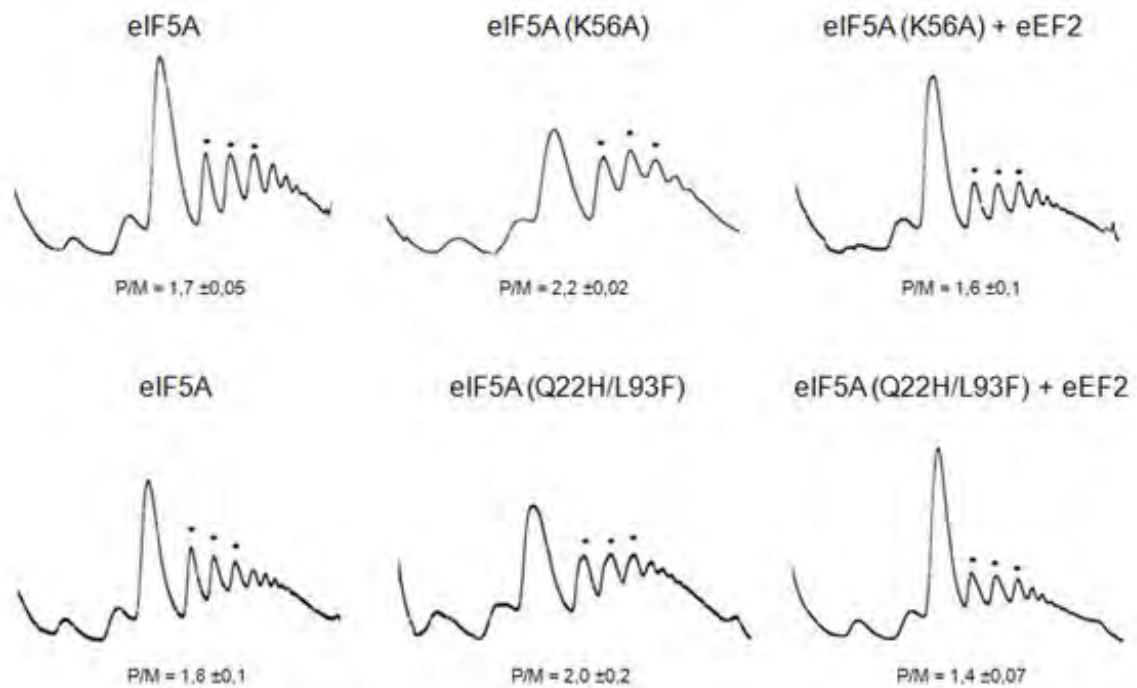


Figura 16. Análise de perfil polissomal dos mutantes estáveis *tif51A*^{K56A} e *tif51A*^{Q22H/L93F} na ausência e na presença de *EFT2* em alto número de cópias. Extratos celulares das linhagens selvagem (VZL837), *tif51A*^{K56A} (VZL822) e *tif51A*^{Q22H/L93F} (VZL821) contendo apenas o vetor vazio pRS426 (pSV65) ou das linhagens mutantes *tif51A*^{K56A} (VZL822) e *tif51A*^{Q22H/L93F} (VZL821) contendo *EFT2* em alto número de cópias (pSV262, *EFT2/URA3/2μ*) foram fracionados por centrifugação em gradiente de sacarose. Os gráficos representam a leitura de absorbância a 254nm dos gradientes. A quantificação das frações polissomais em relação ao monossomo está representada por P/M.

6. DISCUSSÃO

Em 1978, eIF5A foi identificada como um fator de início de tradução devido a sua capacidade de estimular a formação da primeira ligação peptídica e ao longo de mais de trinta anos de estudo essa proteína foi relacionada com diversas etapas do metabolismo celular, como transporte nucleocitoplasmático, decaimento de mRNA, proliferação celular e formação de citoesqueleto (Ruhl e cols., 1993; Schatz e cols., 1998; Singh e cols., 1998; Lee e cols., 1999; Lipowsky e cols., 2000; Hofmann e cols., 2001). No entanto, a hipótese de que essas funções estejam relacionadas direta ou indiretamente com uma função de eIF5A na tradução nunca foi descartada.

Em 2006, surge um novo cenário, no qual eIF5A passa a ser relacionado com a etapa de alongação da tradução ao invés de início (Jao e Chen, 2006; Zanelli e cols., 2006). Para esclarecer melhor o papel que eIF5A desempenha na tradução, nosso laboratório tem se utilizado de análises de interação genética e de perfil polissomal, com o objetivo de estudar o papel de eIF5A na síntese proteica.

Neste trabalho, foram obtidas linhagens de levedura que combinam o mutante de eIF5A *tif51A-3* e mutantes de fatores que atuam em etapas distintas do início da tradução e também do fator de alongação da tradução eEF2. Os mutantes duplos obtidos foram utilizados em análises de interação genética e de perfil polissomal com o intuito de melhor definir em que etapa da tradução eIF5A atua.

De maneira interessante, a combinação de mutações em eIF5A com eIF4E e eIF5B levou à intensificação do fenótipo de sensibilidade a temperatura e de crescimento lento ("slow growth"), respectivamente, indicando a existência de interação genética entre *TIF51A+CDC33* (eIF4E) e *TIF51A+FUN12* (eIF5B). O mesmo não foi observado para o mutante de eIF3. Tendo em vista que eIF4E é uma proteína ligante de "cap", envolvida com o reconhecimento do mRNA pelo complexo ribossomal 43S, uma das primeiras etapas do início da tradução, e que eIF5B é o último fator a atuar no início da tradução, estimulando o acoplamento da subunidade 60S, é improvável que eIF5A apresente uma relação funcional direta com estes fatores, que atuam em etapas tão distintas no início da tradução. Diante disso, é possível concluir que as interações genéticas observadas para esses mutantes refletem um resultado pouco específico, indicando, apenas, que eIF5A está de fato envolvido com o processo de síntese

proteica. Por outro lado, as análises de perfil polissomal revelaram resultados bastante interessantes. Foi observado que o perfil polissomal do mutante *tif51A-3*, quando cultivado na temperatura não-permissiva, apresenta uma diminuição da fração 80S e um acúmulo de frações polissomais, o que difere completamente dos perfis observados para os mutantes de início de tradução *cdc33-42* (eIF4E), *pvt1-1* (eIF3) e *fun12::kanMX4* (eIF5B), que apresentaram aumento significativo da fração 80S e redução da fração polissomal (“polysome run-off”). Já as linhagens que combinam mutações em eIF5A e nos fatores eIF4E, eIF3 e eIF5B apresentaram uma atenuação do defeito característico de mutantes de início de tradução (“polysome run-off”), indicando que eIF5A e os fatores canônicos de início de tradução analisados atuam em etapas distintas da síntese proteica.

Dando continuidade a essas análises, foi gerada uma linhagem que combina o mutante *tif51A-3* com o alelo dominante negativo de eEF2, *eft2^{H699K}*. O resíduo de histidina na posição 699 de eEF2 é alvo da modificação pós-traducional que gera uma diftamida. Este alelo leva à produção de uma forma afuncional de eEF2 que possui um efeito de dominante negativo (Ortiz e Kinzy, 2005). A linhagem que combina os alelos *tif51A-3* e *eft2^{H699K}* também apresentou um fenótipo de sensibilidade a temperatura mais severo do que as linhagens que possuem apenas o alelo *tif51A-3* ou *eft2^{H699K}*. É importante ressaltar que a redução do crescimento apresentada pelo duplo mutante *tif51A-3 eft2^{H699K}* foi consideravelmente mais intensa do que a observada para as linhagens mutantes de início de tradução anteriormente analisadas. De maneira interessante, os perfis polissomais de *tif51A-3* e *eft2^{H699K}* separadamente apresentaram uma grande semelhança, o que evidencia o envolvimento de eIF5A com a elongação da tradução. Finalmente, o perfil polissomal do duplo mutante *tif51A-3 eft2^{H699K}* mostrou-se bastante semelhante ao observado para as linhagens que possuem apenas o alelo *tif51A-3* ou *eft2^{H699K}*, o que sugere uma relação funcional próxima entre eIF5A e eEF2. Em concordância com os dados aqui apresentados, resultados recentes de perfil polissomal utilizando diferentes mutantes de eIF5A em *S. cerevisiae* também mostraram acúmulo de polissomos na temperatura não permissiva (Saini e cols., 2009). Ainda, foi observado que o perfil polissomal de mutantes de eIF5A é semelhante ao de linhagens selvagens tratadas com sordarina, um inibidor de eEF2, reforçando a ideia de correlação funcional entre eIF5A e eEF2 (Saini e cols., 2009).

Para confirmar que os fenótipos descritos acima são resultados de um efeito direto de eIF5A na tradução, foram determinados os níveis de síntese proteica total das linhagens selvagem e *tif51A-3*, na temperatura não-permissiva. O mutante *tif51A-3* apresentou uma redução de 50% na incorporação total de aminoácidos após 3 h de incubação na temperatura não-permissiva, o que está diretamente relacionado com a depleção de eIF5A. Este resultado também reforça o envolvimento de eIF5A com síntese proteica e está de acordo com dados recentes obtidos utilizando diferentes mutantes condicionais de eIF5A (Dias e cols., 2008; Saini e cols., 2009). Por outro lado, os resultados obtidos em nosso laboratório contrariam o dado inicial de caracterização de eIF5A de que a depleção desse fator causa apenas uma pequena redução na taxa de síntese proteica não sendo, portanto, considerado um fator essencial para a síntese proteica geral (Benne e Hershey, 1978; Kang e Hershey, 1994). No entanto, em comunicação pessoal, o Dr. John Hershey (University of California, Davis, EUA) apresentou dados mais recentes de seu laboratório mostrando que a depleção de eIF5A, em *S. cerevisiae*, provoca sim uma inibição substancial da síntese proteica. Além disso, o grupo do Dr. Hershey observou que o uso de meio de cultura mínimo depletado de metionina, utilizado nos ensaios iniciais de caracterização de eIF5A (Kang and Hershey, 1994), por si só pode resultar em inibição da síntese proteica e distorcer os efeitos da depleção de eIF5A. Ainda, foi observado que a adição de eIF5A purificada a lisados de *S. cerevisiae* depletados desse fator é capaz de estimular a síntese proteica *in vitro* (Hershey e cols., dados não publicados).

