

UNESP
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de pós-graduação em Biociências e Biotecnologia
Aplicadas à Farmácia

**Estudo das interações de eIF5A com a maquinaria de
tradução e com o complexo
Ribosome Quality Control, utilizando o modelo de
*Saccharomyces cerevisiae***

Paulo Eduardo Gonçalves Boldrin

Tese de Doutorado

UNESP
2016

Paulo Eduardo Gonçalves Boldrin

Estudo das interações de eIF5A com a maquinaria de tradução e com o complexo *Ribosome Quality Control*, utilizando o modelo de *Saccharomyces cerevisiae*

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara, 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

UNESP

2016

Agradecimentos

Aos meus pais, Carlos e Ana, pelo apoio incondicional, amizade, compreensão, paciência e incentivo durante todas as escolhas feitas que, direta ou indiretamente, levaram à realização deste trabalho.

Aos meus avós Geraldo Gonçalves, Geraldo Boldrin, Aparecida (que, infelizmente, não estão mais conosco) e Ana por sempre terem sido exemplos de conduta ilibada, digna, humilde e honrosa.

A especial Mayara Ivani que sempre me apoiou nos melhores e nos piores momentos desta difícil trajetória, sempre com a calma e a compreensão que o momento pedia.

Aos amigos pelos momentos essenciais e companheirismo que em vários momentos foram essenciais para minha formação.

Aos Professores Sandro e Cleslei pela oportunidade dada, orientação e pela paciência durante minha evolução científica e, principalmente, pessoal.

Ao Professor Cláudio Joazeiro por me receber em seu laboratório, pela oportunidade e contribuição no meu desenvolvimento científico e pessoal

Aos demais Professores que de alguma forma contribuíram com minha formação, desde a formação inicial até a este momento.

A todas as pessoas que pude conhecer e conviver durante todo o tempo nos laboratórios, em especial, Kadu Brantis, Fábio Galvão, Natália Barbosa e Erich Tahara que foram indispensáveis no decorrer deste caminho.

A FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Processo 2012/02305-0), CAPES, CNPq, PADC, Faculdade de Ciências

Farmacêuticas - UNESP e *The Scripps Research Institute (TSRI)* pelo apoio financeiro e institucional para a realização deste trabalho.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, em especial a Cláudia e Daniela da Seção de Pós-graduação, que sempre demonstraram muita disponibilidade, empenho e gentileza em contribuir de alguma forma para a realização deste trabalho.

“Nada é mais difícil de executar, mas duvidoso ter êxito ou mais perigoso de manejar do que dar início a uma nova ordem de coisas. O reformador tem inimigos em todos os que lucraram com a velha ordem e apenas defensores tépidos nos que lucrariam com a nova ordem.”

Maquiavel

RESUMO

O fator de tradução 5A (eIF5A) é altamente conservado e essencial para a viabilidade celular. eIF5A é a única proteína conhecida que sofre uma modificação pós-traducional que gera um resíduo de hipusina, essencial para sua função. Apesar de eIF5A já ter sido envolvida em diferentes vias celulares, estudos mais recentes reforçam seu papel no processo de síntese proteica, mais especificamente na etapa de alongação da tradução. Resultados do nosso grupo revelaram uma relação funcional entre eIF5A e o Fator de Elongação da Tradução 2 (eEF2). No intuito de melhor compreender o papel de eIF5A com o processo de alongação da tradução, o presente trabalho buscou aprofundar os estudos de interação física entre eIF5A e eEF2. Foi mostrado que eIF5A não interage fisicamente de forma direta com eEF2 e que a interação física destes dois fatores é dependente de complexos ribossomais. Ainda, foi revelado que eIF5A e eEF2 não estão presentes no ribossomo simultaneamente ou não ocupam o mesmo ribossomo por muito tempo. Além disso, como foi mostrado que o homólogo de eIF5A em bactéria, EF-P, interage fisicamente com a proteína ribossomal L1, foi investigada a relação funcional entre eIF5A e L1 em levedura. Os resultados obtidos mostraram uma forte interação genética entre estes fatores e uma possível dependência da presença de L1 para a ligação de eIF5A no ribossomo. Por fim, como foi mostrado que eIF5A é necessária para a tradução de sequências de prolinas, as quais causam *stalling* do ribossomo durante a tradução, e que outros tipos de *stalling* do ribossomo recrutam e ativam o complexo *Ribosome Quality Control (RQC)*, foi estudada também a interação funcional entre o eIF5A e os fatores do RQC, Ltn1 e Tae2. Apesar de ter sido identificada interação genética entre mutantes de eIF5A e destes fatores do RQC, não foi possível evidenciar que o complexo RQC seja recrutado pelo ribossomo parado em sequências de poliprolinas. Porém, eIF5A se mostrou importante para a formação de agregados proteicos causados por sequências de polilisinas. Adicionalmente, foi revelada uma correlação entre a expressão normal de eIF5A e a presença de Sis1 e Cdc48 nesses agregados, sugerindo uma possível interação funcional entre eIF5A e o RQC.

ABSTRACT

The translation factor 5A (eIF5A) is highly conserved and essential for cell viability. eIF5A is the only protein known to contain the essential amino acid residue hypusine, generated by a post-translational modification. Although eIF5A has been involved in different cellular pathways, recent studies have strengthened its role in protein synthesis, more specifically in the translation elongation step. Results of our group revealed a functional correlation between eIF5A and the Translation Elongation Factor 2 (eEF2). To further investigate the role of eIF5A in translation elongation, we carried out new experiments to study the physical interaction between eIF5A and eEF2. eIF5A does not interact directly with eEF2 and their physical interaction is dependent on ribosomal complexes. Moreover, eIF5A and eEF2 do not bind simultaneously to the same ribosome or they do not occupy the same ribosome for a long time. Additionally, as it was shown that the homolog of eIF5A in bacteria, EF-P, interacts physically with the Large Ribosome Protein 1 (L1). We evaluated a functional interaction between eIF5A and L1. The results demonstrated a strong genetic interaction between these factors and a possible dependency of L1 in the eIF5A ribosome binding. Finally, as eIF5A was recently involved in translation of polyproline stretches, which cause ribosome stalling, and other types of ribosome stalling recruit and activate the Ribosome Quality Control (RQC) complex, we also investigated the functional interaction between eIF5A and the RQC factors Ltn1 and Tae2. Although it was identified genetic interaction between mutants of eIF5A and mutants of these RQC factors, ribosome stalled at polyproline residues does not recruit the RQC complex. Curiously, it was observed that eIF5A is important for the formation of cellular aggregates caused by polylysines. Additionally, it was shown a correlation between normal levels of eIF5A in the cell and the presence of Sis1 e Cdc42 in the aggregates, suggesting a possible functional interaction between eIF5A and the RQC complex.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Via de biossíntese do resíduo de aminoácido hipusina no precursor de eIF5A.	24
Figura 2	Estrutura da proteína eIF5A e sua localização no ribossomo 80S de levedura	25
Figura 3	Modelo de funcionamento do complexo RQC.	29
Figura 4	Esquema dos genes repórteres de stalling de poliprolina.	44
Figura 5	Análise da interação física direta entre eIF5A e eEF2 utilizando o sistema de duplo-híbrido	46
Figura 6	Teste de funcionalidade da proteína de fusão GST-eIF5A.	45
Figura 7	Representação esquemática das etapas envolvidas na técnica de co-purificação por GST-eIF5A utilizada neste trabalho.	52
Figura 8	Esquema do ensaio de co-purificação de monossomos por eIF5A, utilizando <i>crosslinking</i> e RNase.	53
Figura 9	Ensaio de perfil polissomal para verificação da efetividade dos tratamentos com formaldeído e com RNase .	54
Figura 10	Resultados dos ensaios de co-purificação de ribossomos contendo eIF5A utilizando crosslink com formaldeído.	55
Figura 11	Resultados de espectrometria de massas para identificação de eEF2 nos ensaios de co-purificação de ribossomos portando eIF5A.	58
Figura 12	Resultados de espectrometria de massas para identificação de proteínas co-purificadas com GST-eIF5A.	59
Figura 13	Análise de interação genética entre eIF5A e proteínas ribossomais	64
Figura 14	Análise do fenótipo de crescimento celular de mutantes duplos de eIF5A e proteínas ribossomais.	65
Figura 15	Análise do perfil polissomal do mutante duplo de eIF5A e L1B.	66
Figura 16	Análise da interação genética entre <i>TIF51A</i> e <i>LTN1</i>	69
Figura 17	Análise da interação genética entre <i>TIF51A</i> e <i>TAE2</i> .	70
Figura 18	Análise dos níveis de tradução de poliprolinas em condição de depleção de eIF5A	73
Figura 19	Efeito da deleção de <i>Ltn1</i> na expressão de repórteres de poliprolina (P3 e P6) e polilisina (K12).	74

Figura 20	Efeito da deleção de Ltn1 e Tae2 na expressão de repórteres de poliprolina (P3 e P6) e polilisina (K12).	75
Figura 21	Estudo dos níveis da expressão da proteína Eap1 em mutante de eIF5A e nocaute de Ltn1.	76
Figura 22	Co-imunoprecipitação do repórter FLAG-2A-HIS3-K12-4HA na linhagem VZL1299.	81
Figura 23	Ensaio de co-imunoprecipitação utilizando o gene repórter K12 nas linhagens VZL1074 e VZL1299.	84
Figura 24	Ensaio de co-imunoprecipitação utilizando os genes repórteres K0 ou K12 nas linhagens VZL1074 e VZL1309.	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Linhagens de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas neste trabalho.	31
Tabela 2	Plasmídeos utilizados neste trabalho.	32
Tabela 3	Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.	33
Tabela 4	Proteínas identificadas por espectrometria de massas em amostras obtidas por co-imunoprecipitação, utilizando o gene repórter K12 como isca.	82