Como as análises de perfil polissomal descritas acima sugerem uma função para eIF5A na etapa de alongação da síntese proteica, foi determinado o tempo de trânsito ribossomal, que reflete o tempo de alongação e terminação de uma cadeia polipeptídica nascente. O tempo de trânsito ribossomal médio para a linhagem selvagem foi de 66 s, enquanto o tempo para o mutante *tif51A-3* foi de aproximadamente 96 s. Deste modo, a redução da taxa de síntese proteica total observada para o mutante *tif51A-3* apresenta uma correlação com o aumento do tempo de trânsito ribossomal. Estes resultados estão de acordo com dados da literatura que mostram uma correlação entre diminuição da síntese proteica total e aumento do tempo de trânsito ribossomal semelhante à observada em nosso laboratório (Shenton e cols., 2006; Sivan e cols., 2007). Além disso, este experimento mostra que a etapa de alongação da tradução é de fato alterada na linhagem *tif51A-3*, o que está de acordo

com os defeitos observados nos ensaios de síntese proteica e de perfil polissomal para o mutante de eIF5A. De maneira interessante, foi observado um atraso significativo no tempo de trânsito ribossomal de outro mutante de eIF5A (Saini e cols., 2009), o que reforça as evidências do envolvimento de eIF5A com a etapa de alongação da tradução.

Ainda com o objetivo de avaliar o envolvimento de eIF5A com a etapa de alongação da síntese proteica, foi utilizada a IRES do vírus CrPV, que é capaz de iniciar a tradução recrutando diretamente as subunidades ribossomais 40S e 60S, sendo independente dos fatores canônicos de início da síntese proteica. A tradução mediada por IRES foi avaliada, inicialmente, através da utilização do repórter *URA3*, cuja expressão é dependente da IRES. Neste ensaio, apenas a linhagem nocaute para *FUN12* apresentou ativação da tradução mediada por CrPV-IRES. Este resultado está de acordo com dados da literatura e confirma que defeitos em fatores de início de tradução em levedura resultam em aumento da tradução mediada por IRES, devido à competição por subunidades 40S entre tradução mediada por “cap” versus mediada por CrPV-IRES (Deniz e cols., 2009). Os resultados obtidos para os mutantes *tif51A-1* e *tif51A-3* são muito diferentes dos observados para diferentes mutantes de início de tradução já descritos (Deniz e cols., 2009), reforçando o envolvimento de eIF5A com a alongação.

Além disso, também foram utilizados repórteres discistrônicos de luciferase contendo a IRES do vírus CrPV na região intergênica. Dessa vez, foram testadas as linhagens selvagem, *tif51A-1*, *tif51A-3*, *cca1-1* e o dominante negativo de eEF2, *eft2^{H699K}* e foi possível observar uma diminuição da tradução mediada por IRES em todos os mutantes testados.

O uso de repórteres contendo a IRES do vírus CrPV na região intergênica mostrou-se bastante útil neste estudo, uma vez que os mutantes que apresentam defeitos no início ($\Delta fun12$) ou na alongação da tradução (*cca1-1* e *eft2^{H699K}*) apresentaram resultados opostos. De maneira interessante, a tradução mediada pela IRES de CrPV parece ser mais afetada por defeitos na etapa de alongação. Assim, a diminuição observada para a atividade da IRES em mutantes de alongação pode estar relacionada com a necessidade do comprometimento da tradução dependente de “cap” para que as IRES sejam capazes de recrutar ribossomos eficientemente, uma vez que a tradução mediada por esses elementos é privilegiada em linhagens que apresentam defeitos no

início da tradução, como a $\Delta fun12$. Além disso, tendo em vista que a IRES do CrPV pode se associar diretamente com 80S *in vivo*, pode haver uma competição entre os mRNAs cuja a tradução é dependente de “cap” e aqueles que possuem a sequência IRES de CrPV. Assim, com a elongação da tradução inibida, há uma diminuição de 80S livre, o que pode prejudicar a elongação dos mensageiros que possuem IRES.

Ainda, os resultados obtidos mostram que os níveis de tradução mediada por CrPV-IRES estão correlacionados com os fenótipos de sensibilidade a temperatura apresentados pelos mutantes de eIF5A, uma vez que a linhagem *tif51A-3*, que possui fenótipos de crescimentos mais severos, apresentou níveis basais de tradução mediada por CrPV-IRES. Por outro lado, o defeito do mutante de eEF2 é mais severo do que o observado para a linhagem *cca1-1*, porém sem correlação com os fenótipos de sensibilidade a temperatura. Estes resultados podem refletir defeitos específicos que os mutantes *cca1-1* e *eft2^{H699K}* determinam. Curiosamente, o mutante *eft2^{H699K}* apresentou níveis de tradução mediada por IRES semelhantes aos obtidos para o mutante *tif51A-1*, reforçando a ideia da existência de uma relação funcional entre eIF5A e eEF2.

Deve ser ressaltado que os laboratórios do Dr. John Hershey (University of California, Davis, EUA) e do Dr. Eugene Gerner (University of Arizona, Tucson, EUA) possuem dados recentes e não publicados relacionando eIF5A com início da tradução (comunicação pessoal). Assim, apesar das publicações recentes, de nosso laboratório e de outros, propondo uma função para eIF5A na elongação da síntese proteica (Greggio e cols., 2009; Saini e cols., 2009; Patel e cols. 2009), a ideia inicial de envolvimento de eIF5A com início da tradução continua em questão.

No estudo da correlação funcional entre eIF5A e eEF2, foram importantes os mutantes *tif51A^{K56A}* e *tif51A^{Q22H/L93F}*, que, ao contrário dos mutantes utilizados anteriormente, produzem eIF5A estável na temperatura restritiva de crescimento (Dias e cols., 2008).

Dando continuidade à caracterização desses novos alelos, foi analisada a existência de complementação cruzada entre *tif51A^{K56A}* e *tif51A^{Q22H/L93F}*. No entanto, as linhagens que combinam ambos os mutantes *tif51A^{K56A}* e *tif51A^{Q22H/L93F}* não mostraram complementação cruzada. Este resultado indica que as substituições K56A e Q22H/L93F provocam alterações em uma mesma via funcional de eIF5A, sendo que um alelo não é capaz de compensar o defeito apresentado pelo outro.

Como havia sido observado anteriormente um fenótipo sintético doente (“synthetic sick phenotype”) entre os alelos *tif51A-3* e *eft2^{H699K}*, o mesmo fenótipo foi avaliado nas linhagens *tif51A^{K56A}* e *tif51A^{Q22H/L93F}*. Assim como observado para *tif51A-3*, o mutante *tif51A^{K56A}* apresentou um fenótipo sintético doente na presença de *eft2^{H699K}*, enquanto para o mutante *tif51A^{Q22H/L93F}* não foram observadas alterações no crescimento celular.

Ainda com o objetivo de ampliar os estudos da interação entre *TIF51A* e *EFT2*, foi avaliado o efeito da superexpressão de *EFT2* nos mutantes *tif51A^{K56A}* e *tif51A^{Q22H/L93F}*. Foi observado que *EFT2* em alto número de cópias na linhagem *tif51A^{K56A}* suprimiu parcialmente o defeito de crescimento apresentado por este mutante. Curiosamente, a superexpressão de *EFT2* no mutante *tif51A^{Q22H/L93F}* apresentou um efeito deletério. Efeitos semelhantes foram também observados na morfologia celular desses mutantes. Enquanto a superexpressão de *EFT2* foi capaz de reverter o aumento no tamanho celular apresentado pela linhagem *tif51A^{K56A}*, o mutante *tif51A^{Q22H/L93F}* apresentou um aumento de tamanho celular bastante pronunciado, na presença de *EFT2* em alto número de cópias. Esses dados estão de acordo com o observado nas análises de crescimento celular e indicam que a superexpressão de *eEF2* provoca um efeito deletério no mutante *tif51A^{Q22H/L93F}*.

Os perfis polissomais dos mutantes *tif51A^{K56A}* e *tif51A^{Q22H/L93F}* também foram analisados tanto na presença como na ausência de *EFT2* em alto número de cópias, com o objetivo de avaliar efeitos na síntese proteica. Assim como outros mutantes descritos na literatura (Greggio e cols., 2009; Saini e cols., 2009), os mutantes estáveis também apresentaram perfis polissomais característicos de mutantes envolvidos na etapa de alongação da tradução, com redução da fração 80S e estabilização da fração polissomal. As análises de perfil polissomal na presença de *EFT2* em alto número de cópias, por sua vez, mostraram que a superexpressão de *EFT2* na linhagem *tif51A^{K56A}* tornou os padrões de perfil polissomal, apresentados pelo mutante, semelhantes aos da linhagem selvagem. Curiosamente, a linhagem *tif51A^{Q22H/L93F}* apresentou defeitos característicos de mutantes envolvidos com o início da tradução.

Os mutantes *tif51A^{K56A}* e *tif51A^{Q22H/L93F}* possuem substituições em aminoácidos localizados em regiões bastante distintas. O resíduo de lisina da posição 56 é o último aminoácido da alça de hipusinação. Para analisar se a substituição K56A influencia essa modificação pós-traducional, que é essencial para a atividade de *eIF5A*, tanto o mutante *tif51A^{K56A}* como *tif51A^{Q22H/L93F}* foram submetidos à ensaios de hipusinação *in*

vitro. Assim, foi possível observar que apenas o mutante *tif51A*^{K56A} apresenta níveis reduzidos de hipusinação, o que pode estar relacionado ao fenótipo de sensibilidade a temperatura apresentado por este mutante (Dias e cols., 2008). No entanto, é improvável que a supressão fenotípica provocada pela superexpressão de *EFT2* esteja diretamente relacionada com o defeito de hipusinação apresentado por este mutante. É possível que a substituição K56A determine outros defeitos em eIF5A, como por exemplo, perda de interação com parceiros físicos importantes para a função que eIF5A desempenha na síntese proteica. As substituições Q22H e L93F do mutante *tif51A*^{Q22H/L93F}, por sua vez, estão localizadas em regiões bastante expostas dos domínios amino e carboxi-terminal de eIF5A, respectivamente, e podem ser importantes para a interação com outras proteínas. Dados de copurificação realizados com os mutantes *tif51A*^{K56A} e *tif51A*^{Q22H/L93F} reforçam essa hipótese. Foi observado que ambos os mutantes estáveis perdem a interação com proteínas ribossômicas na temperatura não-permissiva. Curiosamente, quando esses mutantes foram utilizados em ensaios de copurificação na presença de RNase e EDTA, condição em que o ribossomo é desfeito, o mutante *tif51A*^{Q22H/L93F} mostrou-se capaz de manter a interação com eEF2, enquanto as linhagens selvagem e *tif51A*^{K56A} perderam a interação com esse fator de alongação nas condições analisadas (Camila A. O. Dias, dados não publicados). Esse resultado sugere que há uma possível interação física direta entre eIF5A e eEF2, dependente de interações estabelecidas durante o processo traducional e que são favorecidas na presença de eIF5A contendo as substituições Q22H/L93F. Deste modo, o efeito deletério provocado pela superexpressão de *EFT2* no mutante *tif51A*^{Q22H/L93F} pode estar relacionado à formação de um complexo bastante estável entre eIF5A e eEF2 que não é capaz de se desfazer, comprometendo as funções que esses fatores desempenham na síntese proteica. Análises da fluorescência de triptofano estão sendo realizadas para gerar curvas de ligação e possibilitar o cálculo da afinidade entre eIF5A e eEF2, *in vitro*, com o objetivo de esclarecer essa curiosa questão (Camila A. O. Dias, dados não publicados).