ABREVIATURAS

λ	comprimento de onda
μg	micrograma
μL	Microlitro
$^{\circ}\text{C}$	graus Celcius
μM	Milimolar
C-terminal	carboxi-terminal
Cryo-EM	<i>Cryo-electron microscopy</i>
D.O.	densidade ótica
DNA	ácido desoxirribonucléico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
g	Grama
kb	Quilobase
kDa	Quilodalton
L	Litro
LB	meio Luria-Bertani
LiAC	Acetato de lítio
M	Molar
mg	Miligrama
MgSO_4	Sulfato de magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
m/v	Relação massa/volume
NaCl	cloreto de sódio
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
N-terminal	amino-terminal
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (janela aberta de leitura)
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
pb	pares de bases
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PBST	PBS com Tween 20
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (reação de polimerase em cadeia)
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEG	polietilenoglicol
pH	potencial hidrogeniônico

q.s.p.	quantidade suficiente para
RNA	ácido ribonucleico
RQC	Ribosome Quality Control (Controle de qualidade do ribossomo)
SC	meio sintético completo para levedura
SDS	dodecil sulfato de sódio
SGA	<i>Synthetic Genetic Array</i>
ssDNA	DNA de esperma de salmão
S-SPO	<i>super-sporulation</i> (meio para esporulação de levedura)
TCA	Ácido tricloroacético
TE	Tris-EDTA
Tris	tris-hidroximetilaminometano
tRNA	RNA transportador
Tween 20	monolaurato de polioxietilenosorbitana
U	unidade enzimática
V	Volt
xg	aceleração gravitacional
YPD	<i>yeast extract, peptone, dextrose</i> (meio rico para levedura contendo extrato de levedura, peptona e glicose)

ÍNDICE

<i>Capítulo 1</i>	17
1 INTRODUÇÃO	18
1.1. A proteína eIF5A	18
1.2. A proteína ribossomal L1	26
1.3. O complexo Ribosome Quality Control (RQC)	27
2. OBJETIVOS	30
2.1. OBJETIVOS GERAIS	30
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1. MATERIAL	31
3.2. MÉTODOS	33
3.2.1. Transformação de levedura	33
3.2.2. Teste de crescimento celular	34
3.2.3. Duplo-híbrido em <i>S. Cerevisiae</i> (Sistema da linhagem L40)	34
3.2.3.1. Teste de crescimento em meio desprovido de histidina	35
3.2.3.2. Ensaio de β -galactosidase	35
3.2.4. GST-pulldown	36
3.2.4.1 – Preparação do extrato celular e <i>crosslinking</i>	36
3.2.4.2 – Clivagem dos polissomos com RNase A	36
3.2.4.3 – Incubação do extrato com a resina	37
3.2.5. Perfil polissomal	37
3.2.5.1 – Preparação do gradiente de sacarose	37
3.2.5.2 – Fracionamento dos gradientes	37
3.2.6. Western blot	38
3.2.6.1 – Transferência úmida	38
3.2.6.2 – Transferência semiseca	38
3.2.7. Cruzamento, esporulação e dissecação de <i>S. cerevisiae</i>	39
3.2.7.1. Cruzamento	39
3.2.7.2. Esporulação	39
3.2.7.3. Dissecação	39
3.2.7.4. Caracterização de tétrades	39

3.2.8. Curva de crescimento e cálculo do tempo de dobramento	40
3.2.9. Recombinação homóloga	40
3.2.9.1. PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	40
3.2.9.2. Transformação de levedura para recombinação homóloga.....	41
3.2.10. Obtenção dos genes repórteres	41
3.2.11. Co-imunoprecipitação com tag de FLAG	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1. Análise da interação física entre eIF5A e eEF2	45
4.1.1. Análise da interação física direta entre eIF5A e eEF2 utilizando o sistema de duplo-híbrido em levedura	45
4.1.2. Análise da interação física entre eIF5A e eEF2 via complexos ribossomais	47
4.1.3. Investigação da presença de eEF2 e outros fatores relacionados à tradução em ribossomos portando eIF5A.....	56
4.2. Análise da interação funcional entre eIF5A e a proteína ribossomal L160	
4.3. Análise da interação funcional entre eIF5A e o complexo RQC (Ribosome Quality Control).....	67
4.3.1. Análise de Interação genética entre mutantes de eIF5A e dos fatores Ltn1 e Tae2 do complexo RQC.....	67
4.3.2. Investigação do papel do complexo RQC no <i>stalling</i> de poliprolinas.....	71
4.3.3. Análise da participação de eIF5A no funcionamento do complexo RQC e na formação de agregados proteicos.	77
5. CONCLUSÕES	86
5.1. Análise da interação física entre eIF5A e eEF2	86
5.2. Análise da interação funcional entre eIF5A e a proteína ribossomal L186	
5.3. Análise da interação funcional entre eIF5A e o complexo RQC (Ribosome Quality Control).....	86
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	87
Capítulo 2 (<i>Artigos e manuscritos relacionados a este trabalho</i>)	92

Capítulo 1

1 INTRODUÇÃO

1.1. A proteína eIF5A

O fator de tradução eIF5A (*eukaryotic translation Initiation Factor 5A*) é uma proteína relativamente pequena, de apenas 17 kDa, e altamente conservada em arqueas e eucariotos (Schinier et al., 1991; Chen e Liu 1997).

A proteína eIF5A sofre uma modificação pós-traducional única, que corresponde à hipusinação de um resíduo de lisina (Chen e Liu 1997; Park *et al.*, 1998). A formação do aminoácido hipusina (do inglês “hypusine: hydroxyputrescine-lysine”) ocorre através da transferência, pela desoxi-hipusina sintase (Dys1), 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). A Figura 1 apresenta esquematicamente a via de biossíntese da hipusina. 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 *et al.*, 1994).