Estudos envolvendo o homólogo estrutural de eIF5A em bactérias, EF-P, podem auxiliar nas questões que envolvem o posicionamento de eIF5A no ribossomo e o mecanismo de ação deste fator. Foi publicada recentemente a estrutura de EF-P de *T. thermophilus* ligado ao ribossomo, na presença do fMet-tRNA_i e de uma sequência curta de mRNA. A estrutura deste complexo revelou a ligação de EF-P entre os sítios

ribossomais P (peptidil) e E (saída), de modo que um resíduo de arginina na posição 32 está localizado próximo ao centro peptidil-transferase do ribossomo, sugerindo um papel para EF-P no correto posicionamento do fMet-tRNA_i no sítio P, o que poderia se relacionar com o estímulo da formação da primeira ligação peptídica. Diante disso, os autores sugerem que a modificação pós-traducional hipusinação/lisilação pode promover uma aproximação entre eIF5A/EF-P e o centro peptidil-transferase do ribossomo e permitir o posicionamento adequado e a estabilização do fMet-tRNA_i/Met-tRNA_i^{Met} no sítio ribossomal P (Blaha e cols., 2009). No entanto, a bactéria *T. thermophilus* apresenta um resíduo de arginina na posição 32 correspondente à lisina da posição 34 de *E. coli* e ausência das enzimas YjeA e YjeK, o que implica na ausência de lisilação. De fato, apesar de o gene codificador de EF-P estar presente em todos os genomas de bactérias conhecidos (725 genomas), apenas 26,7% (194) parece possuir todos os requisitos para a modificação pós-traducional (lisina 34 de EF-P e presença de YjeA e YjeK). Dessa forma, por mais que a importância funcional da lisilação de EF-P tenha sido relatada *in vivo* para diferentes espécies de bactérias (Navarre e cols., 2010; Yanagisawa e cols., 2010), esta modificação não deve ser totalmente essencial para a função crítica de EF-P no ribossomo. Por outro lado, é possível que as bactérias que não possuam a modificação de EF-P apresentem uma adaptação da maquinaria de tradução, como alterações nas estruturas de rRNA. Ainda, estudos em *E. coli* reforçam a hipótese apresentada por Blaha e cols., 2009 e propõem que na ausência de EF-P, o sítio ribossomal P assume uma conformação intermediária P/I (forma intermediária entre P/P e P/E) que permite a ligação do fMet-tRNA_i. Essa conformação promove o correto posicionamento do códon iniciador no sítio P, mas não permite que a extremidade aminoacilada do fMet-tRNA_i alcance o centro peptidil-transferase do ribossomo. Isto pode ocorrer devido à ausência de tRNA no sítio ribossomal E ou de cadeia polipeptídica nascente posicionada no sítio P, durante a incorporação da metionina inicial. Assim, a ligação de EF-P entre os sítios ribossomais P e E pode estar relacionada com a estabilização da conformação P/P e o correto posicionamento do fMet-tRNA_i (Allen e cols., 2005).

Apesar da semelhança entre as sequências de aminoácidos e as modificações pós-traducionais de EF-P e eIF5A, algumas diferenças apresentadas por estes fatores merecem destaque. eIF5A, assim como os demais fatores de alongação da tradução, é abundante na célula, enquanto EF-P está presente em uma proporção próxima de 0,1

cópia por ribossomo, de maneira semelhante aos fatores envolvidos com o início da tradução (Blaha e cols., 2009). Além disso, EF-P foi relacionada, até o momento, apenas com a formação da primeira ligação peptídica (Glick e Ganoza, 1975; Blaha e cols., 2009). Por outro lado, dados recentes mostram que a depleção de eIF5A em levedura leva ao acúmulo de polissomos e a um aumento no tempo de trânsito ribossomal, relacionando eIF5A com a etapa de alongação da tradução e não apenas com a formação da primeira ligação peptídica (Greggio e cols., 2009; Saini e cols., 2009). Ainda, dados de interação genética e de copurificação sugerem que eIF5A interage funcionalmente com eEF2 na etapa de alongação da síntese proteica (Greggio e cols., 2009; Saini e cols., 2009, Camila A. O. Dias, dados não publicados).

Apesar da semelhança entre as estruturas cristalográficas e as modificações pós-traducionais de EF-P e eIF5A, não é possível afirmar que estes dois fatores apresentem uma relação funcional completamente conservada. É possível que tenham ocorrido divergências evolutivas entre estes dois fatores, as quais se refletem no posicionamento de EF-P e eIF5A no ribossomo e no papel que estes desempenham na síntese proteica. Diante disso, apesar de a região em que eIF5A se posiciona no ribossomo ainda não ter sido determinada, é possível que eIF5A, assim como EF-P, esteja relacionada com o posicionamento do tRNA no sítio P. É possível que em eucariotos essa função tenha se tornado essencial não apenas na primeira ligação peptídica, mas em todas as ligações seguintes, uma vez que eIF5A apresenta-se distribuída ao longo do polissomo em análises de perfil polissomal (Saini e cols., 2009) e que mutantes deste fator apresentam acúmulo de polissomos (Greggio e cols., 2009; Saini e cols., 2009).

Os resultados aqui apresentados evidenciam que eIF5A é um fator de alongação da tradução e levantam a hipótese de existência de relação funcional entre eIF5A e eEF2. No entanto, novos estudos são necessários no sentido de identificar o sítio de ligação de eIF5A ao ribossomo, permitindo assim a elucidação do mecanismo de ação de eIF5A na alongação da tradução.

7. CONCLUSÕES

- 7.1. As análises de perfil polissomal, tempo de trânsito ribossomal e de tradução independente de “cap” mediada pela IRES do vírus CrPV evidenciam a atuação de eIF5A na etapa de alongação da tradução.
- 7.2. A sensibilidade a inibidores de síntese proteica observada em mutantes de eIF5A não está relacionada à perda de interação com componentes da maquinaria de tradução.
- 7.3. Os dados de interação genética e perfil polissomal sugerem uma relação funcional próxima entre eIF5A e eEF2 na etapa de alongação da tradução.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKER, M.G. & LORSCH, J.R. Mechanism of ribosomal subunit joining during eukaryotic translation initiation. *Biochem Soc Trans* 36, 653–657; 2008.
- ALLEN, G.S., ZAVIALOV, A., GURSKY, R., EHRENBERG, M. & FRANK. The Cryo-EM Structure of a Translation Initiation Complex from *Escherichia coli*. *J. Cell* 121, 703, 2005.
- ALTMANN M. & TRACHSEL H. Altered mRNA cap recognition activity of initiation factor 4E in the yeast cell cycle division mutant *cdc33*. *Nucleic Acids Res.* 17, 5923-31, 1989.
- ANAND, M., CHAKRABURTTY, K., MARTON, M.J., HINNEBUSCH, A.G. & KINZY, T.G. Functional interactions between yeast translation eukaryotic elongation factor (eEF) 1A and eEF3. *J Biol Chem* 278, 6985-6991, 2003.
- ASANO, K., CLAYTON, J., SHALEV, A. & HINNEBUSCH, A.G. A multifactor complex of eukaryotic initiation factors, eIF1, eIF2, eIF3, eIF5, and initiator tRNA(Met) is an important translation initiation intermediate in vivo. *Genes Dev* 14, 2534-2546, 2000.
- AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A. & STRUHL, K. (Ed.) *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Wiley, 2004.
- BARANICK, B.T., LEMP, N.A., NAGASHIMA, J., HIRAOKA, K., KASAHARA, N. & LOGG, C.R. Splicing mediates the activity of four putative cellular internal ribosome entry sites. *PNAS* 105 (12), 4733-4738, 2008.
- BAILLY, M. & CRÉCY-LAGARD, V. Predicting the pathway involved in posttranslational modification of Elongation factor P in a subset of bacterial species. *Biology Direct* 5 (3), 2010.
- BEELMAN, C.A. & PARKER, R. Differential effects of translational inhibition in cis and in trans on the decay of the unstable yeast MFA2 mRNA. *J Biol Chem* 269, 9687-9692, 1994.
- BENNE, R., BROWN-LUEDI, M.L. & HERSHEY, J.W. Purification and characterization of protein synthesis initiation factors eIF-1, eIF-4C, eIF-4D, and eIF-5 from rabbit reticulocytes. *J Biol Chem* 253, 3070-3077, 1978.

- BENNE, R. & HERSHEY, J.W. The mechanism of action of protein synthesis initiation factors from rabbit reticulocytes. *J Biol Chem* 253, 3078-3087, 1978.
- BEVEC, D., KLIER, H., HOLTER, W., TSCHACHLER, E., VALENT, P., LOTTSPREICH, F., BAUMRUKER, T. & HAUBER, J. Induced gene expression of the hypusine-containing protein eukaryotic initiation factor 5A in activated human T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91 (23), 10829-10833, 1994.
- BEVEC, D., JAKSCHE, H., OFT, M., WOHL, T., HIMMELSPACH, M., PACHER, A., SCHEBESTA, M., KOETTNITZ, K., DOBROVNIK, M., CSONGA, R., LOTTSPREICH, F. & HAUBER, J. Inhibition of HIV-1 replication in lymphocytes by mutants of the Rev cofactor eIF-5A. *Science* 271 (5257), 1858-1860, 1996.
- BEVEC, D. & HAUBER, J. Eukaryotic initiation factor 5A activity and HIV-1 rev function. *Biol. Signals* 6, 124-133, 1997.
- BLAHA, G., STANLEY, R.E. & STEITZ, T.A. Formation of the first peptide bond: the structure of EF-P bound to the 70S ribosome. *Science* 325, 966-970, 2009.
- CANO, V.S., JEON, G.A., JOHANSSON, H.E., HENDERSON, C.A., PARK, J.H., VALENTINI, S.R., HERSHEY, J.W. & PARK, M.H. Mutational analyses of human eIF5A-1 - identification of amino acid residues critical for eIF5A activity and hypusine modification. *Febs J* 275, 44-58, 2008.
- CHEN, C.Y. & SARNOW, P. Initiation of protein synthesis by the eukaryotic translational apparatus on circular RNAs. *Science* 268, 415-417, 1995.
- CHEN, Z.P., YAN, Y.P., DING, Q.J., KNAPP, S., POTENZA, J.A., SCHUGAR, H.J., & CHEN, K.Y. Effects of inhibitors of deoxyhypusine synthase on the differentiation of mouse neuroblastoma and erythroleukemia cells. *Cancer Lett* 105, 233-239, 1996.
- CHEN, K.Y. & LIU, A.Y. Biochemistry and function of hypusine formation on eukaryotic initiation factor 5A. *Biol Signals* 6, 105-109, 1997.
- DENIZ, N., LENARCIC, E.M., LANDRY, D.M. & THOMPSON, S.R. Translation initiation factors are not required for Dicistroviridae IRES function in vivo. *RNA* 15, 932-946, 2009.
- DIAS, C.A., CANO, V.S., RANGEL, S.M., APPONI, L.H., FRIGIERI, M.C., MUNIZ, J.R., GARCIA, W., PARK, M.H., GARRATT, R.C., ZANELLI, C.F. & VALENTINI, S. R. Structural modeling and mutational analysis of yeast eukaryotic translation

- initiation factor 5A reveal new critical residues and reinforce its involvement in protein synthesis. *Febs J* 275, 1874-1888, 2008.
- DUNCAN, R.F. & HERSHEY, J.W. Changes in eIF-4D hypusine modification or abundance are not correlated with translational repression in HeLa cells. *J Biol Chem* 261, 12903-12906, 1986.
- ELFGANG, C., ROSORIUS, O., HOFER, L., JAKSCHE, H. HAUBER, J. & BEVEC, D. Evidence for specific nucleocytoplasmic transport pathways used by leucine-rich nuclear export signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 96, 6229-6234, 1999.
- FARABAUGH, P.J. Programmed translational frameshifting. *Annu Rev Genet* 30, 507-528, 1996.
- FRIGIERI, M.C., JOAO LUIZ, M.V., APPONI, L.H., ZANELLI, C.F. & VALENTINI, S.R. Synthetic lethality between eIF5A and Ypt1 reveals a connection between translation and the secretory pathway in yeast. *Mol Genet Genomics* 280, 211-221, 2008.
- GANOZA, M.C., KIEL, M.C. & AOKI, H. Evolutionary conservation of reactions in translation. *Microbiol Mol Biol Rev* 66, 460-485, table of contents, 2002.
- GLICK, B.R. & GANOZA, M.C. Identification of a soluble protein that stimulates peptide bond synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 4257-4260, 1975.
- GOUGH, J., KARPLUS, K., HUGHEY, R. & CHOTHIA, C. Assignment of homology to genome sequences using a library of hidden Markov models that represent all proteins of known structure. *J Mol Biol* 313, 903-919, 2001.
- GREGIO, A.P., CANO, V.P., AVACA, J.S., VALENTINI, S.R. & ZANELLI, C.F. eIF5A has a function in the elongation step of translation in yeast. *Biochem Biophys Res Commun* 380, 785-790, 2009.
- GUTHRIE, C. & FINK, G.R. (Ed.) *Guide to Yeast Genetics*. New York: Academic Press, 194, 1991.
- HANAUSKE-ABEL, H.M., PARK, M.H., HANAUSKE, A.R., POPOWICZ, A.M., LALANDE, M. & FOLK, J.E. Inhibition of the G1-S transition of the cell cycle by inhibitors of deoxyhypusine hydroxylation. *Biochim Biophys Acta* 1221, 115-124, 1994.
- HANAWA-SUETSUGU, K., SEKINE, S., SAKAI, H., HORI-TAKEMOTO, C., TERADA, T., UNZAI, S., TAME, J. R., KURAMITSU, S., SHIROUZU, M. & YOKOYAMA, S.

- Crystal structure of elongation factor P from *Thermus thermophilus* HB8. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 9595-9600, 2004.
- HENDERSON, B.R. & PERCIPALLE, P. Interactions between HIV Rev and nuclear import and export factors: the Rev nuclear localization signal mediates specific binding to human importin-beta. *J. Mol. Biol.*, 274, 693-707, 1997.
- HOFMANN, W., REICHART, B., EWALD, A., MULLER, E., SCHMITT, I., STAUBER, R.H., LOTTSPEICH, F., JOCKUSCH, B.M., SCHEER, U., HAUBER, J. & DABAUVALLE, M.C. Cofactor requirements for nuclear export of Rev response element (RRE)- and constitutive transport element (CTE)-containing retroviral RNAs. An unexpected role for actin. *J. Cell Biol.* 152 (5), 895-910, 2001.
- JACKSON, R.J. Alternative mechanisms of initiating translation of mammalian mRNAs. *Biochem Soc Trans* 33, 1231-1241, 2005.
- JACKSON, R.J., HELLEN, C.U. & PESTOVA, T.V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(2), 113-127, 2010.
- JAN, E. & SARNOW, P. Factorless ribosome assembly on the internal ribosome entry site of cricket paralysis virus. *J Mol Biol* 324, 889-902, 2002.
- JAO, D. L. E. & CHEN, K. Y. Subcellular localization of the hypusine-containing eukaryotic initiation factor 5A by immunofluorescent staining and green fluorescent protein tagging. *J. Cell. Biochem.* 86, 590-600, 2002.
- JAO, D.L. & CHEN, K.Y. Tandem affinity purification revealed the hypusine-dependent binding of eukaryotic initiation factor 5A to the translating 80S ribosomal complex. *J Cell Biochem* 97, 583-598, 2006.
- KAMATH, A. & CHAKRABURTTY, K. Role of yeast elongation factor 3 in the elongation cycle. *J Biol Chem* 264(26), 15423-15428, 1989.
- KANG, H.A. & HERSHEY, J.W. Effect of initiation factor eIF-5A depletion on protein synthesis and proliferation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 269, 3934-3940, 1994.
- KAPP, L.D. & LORSCH, J.R. The molecular mechanics of eukaryotic translation. *Annu Rev Biochem* 73, 657-704, 2004.
- KIM, K.K.; HUNG, L.W.; YOKOTA, H.; KIM, R.; KIM, S.H. Crystal structures of eukaryotic translation initiation factor 5A from *Methanococcus jannaschii* at 1.8 Å

- resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 10419-10424, 1998.
- KURATA, S.; NIELSEN, K.H.; MITCHELL, S.F.; LORSCH, J.R.; KAJI, A.; KAJI, H. Ribosome recycling step in yeast cytoplasmic protein synthesis is catalyzed by eEF3 and ATP. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(24), 10854-10859, 2010.
- LEE, Y.B., JOE, Y.A., WOLFF, E.C., DIMITRIADIS, E.K. & PARK, M. H. Complex formation between deoxyhypusine synthase and its protein substrate, the eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) precursor. *Biochem. J.* 340 (1), 273-281, 1999.
- LEE, L.A., ELFRING, L.K., BOSCO, G. & ORR-WEAVER, T.L. A genetic screen for suppressors and enhancers of the *Drosophila* PAN GU cell cycle kinase identifies cyclin B as a target. *Genetics* 158, 1545-1556, 2001.
- LIPOWSKY, G., BISCHOFF, F.R., SCHWARZMAIER, P., KRAFT, R., KOSTKA, S., HARTMANN, E., KUTAY, U. & GORLICH, D. Exportin 4: a mediator of a novel nuclear export pathway in higher eukaryotes. *Embo J.* 19 (16), 4362-4371, 2000.
- MAGDOLEN, V., KLIER, H., WOHL, T., KLINK, F., HIRT, H., HAUBER, J. & LOTTSPREICH, F. The function of the hypusine-containing proteins of yeast and other eukaryotes is well conserved. *Mol Gen Genet* 244, 646-652, 1994.
- MERRICK, W. C. Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis. *Microbiol Rev* 56 (2), 291-315, 1992.
- NAVARRE, W.W., ZOU, S.B., ROY, H., XIE, J.L., SAVCHENKO, A., SINGER, A., EDVOKIMOVA, E., PROST, L.R., KUMAR, R., IBBA, M., FANG, F.C. PoxA, yjeK, and elongation factor P coordinately modulate virulence and drug resistance in *Salmonella enterica*. *Mol Cell* 39(2), 209-221, 2010.
- NILSEN, K.H., SZAMECZ, B., VALASEK, L., JIVOTOVSKAYA, A., SHIN, B.S. & HINNEBUSCH, A.G. Functions of eIF3 downstream of 48S assembly impact AUG recognition and GCN4 translational control. *EMBO J* 23, 1166-1177, 2004.
- ORTIZ, P.A. & KINZY, T.G. Dominant-negative mutant phenotypes and the regulation of translation elongation factor 2 levels in yeast. *Nucleic Acids Res* 33, 5740-5748, 2005.
- OTTO, G.A. & PUGLISI, J.D. The pathway of HCV ORES-mediated translation initiation, *Cell* 119, 369-380, 2004.
- PARK, M.H., LEE, Y.B. & JOE, Y.A. Hypusine is essential for eukaryotic cell proliferation. *Biol Signals* 6, 115-123, 1997.