Apesar de não existir proteína homóloga de eIF5A em eubactérias, o fator de alongação da tradução de bactérias EF-P é um homólogo estrutural de eIF5A. Curiosamente, foi observado que EF-P de um subgrupo 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 de uma lisina através da carbonila do grupamento amino da lisina 34 de EF-P pelas enzimas YjeA e YjeK (Bailly e Crécy-Lagard, 2010; Navarre *et al.*, 2010; Yanagisawa *et al.*, 2010). Apesar de EF-P ser essencial e o sítio alvo da modificação pós-traducional ser altamente conservado, esta modificação parece não ser essencial para a função de EF-P em todas as bactérias, uma vez que, como mencionado anteriormente, esta modificação foi observada apenas em um subgrupo de bactérias (Brochier *et al.*, 2004; Bailly e Crécy-Lagard 2010).

Enquanto ortólogos de eIF5A, assim como da enzima desoxi-hipusina sintase, são encontrados desde arqueas até mamíferos, arqueas parecem não

possuir ortólogos para a enzima desoxi-hipusina hidroxilase. Além disso, o gene da desoxi-hipusina hidroxilase não é essencial em *S. cerevisiae* para crescimento em nenhuma condição testada até o momento (Thompson *et al.*, 2004), enquanto o ortólogo de *Schizosaccharomyces pombe* é necessário para o crescimento em temperaturas acima de 37°C (Weir e Yaffe, 2004). Por outro lado, o gene para desoxi-hipusina hidroxilase é essencial para o desenvolvimento tanto em *Drosophila melanogaster* como em *Caenorhabditis elegans* (Park *et al.*, 2010). Portanto, a primeira etapa da hipusinação é essencial em todas as espécies que possuem eIF5A, mas a segunda etapa parece se tornar mais importante funcionalmente apenas ao longo da progressão evolutiva. Dessa forma, a substituição do resíduo de lisina específico de eIF5A, em *S. cerevisiae*, por arginina (K51R) leva à produção de eIF5A não hipusinado, sendo este incapaz de permitir o crescimento celular quando é a única fonte de eIF5A na célula (Schinier *et al.*, 1991). Além disso, eIF5A recombinante, não hipusinado, não é funcional no ensaio de síntese de metionil-puromicina, sendo que, após modificação *in vitro* pela desoxi-hipusina sintase, a eIF5A recombinante passa a ser funcional neste ensaio (Park 1989; Smit-McBride *et al.*, 1989). Por fim, a região flanqueadora do sítio de hipusinação é extremamente conservada ao longo da evolução, sendo formada por uma sequência de doze aminoácidos: STSKTG-HIPUSINA-HGHAK (Park *et al.*, 1993; Magdolen *et al.*, 1994; Chen e Liu, 1997). Portanto, todos estes dados mostram que a hipusinação ou, ao menos sua primeira etapa, é essencial para a função *in vivo* de eIF5A.

O fato de eIF5A ser a única proteína eucariótica que sofre hipusinação evidencia uma atividade biológica fundamental para este fator. A importância da hipusinação para a atividade de eIF5A no processo de tradução foi mostrada a partir da observação de que eIF5A humana recombinante, não hipusinado, foi incapaz de estimular a síntese *in vitro* de metionil-puromicina. Entretanto, quando este precursor foi modificado *in vitro* para a forma hipusinado, a proteína resultante tornou-se ativa neste ensaio (Park 1989; Smit-McBride *et al.*, 1989).

As estruturas tridimensionais de homólogos de eIF5A de arqueas, protozoários, levedura e de humanos foram determinadas e revelaram várias características comuns (Kim *et al.*, 1998; Peat *et al.*, 1998; Tong *et al.*, 2009; Yao *et al.*, 2003). Segundo esses estudos, eIF5A é 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 (domínio I), 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 *et al.*, 2001)). O C-terminal (domínio II), 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 *et al.*, 2001)).

Ainda, a estrutura tridimensional de EF-P de bactéria também foi determinada por cristalografia e apresenta características similares com as obtidas para eIF5A. Diferentemente de eIF5A, EF-P possui três domínios, sendo que os domínios I e II são sobreponíveis, respectivamente, aos domínios N-terminal (domínio I) e C-terminal (domínio II) de eIF5A. Acredita-se que domínio III de EF-P surgiu devido a um evento de duplicação do domínio II (Figura 2A). Outra característica similar entre as estruturas de EF-P e eIF5A é a posição de suas modificações pós-traducionais, no topo da alça flexível no domínio I destas proteínas (HANAWA-SUETSUGU *et al.* 2004).

eIF5A está relacionada à tradução de proteínas. Embora a função de eIF5A como fator de início de tradução nunca tenha sido claramente demonstrada, estudos realizados por nosso laboratório e por outros, revelaram a associação de eIF5A com ribossomos traducionalmente ativos e trouxeram esse fator de volta ao cenário da tradução (Jao e Chen, 2006; Zanelli *et al.*, 2006). Ensaio de co-purificação seguidos de espectrometria de massas revelaram que eIF5A interage com algumas proteínas ribossomais e com o fator de alongamento 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 *et al.*, 2006). Além disso, a análise de diferentes mutantes de eIF5A demonstrou uma diminuição na síntese proteica total nas condições não-permissivas de crescimento (Cano *et al.*, 2008; Dias *et al.*, 2008). Além disso, estudos recentes utilizando diferentes mutantes condicionais de eIF5A em *S. cerevisiae* revelaram um aumento de polissomos em relação a monossomos na temperatura não permissiva, dados que sugerem defeito na elongação da tradução (Gregio *et al.*, 2009; Saini *et al.*, 2009). Ao verificar a velocidade do trânsito ribossomal nesses mesmos mutantes, foi constatado um atraso significativo, na temperatura não permissiva (Gregio *et al.*, 2009; Saini *et al.*, 2009), resultado que fortalece a idéia do envolvimento da proteína eIF5A com a elongação da tradução. Ainda, mutantes de eIF5A não apresentaram formação do “P-bodies” (agregados de mRNA e proteínas, onde ocorre a degradação do mRNA) na temperatura não permissiva, característica semelhante à observada para células tratadas com ciclo-heximida, um inibidor da elongação da tradução. Este efeito sobre os “P-bodies” também é consistente com um papel de eIF5A na fase de elongação de tradução (Gregio *et al.*, 2009).

Finalmente, um mutante de eIF5A (*tif51A*^{D63V}) apresentou defeito na capacidade do ribossomo de realizar alteração programada da janela de leitura (*Ribosomal Programmed Frameshifting* - PRF) +1, de forma similar ao que ocorre com a célula selvagem tratada com sordarina, um inibidor do fator de elongação eEF2. Esse resultado, aliado ao fato desse mutante ser sensível à sordarina, sugere uma interação funcional entre eIF5A e o fator de elongação eEF2 (Saini *et al.*, 2009). Concordante com essa idéia está o fato de que o mutante *tif51A-3* mostrou-se sinteticamente doente com o mutante dominante negativo do fator de elongação *eft2*^{H699K} (Gregio *et al.*, 2009).

Assim, apesar de estimular a síntese *in vitro* de metionil-puromicina, os dados recentes sugerem fortemente um papel para eIF5A na elongação da tradução.

Embora a atuação de eIF5A na tradução seja clara, não está determinado se ela atua de maneira geral ou específica e, sendo específica, que tipo de mensageiros são favorecidos por este fator. Há pouco tempo, foi observado que eIF5A e seu homólogo estrutural em bactéria, EF-P, apresentam um importante papel na atenuação de um tipo de *stalling* dos ribossomos, ou seja, eIF5A facilitaria a tradução de uma sequência de aminoácidos do polipeptídeo, que por algum motivo, atrasa o processo de tradução. Estes resultados foram observados durante o processo de tradução de proteínas com sequências consecutivas de poliprolinas, demonstrando assim uma provável função específica para estes fatores no processo de tradução (Doerfel *et al.*, 2013; Gutierrez *et al.*, 2013; Ude *et al.*, 2013). Corroborando com o papel na tradução de sítios com sequência de prolina, eIF5A foi mostrado ser essencial para a fertilidade e o crescimento celular polarizado através da tradução da proteína Bnil, que possui sítio com 12 prolinas e tem seus níveis drasticamente diminuídos em mutantes de eIF5A (Li *et al.*, 2014).

Para compreender melhor como eIF5A atua na tradução de poliprolinas, é necessário conhecer o seu local de ligação no ribossomo. Foi mostrado, recentemente que eIF5A se liga ao ribossomo de maneira quase idêntica ao seu homólogo estrutural EF-P, entre o sítio E (*exit*) e P (*peptidyl*) do ribossomo e que ambos possuem interação física com a proteína ribossomal L1, também chamada de Rpl1 (*Ribosome Protein Large 1*) (Gutierrez *et al.*, 2013; Blaha *et al.*, 2009). Sendo assim, eIF5A não ocupa em momento algum o sítio A (aminoacyl), que é o ponto de ligação de eEF2 no ribossomo (Figura 2B) e o local onde o tRNA aminoacilado chega ao ribossomo trazido pelo Fator de Elongação 1A (eEF1A).

Mais recentemente, foi demonstrado por *Cryo-EM* e com uma resolução alta que eIF5A de *Saccharomyces cerevisiae* se liga no sítio E do ribossomo 60S e interage com rRNA e proteínas ribossomais. Enquanto o domínio N-terminal (domínio I) interage predominantemente com as hélices H74 e H93 do rRNA 25S, o domínio C-terminal (domínio II) e a extensão do N-terminal de eIF5A (que corresponde à sequência dos primeiros 16 aminoácidos) interagem

com L11 e/ou L42 (Figura 2C) (Schmidt *et al.*, 2015). Além disso, este trabalho mostra que há uma interação física entre a arginina da posição 27 (R27) de eIF5A e o tRNA presente no sítio P do ribossomo e, ainda, que a hipusina de eIF5A interage com o nucleotídeo da posição 76 do tRNA-Pro presente no sítio P, facilitando assim a tradução de resíduos consecutivos de prolina (Schmidt *et al.*, 2015).

Por fim, vale ressaltar que todas estas análises foram realizadas utilizando ribossomos associados com o complexo Ski que, em leveduras, está associado à degradação de mRNA aberrantes. Sendo assim, é, pela primeira vez, sugerido um possível papel para eIF5A no controle de qualidade de mRNA aberrantes (Schmidt *et al.*, 2015).