- PARK, M. H.; NISHIMURA, K.; ZANELLI, C. F.; VALENTINI, S. R. Functional significance of eIF5A and its hypusine modification in eukaryotes. *Amino Acids* 38(2), 491-500, 2009.
- PATEL, P.H., COSTA-MATTIOLI, M., SCHULZE, K.L. & BELLEN, H.J. The Drosophila deoxyhypusine hydroxylase homologue nero and its target eIF5A are required for cell growth and the regulation of autophagy. *J Cell Biol.* 185 (7),1181–1194, 2009.
- PEAT, T.S., NEWMAN, J., WALDO, G.S., BERENDZEN, J. & TERWILLIGER, T.C. Structure of translation initiation factor 5A from *Pyrobaculum aerophilum* at 1.75Å resolution. *Structure* 6, 1207-1214, 1998.
- PELLETIER, J. & SONENBERG, N. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 334, 320–325, 1988.
- PELTZ, S.W., DONAHUE, J.L. & JACOBSON, A. A mutation in the tRNA nucleotidyltransferase gene promotes stabilization of mRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 12, 5778-5784, 1992.
- PESTOVA, T.V. & HELLEN, C.U. Reconstitution of eukaryotic translation elongation in vitro following initiation by internal ribosomal entry. *Methods*, 36, 261-269, 2005.
- ROSORIOUS, O., KRATZER, F., HEGER, P., DABAUVALLE, M. C. & HAUBER, J. Nuclear pore localization and nucleocytoplasmatic transport of eIF5A: evidence for direct interaction with the export receptor CRM1. *J. Cell Sci.*, 112, 2369-2380, 1999.
- RUHL, M., HIMMELSPACH, M., BAHR, G. M., HAMMERSCHMID, F., JAKSCHE, H.,WOLFF, B., ASCHAUER, H., FARRINGTON, G. K., PROBST, H. & BEVEC, D. Eukaryotic initiation factor 5A is a cellular target of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain mediating trans-activation. *J. Cell Biol.* 123 (6), 1309-1320, 1993.
- SAINI, P., EYLER, D.E., GREEN, R. & DEVER, T.E. Hypusine-containing protein eIF5A promotes translation elongation. *Nature* 459, 118-121, 2009.
- SALAS-MARCO, J. & BEDWELL, D.M. GTP Hydrolysis by eRF3 facilitates stop codon decoding during eukaryotic translation termination. *Mol Cell Biol* 24, 7769-7778, 2004.

- SALAS-MARCO, J. & BEDWELL, D.M. Discrimination between defects in elongation fidelity and termination efficiency provides mechanistic insights into translational readthrough. *J Mol Biol* 348, 801-815, 2005.
- SASAKI, K., ABID, M.R. & MIYAZAKI, M. Deoxyhypusine synthase gene is essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 384, 151-154, 1996.
- SCHATZ, O., OFT, M., DASCHER, C., SCHEBESTA, M., ROSORIUS, O., JAKSCHE, H., DOBROVNIK, M., BEVEC, D. & HAUBER, J. Interaction of the HIV-1 rev cofactor eukaryotic initiation factor 5A with ribosomal protein L5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (4), 1607-1612, 1998.
- SCHNIER, J., SCHWELBERGER, H.G., SMIT-MCBRIDE, Z., KANG, H.A. & HERSHEY, J.W. Translation initiation factor 5A and its hypusine modification are essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 11, 3105-3114, 1991.
- SCHULER, M., CONNELL, S.R., LESCOUTE, A., GIESEBRECHT, J., DABROWSKI, M., SCHROEER, B., MIELKE, T., PENCZEK, P.A., WESTHOF, E. & SPAHN, C.M. Structure of the ribosome-bound cricket paralysis virus IRES RNA. *Nat Struct Mol Biol* 13, 1092–1096, 2006.
- SCHWELBERGER, H.G., KANG, H.A. & HERSHEY, J. W. Translation initiation factor eIF-5A expressed from either of two yeast genes or from human cDNA. Functional identity under aerobic and anaerobic conditions. *J. Biol. Chem.* 268 (19), 14018-14025, 1993.
- SHENTON, D., SMIRNOVA, J.B., SELLEY, J.N., CARROLL, K., HUBBARD, S.J., PAVITT, G.D., ASHE, M.P. & GRANT, C.M. Global translational responses to oxidative stress impact upon multiple levels of protein synthesis. *J Biol Chem* 281, 29011-29021, 2006.
- SHI, X.P., YIN, K.C., ZIMOLO, Z.A., STERN, A.M. & WAXMAN, L. The subcellular distribution of eukaryotic translation initiation factor, eIF-5A, in cultured cells. *Exp Cell Res* 225, 348-356, 1996.
- SHI, X.P.; YIN, K.C. & WAXMAN, L. - Effects of inhibitors of RNA and protein synthesis on the subcellular distribution of the eukaryotic translation initiation factor, eIF-5A, and the HIV-1 Rev protein. *Biol. Signals* 6, 143-149, 1997.

- SINGH, U. S., LI, Q. & CERIONE, R. Identification of the eukaryotic initiation factor 5A as a retinoic acid-stimulated cellular binding partner for tissue transglutaminase II. *J. Biol. Chem.* 273 (4), 1946-1950, 1998.
- SIVAN, G., KEDERSHA, N. & ELROY-STEIN, O. Ribosomal slowdown mediates translational arrest during cellular division. *Mol Cell Biol* 27, 6639-6646, 2007.
- TONG, Y., PARK, I., HONG, B.S., NEDYALKOVA, L., TEMPEL, W., PARK, H.W. Crystal structure of human eIF5A1: Insight into functional similarity of human eIF5A1 and eIF5A2, *Proteins* 75, 1040-1045, 2009.
- VALENTINI, S.R., CASOLARI, J.M., OLIVEIRA, C.C., SILVER, P.A. & MCBRIDE, A.E. Genetic interactions of yeast eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) reveal connections to poly(A)-binding protein and protein kinase C signaling. *Genetics* 160, 393-405, 2002.
- WOHL, T., KLIER, H., AMMER, H., LOTTSPREICH, F. & MAGDOLEN, V. The HYP2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is essential for aerobic growth: characterization of different isoforms of the hypusine-containing protein Hyp2p and analysis of gene disruption mutants. *Mol Gen Genet* 241, 305-311, 1993.
- XU, A. & CHEN, K.Y. Hypusine is required for a sequence-specific interaction of eukaryotic initiation factor 5A with postsystematic evolution of ligands by exponential enrichment RNA. *J Biol Chem* 276, 2555-2561, 2001.
- XU, A., JAO, D.L. & CHEN, K.Y. Identification of mRNA that binds to eukaryotic initiation factor 5A by affinity co-purification and differential display. *Biochem J* 384, 585-590, 2004.
- YANAGISAWA, T., SUMIDA, T., ISHII, R., TAKEMOTO, C., YOKOYAMA, S. A paralog of lysyl-tRNA synthetase aminoacylates a conserved lysine residue in translation elongation factor P. *Nat Struct Mol Biol* 17(9), 1136-1143, 2010.
- YAO, M., OHSAWA, A., KIKUKAWA, S., TANAKA, I. & KIMURA, M. Crystal structure of hyperthermophilic archaeal initiation factor 5A: a homologue of eukaryotic initiation factor 5A (eIF5A). *J Biochem Tokyo* 133, 75-81, 2003.
- ZANELLI, C.F., MARAGNO, A.L., GREGIO, A.P., KOMILI, S., PANDOLFI, J.R., MESTRINER, C.A., LUSTRI, W.R. & VALENTINI, S.R. eIF5A binds to translational machinery components and affects translation in yeast. *Biochem Biophys Res Commun* 348, 1358-1366, 2006.

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

Anexo



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc

eIF5A has a function in the elongation step of translation in yeast

Ana P.B. Gregio, Veridiana P.S. Cano, Juliana S. Avaca, Sandro R. Valentini, Cleslei F. Zanelli*

Department of Biological Sciences, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University – UNESP, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Rodovia Araraquara-Jaú, km 01, Araraquara, SP 14801-902, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 January 2009

Available online 29 January 2009

Keywords:

eIF5A

Translation elongation

eEF2

Ribosome transit time

EF-P

Hypusine

ABSTRACT

The putative translation factor eIF5A is essential for cell viability and is highly conserved throughout evolution. Here, we describe genetic interactions between an eIF5A mutant and a translation initiation mutant (eIF4E) or a translation elongation mutant (eEF2). Polysome profile analysis of single and double mutants revealed that mutation in eIF5A reduces polysome run-off, contrarily to translation initiation mutants. Moreover, the polysome profile of an eIF5A mutant alone is very similar to that of a translation elongation mutant. Furthermore, depletion of eIF5A causes a significant decrease in total protein synthesis and an increase of the average ribosome transit time. Finally, we demonstrate that the formation of P bodies is inhibited in an eIF5A mutant, similarly to the effect of the translation elongation inhibitor cycloheximide. Taken together, these results not only reinforce a role for eIF5A in translation but also strongly support a function for eIF5A in the elongation step of protein synthesis.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

The putative eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) is a highly conserved and essential protein present in all organisms from archaea to mammals, but not in eubacteria [1,2]. eIF5A is the only protein known to contain the unusual amino acid residue hypusine [2,3]. Despite being highly conserved and essential, the critical cellular role of eIF5A remains unclear.

eIF5A was initially purified from ribosomes and it was described as being involved in the formation of the first peptide bond [4]. While eIF5A was originally involved in protein synthesis [4], its depletion in yeast caused only a small (30%) decrease in the protein synthesis rate [5], thus arguing against its putative role as a general translation initiation factor. As depletion of eIF5A in yeast causes an increase in G1-arrested cells [5] and inhibitors of hypusine formation cause cell-cycle arrest in mammalian cells [6], it was hypothesized that eIF5A may be important for translation of mRNAs encoding specific proteins required for cell-cycle progression [5]. In support of this idea, eIF5A function is essential for polarized growth, a process necessary for the G1/S transition in yeast [7]. Furthermore, synthetic lethality was revealed between mutants of eIF5A and of Ypt1, the latter being a protein essential for vesicular trafficking, which is also necessary for proper polarized growth in yeast [8]. However, the mechanism triggered by eIF5A to accomplish this cell cycle function is still unknown.

It has recently been demonstrated that eIF5A physically interacts with structural components of the 80S ribosome as well as with the translation elongation factors eEF1A and eEF2 [9,10]. eIF5A was shown to co-fractionate with monosomes in a transla-

tion-dependent manner. Additionally, eIF5A mutant strains are sensitive to translation inhibitors and show altered polysome profiles [10]. These results suggest a function for eIF5A in translation, although it is still not known whether eIF5A affects translation of all mRNAs or a subset of specific mRNAs.

Herein, we describe the genetic interactions of the eIF5A mutant *tif51A-3* with the translation initiation mutant *cdc33-42* (eIF4E) and with the translation elongation mutant *eft2^{H699K}* (eEF2). Polysome profile analysis of single and double mutants revealed that mutation in eIF5A reduces polysome run-off and the polysome profile of eIF5A mutant alone is very similar to that of *eft2^{H699K}*. Furthermore, depletion of eIF5A causes a reduction in the total protein synthesis and an increase in the average time necessary for ribosomes to transit along mRNAs. Finally, we have shown that formation of P bodies is impaired in the *tif51A-3* mutant at the restrictive temperature, similarly to the effect of cycloheximide [21]. These results support a role for eIF5A in translation, as previously proposed [10], and suggest that this factor may function in translation elongation instead of initiation.

Materials and methods

Yeast strains, plasmids and standard procedures. Procedures for cell growth and genetic manipulations were carried out according to standard protocols [11]. *Saccharomyces cerevisiae* strains used in this work are listed in Table 1. The plasmid expressing *eft2^{H699K}* has been described previously [12]. The double mutant *cdc33-42 tif51A-3* was obtained after crossing the single mutant strains VZL347 and VZL447. Transformation of wild type or *tif51A-3* mutant with the plasmid expressing the dominant negative *eft2^{H699K}*

* Corresponding author. Fax: +55 16 3301 6940.

E-mail address: zanellicf@fcar.unesp.br (C.F. Zanelli).

Table 1
Yeast strains used in this study.

Strain	Genotype	Source
VZL32	<i>MATa ade2 his3 leu2 trp1 ura3 can1 tif51A-3</i>	[25]
VZL73 (PSY1176)	<i>MATa leu2 ade2 ade3 ura3 lys2 can1</i>	Pamela Silver
VZL82 (W303)	<i>MATa ade2 his3 leu2 trp1 ura3 can1</i>	Pamela Silver
VZL114	<i>MATα leu2-3 ade2-1 ade3 his3-11-15 trp1-1 tif51A-3</i>	[32]
VZL347	<i>MATa ade2 his3 trp1 ura3 cdc33::LEU2 [cdc33-42 TRP1 CEN]</i>	[33]
VZL447	<i>MATα ade2 his3 leu2 trp1 ura3-1 tif51A-3::URA3</i>	Laboratory collection
VZL847	<i>MATa ade2 his3 cdc33::LEU2 [cdc33-42 TRP1 CEN] tif51A-3::URA3</i>	This study

allele generated the *eft2*^{H699K} single and double mutants, respectively.

Polysome profiling. Cells from 100 mL cultures ($OD_{600\text{ nm}} = 0.3\text{--}0.6$) were shifted to 38 °C for 3 h and used for each sucrose gradient. At the time of harvesting, the translational machinery was blocked by the addition of 0.1 mg/mL cycloheximide for 5 min at 37 °C. Briefly, 10 $A_{260\text{ nm}}$ units of cell lysates were laid onto 10–50% sucrose gradients and centrifuged for 3 h at 39,000g and 4 °C in a Beckman SW41-Ti rotor. The gradients were then fractionated by upward displacement with 60% (w/v) sucrose using a gradient fractionator connected to a Control Unit UV-1 monitor (Amersham Pharmacia Biotech) for continuous measurement of the absorbance at 254 nm. The polysomal profile fractions were quantified with the aid of NIH Image J software.

Protein synthesis measurement. Yeast strains carrying wild type (VZL82) or *tif51A-3* (VZL32) alleles were grown and processed as previously described [13].

Measurement of ribosome transit time. Yeast strains carrying wild type (VZL82) or *tif51A-3* (VZL32) alleles were grown in YPD liquid medium at 25 °C ($OD_{600\text{ nm}} = 0.2\text{--}0.5$). The cultures were then shifted to 38 °C. After 3 h incubation at the restrictive temperature, cells were pelleted by centrifugation at 17,000g for 5 min and pulsed-labeled with 12.5 $\mu\text{Ci/mL}$ of [³H]leucine (Perkin-Elmer/NEN). Aliquots were taken at regular intervals and the extracts were prepared in 0.1 mg/mL cycloheximide. The radioactive incorporation was measured in the total (postmitochondrial supernatants - PMS) and completed protein fractions (postribosomal supernatant - PRS) by liquid scintillation counting in a Beckman Scintillation Counter. The radioactivity at each time point is presented as a mean of three measurements. The corrected radioactivity of PMS and PRS were plotted as a function of time. Finally, the average transit time was determined from the displacement in time between the two lines corresponding to the PMS and PRS data, multiplied by 2.

Detection of cytoplasmic P bodies. Wild type (VZL73) and *tif51A-3* (VZL114) strains were transformed with the plasmid pRP1175 [14] containing *DCP2-GFP*. Transformants were grown in liquid media at 25 °C to $OD_{600\text{ nm}} = 0.6$ and half of the cells were shifted for 4 h to 38 °C. Cells were collected (16,000g for 1 min), washed once in PBS (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, adjusted to pH 7.4), resuspended in 1 mL PBS and incubated for 10 min at the appropriate temperature. As a control of P bodies disassembly, prior to PBS stress, wild type cells were treated with 0.1 mg/mL cycloheximide for 10 min. Dcp2-GFP was detected with a Nikon Eclipse TE300 fluorescence microscope.

3. Results and discussion

The eIF5A mutant tif51A-3 genetically interacts with the eIF4E mutant cdc33-42 and polysome profiles of single and double mutants suggest a role for eIF5A in translation elongation

We have previously demonstrated both the physical interaction of eIF5A with translating ribosomes [10] and the functional association of eIF5A with the protein synthesis process using eIF5A mu-

tants [10,13]. Since synthetic growth defects often occur among functionally related genes, we decided to use genetic interaction as a strategy to further understand the role played by eIF5A in translation. Interestingly, a combination of the *tif51A-3* mutant with the eIF4E mutant *cdc33-42* in the same haploid cell resulted in a more severe temperature-sensitive phenotype than that caused individually by the single mutants, revealing a synthetic sick phenotype (Fig. 1A). This result reinforces the involvement of eIF5A function in the protein synthesis process.

To investigate the functional effect of this genetic interaction affecting protein synthesis, we performed polysome profile analysis. Translation initiation mutants show a reduced translation initiation rate, resulting in a decrease in the polysome fraction (polysome run-off) and consequently an increase in the peak of free 80S ribosomes (monosomes) [15]. In contrast, mutants impaired in translation elongation are expected to show a decreased 80S peak, accompanied by an increase of the polysome fractions [16]. As shown in Fig. 1B, the polysome profile of the *tif51A-3* mutant at the restrictive temperature demonstrates a reduction in the 80S peak and an increase in polysome fractions, which is in agreement with our previously published data [10]. In fact, the experimental conditions used here were more stringent for polysome accumulation, distinguishing better the differences between wild type and *tif51A-3* mutant at the restrictive temperature. Conversely, the eIF4E mutant (*cdc33-42*) showed a polysome profile with an increase of the 80S peak and a remarkable decrease in the polysomes at the restrictive temperature. Curiously, the polysome profile of the *tif51A-3 cdc33-42* double mutant exhibits an increase of the 80S peak and a decrease in the polysomes at the restrictive temperature, relative to the wild type, but with a consistent lower intensity than the *cdc33-42* mutant alone.

These results clearly indicate that the defect in translation caused by mutations in initiation factors is clearly different from that seen in *tif51A-3* and, therefore, eIF5A may not function in the initiation step of protein synthesis. Taken together, the polysome profile of the *tif51A-3 cdc33-42* double mutant and the significant effect of the *tif51A-3* mutant alone on polysome accumulation suggest a role for eIF5A in the elongation step rather than in the initiation step of the translation process.

The eIF5A mutant tif51A-3 genetically interacts with the eEF2 dominant negative mutant eft2^{H699K} and polysome profiles of single and double mutants strengthen a role for eIF5A in translation elongation

We have also tested the possibility of a genetic interaction between the eIF5A mutant *tif51A-3* and the eEF2 dominant negative mutant *eft2*^{H699K} and, once again, a synthetic sick interaction was revealed (Fig. 2A). However, it is important to note that the reduction in cell growth that occurred in the *tif51A-3 eft2*^{H699K} double mutant is considerably more intense than that observed for the *tif51A-3 cdc33-42* double mutant (compare Figs. 1A and 2A at 25 °C). Therefore, this genetic interaction not only supports a function for eIF5A in translation but also suggests a role for eIF5A more closely related to the elongation step of protein synthesis.

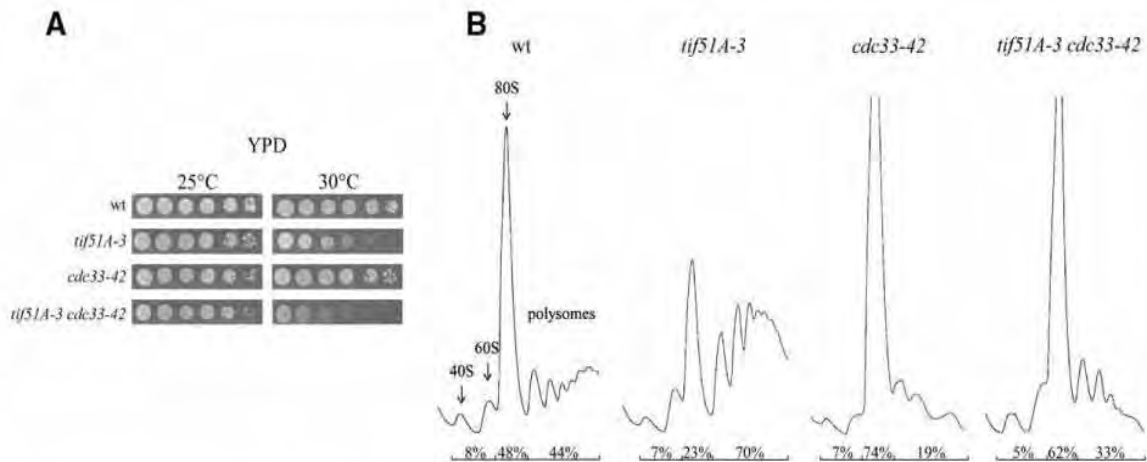


Fig. 1. Synthetic genetic interaction between *tif51A-3* and *cdc33-42* and polysome profile analysis of single and double mutants. (A) Tenfold serial dilutions of wild type, parental (*tif51A-3* or *cdc33-42*) and double mutant (*tif51A-3* and *cdc33-42*) strains were plated onto YPD plates to determine growth at 25 °C or 30 °C for 3–4 days. (B) Extracts prepared from the same strains were fractionated by centrifugation in a sucrose density gradient. Optical scans (OD_{254 nm}) of the gradients are shown.