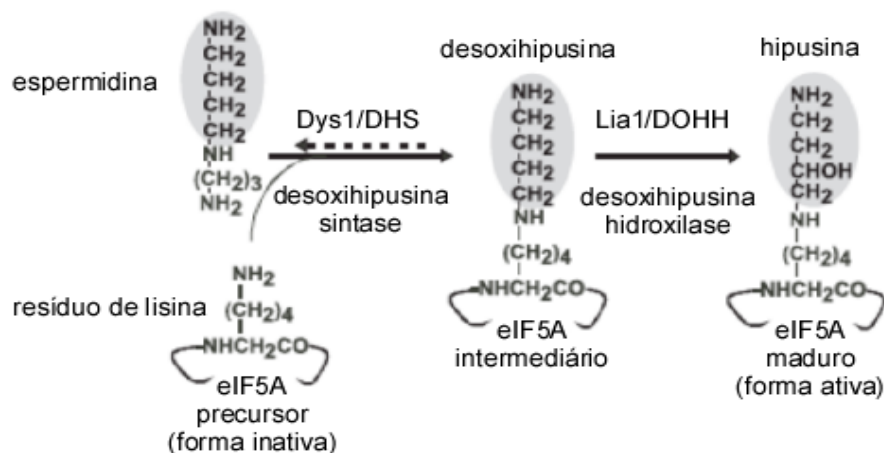


Figura 1. Via de biossíntese do resíduo de aminoácido hipusina no precursor de eIF5A. Esquema simplificado da modificação pós-traducional de eIF5A. A porção 4-aminobutil proveniente da poliamina espermidina está sombreada e é transferida ao resíduo de lisina do precursor inativo de eIF5A por meio da ação da enzima desoxihipusina sintase (Dys1 em levedura, DHS em humanos). O intermediário resultante, agora contendo desoxihipusina, é posteriormente hidroxilado pela enzima desoxihipusina hidroxilase (Lia1 em levedura, DOHH em humanos), o que resulta na ativação de eIF5A. As cadeias laterais da lisina, desoxihipusina e hipusina estão destacadas (Park, 2006).