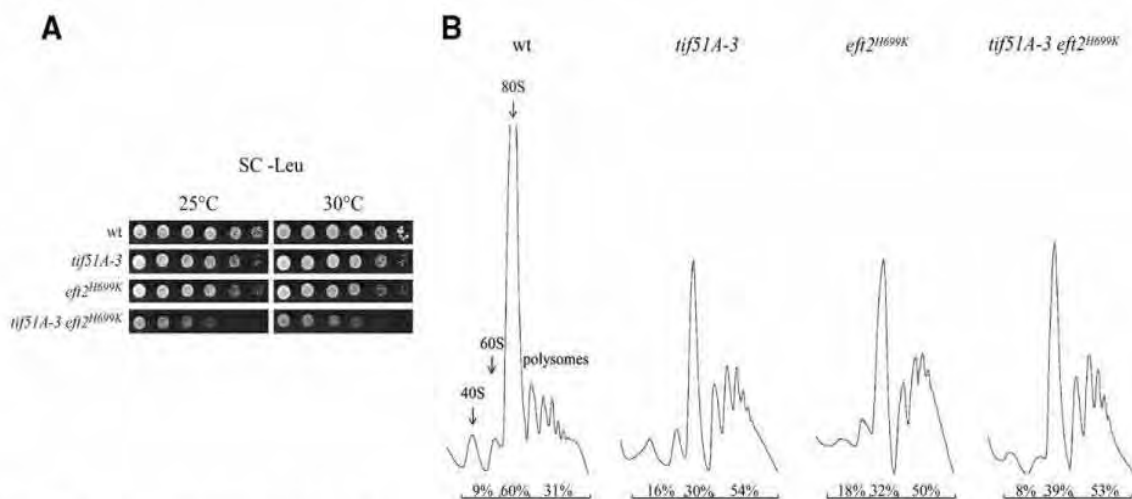


Fig. 2. Synthetic genetic interaction between *tif51A-3* and *eft2^{H699K}*, polysome profile analysis of single and double mutants and sensitivity of *tif51A-3* mutant to translation elongation inhibitors. (A) Tenfold serial dilutions of the wild type, *tif51A-3*, *eft2^{H699K}* and double mutant strains were grown for 3–4 days on SC-Leu plates at 25 °C or 30 °C. (B) Extracts prepared from the same strains were fractionated by centrifugation in a sucrose density gradient. Optical scans (OD_{254 nm}) of the gradients are shown.

Polysome profile analysis was also used to evaluate the effect of the combination of the eIF5A and eEF2 mutants on translation. As shown in Fig. 2B, the strains carrying the *tif51A-3* or the *eft2^{H699K}* mutants show an increased percentage of polysomes and a decreased 80S peak, compared to the wild type. This similarity between the polysome profiles of eIF5A and eEF2 single mutants is in agreement with a role for eIF5A in translation elongation. Finally, the *tif51A-3 eft2^{H699K}* double mutant also shows a polysome profile very similar to the results for either eIF5A or eEF2 single mutants, suggesting a close functional relationship between eIF5A and eEF2.

The eIF5A mutant tif51A-3 shows reduced protein synthesis and exhibits increased ribosome transit time

To confirm that the *tif51A-3* mutant phenotypes described above are the result of a direct effect of eIF5A on translation, we examined total protein synthesis at the restrictive temperature. The *tif51A-3* mutant showed an approximately 50% decrease in total amino acid incorporation after a 3-h shift to the restrictive temperature (Fig. 3A), which was directly correlated with a significant depletion of eIF5A protein (Fig. 3B). These results are in agreement

with our previously published data [13], further corroborating a role for eIF5A in translation.

Moreover, since the data presented in Figs. 1 and 2 suggest a function for eIF5A in the elongation step of protein synthesis, the ribosome transit time at the restrictive temperature was determined. The ribosome transit time is the time in which a growing nascent polypeptide remains attached to the translating ribosome (time of elongation plus termination) [17,18]. We determined the ribosome transit time by comparing the incorporation of [³H]leucine into total protein (postmitochondrial supernatant) and completed polypeptide chains released from ribosomes (postribosomal supernatant). The average ribosome transit time in the wild type strain was approximately 66 s, whereas the time for *tif51A-3* mutant was approximately 96 s. Thus, the total protein synthesis is decreased by one half in the *tif51A-3* mutant, which also demonstrated an increase of almost 50% in the ribosome transit time. In agreement with these data, a similar correlation between the amount of total protein synthesis decrease and the proportion of transit time increase was observed in the oxidative stress response in yeast [19] and in mammalian cells undergoing mitosis [20].

Summarizing, our results demonstrate that translation elongation is in fact impaired in the *tif51A-3*, which is consistent with

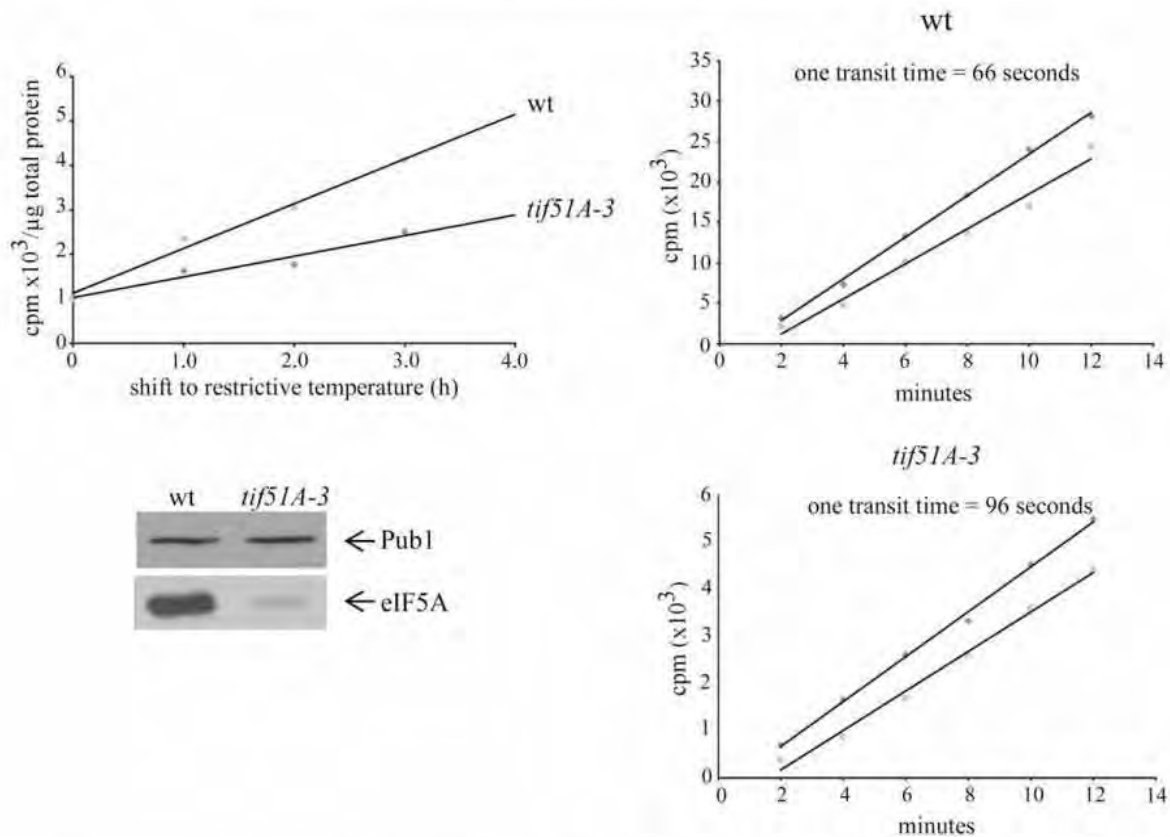


Fig. 3. Effect of eIF5A depletion on protein synthesis rate and ribosome transit time. (A) Wild type and *tif51A-3* mutant strains were grown to mid-log phase at 25 °C in YPD. [³H]leucine was added to the medium and cells were incubated at 25 °C for 1 h. After collecting the initial aliquots, cultures were then shifted to the restrictive temperature (38 °C) for 4 h and aliquots were collected at 1, 2, 3 and 4 h after the temperature shift. The radioactivity incorporated into proteins was determined and results are expressed as cpm/μg of total protein content. (B) Western blot analysis of eIF5A levels in wild type and *tif51A-3* strain at the restrictive temperature. Anti-Pub1 was used as a loading control. (C) Incorporation of [³H]leucine into total proteins (postmitochondrial supernatant; dark diamonds) or completed peptides released from ribosomes (postribosomal supernatant; gray squares) is shown. The transit time was determined from the displacement in time between the two lines, which were obtained by linear regression analysis.

the protein synthesis and polysome profile defects of this eIF5A mutant.

Loss of eIF5A function in the *tif51A-3* mutant blocks formation of P bodies

mRNA translation is a very complex step of gene expression and is intimately related to the process of mRNA degradation in the cytoplasm. Concordant data from various studies have suggested a model of competition between translation initiation and mRNA decay [21].

The degradation of mRNAs in yeast occurs primarily by the 5′–3′ degradation pathway (decapping complex and Xrn1), which occurs in the P bodies [21]. In agreement with the model of competition between translation and mRNA decay, translation initiation mutants show both increased mRNA degradation rates and number of P bodies at the restrictive temperature [16,22]. This effect may be caused by an increased availability of mRNAs for the degradation machinery in these mutants [23]. In contrast, when cells are treated with the elongation inhibitor cycloheximide, mRNAs accumulate in polysomes, causing mRNA stabilization and a concurrent inhibition of formation of P bodies [16,21].

Curiously, eIF5A mutants show mRNA accumulation at the restrictive temperature [24,25], but this mRNA defect was proposed to be secondary since it does not directly correlate with growth arrest of eIF5A mutants at the restrictive temperature [25].

To test whether a defect in eIF5A function results in redistribution of P bodies, we have used a fusion of the decapping enzyme

subunit Dcp2 to GFP and observed the *tif51A-3* mutant expressing this fusion protein after 10 min of incubation without glucose, which induces formation of P bodies [23]. As shown in Fig. 4, both wild type and the *tif51A-3* mutant form P bodies at 25 °C. However, while the wild type strain retains the ability to assemble P bodies at 38 °C, the *tif51A-3* mutant almost completely lacks localized foci of Dcp2-GFP. This result is identical to that caused by cycloheximide treatment in the wild type strain and further supports a role for eIF5A in the elongation step of translation.

Interestingly, although there is no eIF5A homolog in eubacteria, the bacterial elongation factor P (EF-P) shows significant sequence and structure similarity to eIF5A [26]. EF-P is essential to cell viability and stimulates the first peptide bond formation, binds to elongating ribosomes and is affected by peptidyl-transferase inhibitors [27], all of which correlates with the accumulating data on the functional characterization of eIF5A [28]. Moreover, it is proposed that EF-P has a role either in the first peptide bond formation or in the formation of the initial peptides in the protein sequence, instead of acting in the subsequent rounds of peptide bond formation during polypeptide elongation [29,30].