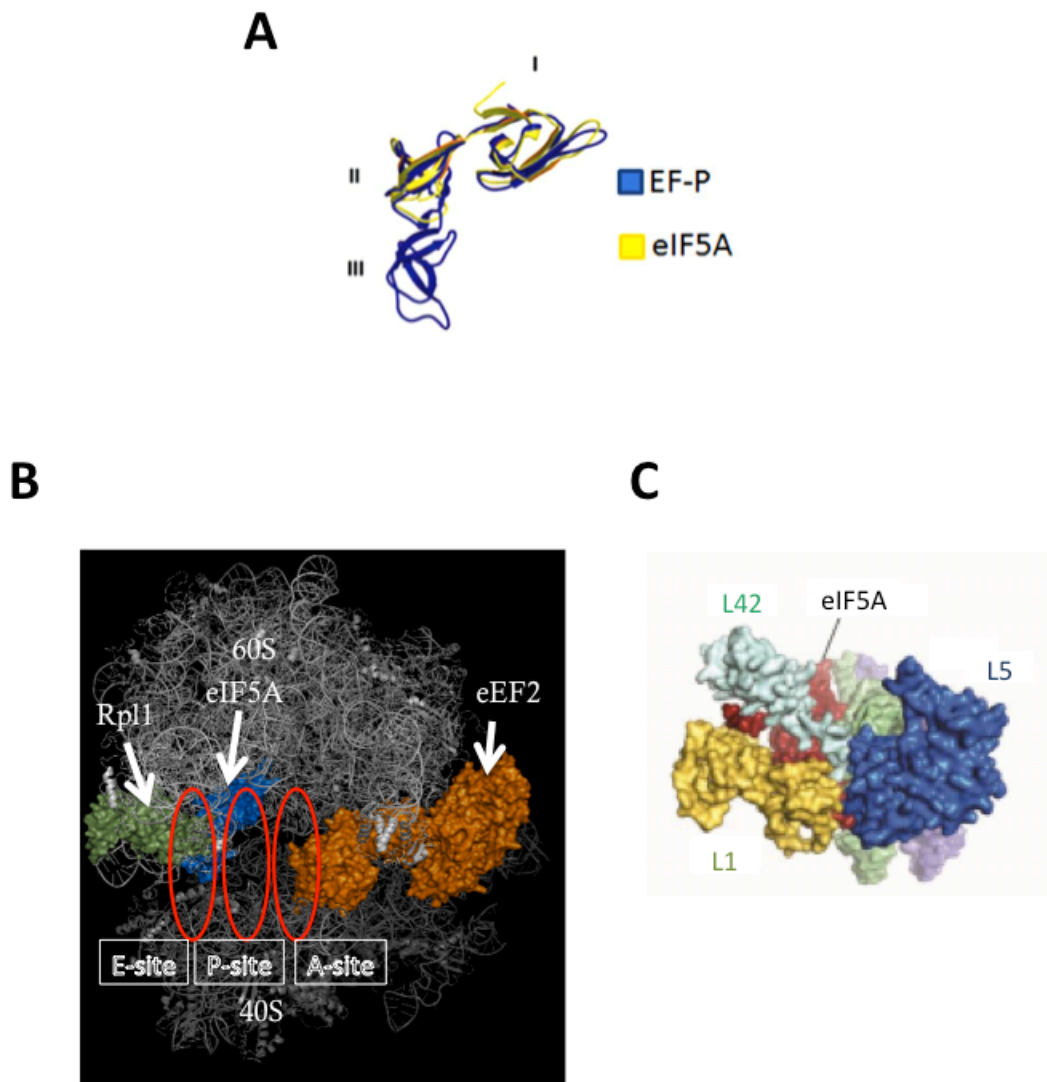


Figura 2. Estrutura da proteína eIF5A e sua localização no ribossomo 80S de levedura. (A) Estrutura de eIF5A (amarelo) mostrando os domínios N-terminal (domínio I) e C-terminal (domínio II) em sobreposição com os domínios I e II da estrutura de EF-P (azul) (Hanawa-Suetsugu *et al.* 2004). **(B)** Modelagem molecular utilizando a estrutura do ribossomo 80S ligado a eEF2 e a de eIF5A, baseada no posicionamento conhecido de EF-P em ribossomos 70S (Danuza Rossi, dados não publicados). **(C)** Localização de eIF5A no ribossomo 80S de levedura obtida por *Cryo-EM*, evidenciando as interações físicas com L1 e L42 (Schmidt *et al.*, 2015).

1.2. A proteína ribossomal L1

Rpl1 (*Ribosome Protein Large 1*), também conhecida como L1, é uma proteína estrutural da subunidade 60S do ribossomo, essencial para viabilidade celular e que não é encontrada livre no citosol. Como acontece com outras proteínas ribossomais, os genes de *RPL1A* e *RPL1B* são parálogos e codificam proteínas 100% idênticas. No entanto, a expressão de *RPL1B* é cerca de 2 vezes maior em relação à expressão de *RPL1A*, de maneira que, apesar de serem genes reduntantes, o efeito do nocaute de *RPL1B* é relativamente mais severo que o de *RPL1A* (Petitjean *et al.*, 1995, McIntosh *et al.*, 2011).

Apesar da diferença no grau de severidade dos nocautes, a superexpressão de L1A recupera o defeito causado pelo nocaute de L1B, demonstrando que o defeito não é parálogo específico (McIntosh *et al.*, 2011).

Diferentemente das demais proteínas ribossomais, o nocaute de RPL1B (*rpl1BΔ*) apresenta fenótipo de crescimento lento além da diminuição discreta do pico da subunidade 60S e da quantidade baixa de *halfmeres* (a presença de halfmer indica um excesso do pré complexo 43S parados no mRNA esperando pela subunidade 60S (Rotenberg *et al.*, 1988)), no entanto, apresenta redução nos níveis de polissomos mais pesados, o que pode representar um defeito no início da tradução (McIntosh *et al.*, 2011).

Ainda, em perfil polissomal de linhagens *rpl1BΔ*, apesar de se manter constante nos polissomos, a proteína L1 diminui cerca de dois terços no pico de 60S e metade no pico de 80S o que indica que o ribossomo pode se montar sem L1, mas estes ribossomos não se engajam na tradução.

Em *E. coli*, embora L1 não seja essencial, cepas sem esta proteína perdem cerca de 50% da atividade em comparação com a selvagem (Subramanian e Dabbs, 1980). Ainda em *E. coli*, foi também demonstrado haver interação física entre o domínio II de EF-P e L1 (Blaha *et al.*, 2009).

Mais recentemente foi sugerido uma função importante para L1. É conhecido que uma sequência com pelo menos quatro códons CGA causa uma parada na tradução (*ribosome stalling*), pois foi demonstrado que a tradução destes códons de arginina é facilitada quando há depleção do gene *RPL1B*

(Letzring *et al.*, 2013). Apesar dos dados, ainda há necessidade de mais estudos para mostrar se o aumento da tradução dos códons CGA é devido à redução da tradução geral causado pela deleção de Rpl1B ou algum papel específico desta proteína.

1.3. O complexo *Ribosome Quality Control* (RQC)

O complexo de *Ribosome Quality Control* (RQC) desempenha um mecanismo de controle de qualidade em um ribossomo impedido de prosseguir a síntese proteica durante a elongação, ou seja, um ribossomo em *stalling*. Foi demonstrado que este complexo atua para tentar liberar ribossomos em *stalling* após a tradução de resíduos consecutivos de aminoácidos básicos (sequência polibásica), como uma sequência de 12 lisinas. Estes peptídeos com 12 lisinas causam o *stalling* devido à interação eletrostática entre a carga positiva dos resíduos de aminoácidos com o interior do túnel de saída do ribossomo, que possui carga negativa (Dimitrova *et al.*, 2009). Utilizando um repórter com sequência polibásica, identificou-se o RQC como um complexo de controle de qualidade cotraducional que atua degradando o peptídeo nascente na presença de *stalling* no ribossomo e liberando os ribossomos associados a este tipo de peptídeo para que possam ser engajados novamente no processo celular de tradução (Brandman *et al.*, 2012).

Inicialmente, a proteína Ltn1 foi associada com degradação de peptídeos nascentes em repórteres com sequência polibásica (Bengtson e Joazeiro 2010). Após esta caracterização inicial, foram realizados vários ensaios de interação genética e física, o que levou à caracterização do complexo RQC: Ltn1/Rkr1 (E3 ubiquitina ligase), Tae2/Rqc2, Rqc1 e Cdc48 (Brandman *et al.*, 2012; Defenouillère *et al.*, 2013; Verma *et al.*, 2013).