The results presented herein strongly suggest a role for eIF5A in translation after the initiation step, which could be similar to that played by EF-P. On the other hand, the similarities between polysome profiles of eIF5A and eEF2 mutants and the fact that eIF5A mutants are affected by translation elongation inhibitors in a broader manner [10] (data not shown), like general translation elongation mutants [12,31], support a function for eIF5A in the several rounds of peptide bond formation during polypeptide elongation.

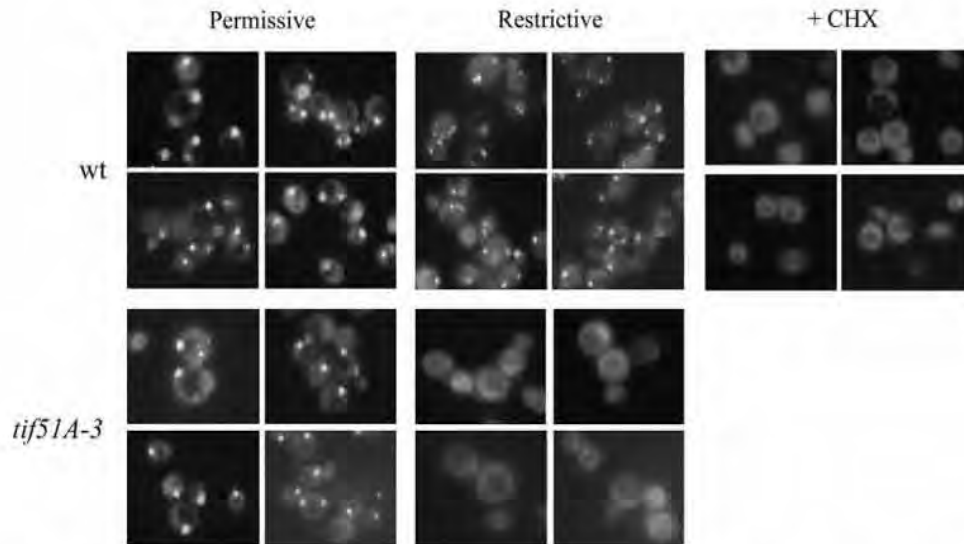


Fig. 4. Effect of eIF5A depletion on accumulation of P bodies. The wild type and *tif51A-3* mutant strains expressing Dcp2-GFP were grown in glucose synthetic medium, at the permissive (25 °C) and non-permissive (38 °C) temperatures, as indicated, followed by PBS treatment (without glucose) to induce formation of P bodies. As a control, wild type cells were incubated with 0.1 mg/mL cycloheximide for 10 min at 25 °C to block formation of P bodies (+CHX). Cells were visualized by fluorescence microscopy at 1000× original magnification.

tion. Thus, although it remains to be elucidated whether eIF5A and EF-P are functional homologues conserved throughout evolution, we propose a functional correlation between these two essential factors, as an accumulating body of evidence indicates a function for eIF5A in the elongation step of translation.

Acknowledgments

We would like to thank Dr. Chris Barnes, Dr. Roy Parker, Dr. Sunnie Thompson and Dr. Terry Kinzy for strains and plasmids. We thank FAPESP and CNPq for research grants to S.R.V. and C.F.Z. We also thank FAPESP and CNPq for scholarships granted to the authors.

References

- [1] J. Schnier, H.G. Schwelberger, Z. Smit-McBride, H.A. Kang, J.W. Hershey, Translation initiation factor 5A and its hypusine modification are essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.* 11 (1991) 3105–3114.
- [2] K.Y. Chen, A.Y. Liu, Biochemistry and function of hypusine formation on eukaryotic initiation factor 5A, *Biol. Signals* 6 (1997) 105–109.
- [3] E.C. Wolff, K.R. Kang, Y.S. Kim, M.H. Park, Posttranslational synthesis of hypusine: evolutionary progression and specificity of the hypusine modification, *Amino Acids* 33 (2007) 341–350.
- [4] R. Benne, J.W. Hershey, The mechanism of action of protein synthesis initiation factors from rabbit reticulocytes, *J. Biol. Chem.* 253 (1978) 3078–3087.
- [5] H.A. Kang, J.W. Hershey, Effect of initiation factor eIF-5A depletion on protein synthesis and proliferation of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 3934–3940.
- [6] H.M. Hanauske-Abel, M.H. Park, A.R. Hanauske, A.M. Popowicz, M. Lalande, J.E. Folk, Inhibition of the G1-S transition of the cell cycle by inhibitors of deoxyhypusine hydroxylation, *Biochim. Biophys. Acta* 1221 (1994) 115–124.
- [7] C.F. Zanelli, S.R. Valentini, Pkc1 acts through Zds1 and Gic1 to suppress growth and cell polarity defects of a yeast eIF5A mutant, *Genetics* 171 (2005) 1571–1581.
- [8] M.C. Frigieri, M.V. Joao Luiz, L.H. Apponi, C.F. Zanelli, S.R. Valentini, Synthetic lethality between eIF5A and Ypt1 reveals a connection between translation and the secretory pathway in yeast, *Mol. Genet. Genomics* 280 (2008) 211–221.
- [9] D.L. Jao, K.Y. Chen, Tandem affinity purification revealed the hypusine-dependent binding of eukaryotic initiation factor 5A to the translating 80S ribosomal complex, *J. Cell. Biochem.* 97 (2006) 583–598.
- [10] C.F. Zanelli, A.L.C. Maragno, A.P.B. Gregio, S. Komili, J.R. Pandolfi, C.A. Mestriner, W.R. Lustrri, S.R. Valentini, eIF5A binds to translational machinery components and affects translation in yeast, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 348 (2006) 1358–1366.
- [11] C. Guthrie, G.R.E. Fink, *Guide to Yeast Genetics*, Academic Press, New York, NY, 1991.
- [12] P.A. Ortiz, T.G. Kinzy, Dominant-negative mutant phenotypes and the regulation of translation elongation factor 2 levels in yeast, *Nucleic Acids Res.* 33 (2005) 5740–5748.
- [13] C.A.O. Dias, V.P.S. Cano, S.M. Rangel, L.H. Apponi, M.C. Frigieri, J.R. Muniz, W. Garcia, M.H. Park, R.C. Garratt, C.F. Zanelli, S.R. Valentini, Structural modeling and mutational analysis of yeast eukaryotic translation initiation factor 5A reveal new critical residues and reinforce its involvement in protein synthesis, *FEBS J.* 275 (2008) 1874–1888.
- [14] J. Collier, R. Parker, General translational repression by activators of mRNA decapping, *Cell* 122 (2005) 875–886.
- [15] T.V. Pestova, V.G. Kolupaeva, I.B. Lomakin, E.V. Pilipenko, I.N. Shatsky, V.I. Agol, C.U. Hellen, Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001) 7029–7036.
- [16] S.W. Peltz, J.L. Donahue, A. Jacobson, A mutation in the tRNA nucleotidyltransferase gene promotes stabilization of mRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.* 12 (1992) 5778–5784.
- [17] H. Fan, S. Penman, Regulation of protein synthesis in mammalian cells. II. Inhibition of protein synthesis at the level of initiation during mitosis, *J. Mol. Biol.* 50 (1970) 655–670.
- [18] M.B. Mathews, N. Sonenberg, J.W.B. Hershey, Origins and principles of translational control, in: M.B. Mathews, N. Sonenberg, J.W.B. Hershey (Eds.), *Translational Control in Biology and Medicine*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2007, pp. 1–40.
- [19] D. Shenton, J.B. Smirnova, J.N. Selley, K. Carroll, S.J. Hubbard, G.D. Pavitt, M.P. Ashe, C.M. Grant, Global translational responses to oxidative stress impact upon multiple levels of protein synthesis, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 29011–29021.
- [20] G. Sivan, N. Kedersha, O. Erloy-Stein, Ribosomal slowdown mediates translational arrest during cellular division, *Mol. Cell. Biol.* 27 (2007) 6639–6646.
- [21] R. Parker, U. Sheth, P bodies and the control of mRNA translation and degradation, *Mol. Cell* 25 (2007) 635–646.
- [22] D.C. Schwartz, R. Parker, Mutations in translation initiation factors lead to increased rates of deadenylation and decapping of mRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.* 19 (1999) 5247–5256.
- [23] D. Teixeira, U. Sheth, M.A. Valencia-Sanchez, M. Brengues, R. Parker, Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs, *RNA* 11 (2005) 371–382.
- [24] D. Zuk, A. Jacobson, A single amino acid substitution in yeast eIF-5A results in mRNA stabilization, *EMBO J.* 17 (1998) 2914–2925.
- [25] S.R. Valentini, J.M. Casolari, C.C. Oliveira, P.A. Silver, A.E. McBride, Genetic interactions of yeast eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) reveal connections to poly(A)-binding protein and protein kinase C signaling, *Genetics* 160 (2002) 393–405.
- [26] K. Hanawa-Suetsugu, S. Sekine, H. Sakai, C. Hori-Takemoto, T. Terada, S. Unzai, J.R. Tame, S. Kuramitsu, M. Shirouzu, S. Yokoyama, Crystal structure of elongation factor P from *Thermus thermophilus* HB8, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 9595–9600.
- [27] M.C. Ganoza, M.C. Kiel, H. Aoki, Evolutionary conservation of reactions in translation, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66 (2002) 460–485 (table of contents).
- [28] C.F. Zanelli, S.R. Valentini, Is there a role for eIF5A in translation?, *Amino Acids* 33 (2007) 351–358.
- [29] M.C. Ganoza, H. Aoki, Peptide bond synthesis: function of the efp gene product, *Biol. Chem.* 381 (2000) 553–559.

- [30] H. Aoki, J. Xu, A. Emili, J.G. Chosay, A. Golshani, M.C. Ganoza, Interactions of elongation factor EF-P with the *Escherichia coli* ribosome, *FEBS J.* 275 (2008) 671–681.
- [31] M. Anand, K. Chakraburty, M.J. Marton, A.G. Hinnebusch, T.G. Kinzy, Functional interactions between yeast translation eukaryotic elongation factor (eEF) 1A and eEF3, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 6985–6991.
- [32] M.C. Frigieri, G.M. Thompson, J.R. Pandolfi, C.F. Zanelli, S.R. Valentini, Use of a synthetic lethal screen to identify genes related to TIF51A in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genet. Mol. Res.* 6 (2007) 152–165.
- [33] M. Altmann, N. Sonenberg, H. Trachsel, Translation in *Saccharomyces cerevisiae*: initiation factor 4E-dependent cell-free system, *Mol. Cell. Biol.* 9 (1989) 4467–4472.