Atribuiu-se a Tae2 a função iniciadora de formação do complexo RQC. Tae2 reconhece e se liga ao peptidil tRNA não hidrolisado presente no sítio P da subunidade 60S do ribossomo que sofreu *stalling*. Adicionalmente, Tae2 se liga em torno do 28S rRNA, na hélice H69, que também é um sítio de ligação da subunidade 40S. Levando-se em conta o tamanho da proteína Tae2, de

aproximadamente 120 kDa, este dado sugere que Tae2 também tenha a função de impedir a reassociação do ribossomo, ajudando assim na estabilização de Ltn1 na subunidade 60S do ribossomo que sofreu *stalling*, uma vez que Ltn1 é incapaz de se ligar ao ribossomo 80S (Lyumkis *et al.*, 2014; Defenouillère *et al.*, 2013). Mais recentemente, foi mostrado que Tae2 promove o recrutamento do tRNA de alanina e treonina, desencadeando a formação de uma pequena cadeia peptídica contendo repetições destes dois aminoácidos e de maneira independente de mRNA ou da subunidade 40S do ribossomo. Esta cadeia peptídica induzida por Tae2 pode ser responsável por identificar o ribossomo que sofreu *stalling* e otimizar o processo de controle de qualidade da célula (Shen *et al.*, 2014) (Figura 3). Após Ltn1 ser recrutada, esta induz a ubiquitinação do peptídeo nascente. Após ser ubiquitinado, o peptídeo nascente é removido do túnel de saída do 60S pela ATPase Cdc48 e, então, degradado pelo proteassomo (Brandman *et al.*, 2012; Defenouillère *et al.*, 2013; Verma *et al.*, 2013)

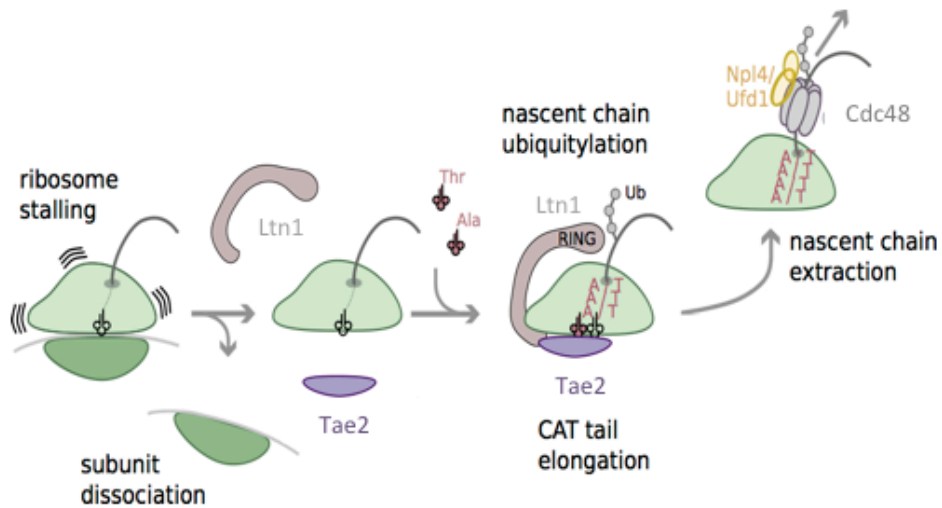


Figura 3- Modelo de funcionamento do complexo RQC. Após ocorrer a parada na tradução do 80S, a subunidade 40S se dissocia. Ltn1 e Tae2 reconhecem uma sinalização do complexo peptídeo nascente - tRNA - 60S e ligam-se na subunidade 60S com a função de ubiquitinar (Ub) o peptídeo nascente que emerge no túnel de saída. Cdc48 e seus co-fatores Npl4 e Ufd1 têm a função remover o peptídeo nascente da subunidade 60S e disponibilizá-lo para degradação pelo proteassomo. Tae2 liga-se no complexo sítio P – tRNA e inicia a elongação de uma cadeia peptídica denominada cauda CAT pelo recrutamento de tRNA Ala (IGC) e tRNA Thr (IGU) para o sítio A. A tradução desta cauda é modulada por Tae2 e não necessita a presença da subunidade 40S do ribossomo (adaptada de Shen *et al.*, 2015).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

Ampliar o conhecimento acerca das interações de eIF5A com eEF2 e Rpl1 e verificar uma possível correlação funcional entre eIF5A e os fatores que compõem o complexo *Ribosome Quality Control* (RQC)

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Análise da interação física entre eIF5A e eEF2.

- Análise da interação física direta entre eIF5A e eEF2, utilizando o sistema de duplo-híbrido em levedura.
- Análise da interação física entre eIF5A e eEF2 via complexos ribossomais.
- Investigação da presença de eEF2 e outros fatores relacionados à tradução em ribossomos portando eIF5A.

2.2.2. Análise da interação funcional entre eIF5A e a proteína ribossomal L1.

2.2.3. Análise da interação funcional entre eIF5A e o complexo RQC (Ribosome Quality Control).

- Análise de interação genética entre mutantes de eIF5A e dos fatores Ltn1 e Tae2 do complexo RQC.
- Investigação do papel do complexo RQC em *stalling* de poliprolinas.
- Análise da participação de eIF5A no funcionamento do complexo RQC e na formação de agregados proteicos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

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

Linhagem	Genótipo	Origem
VZL1074	<i>MAT_a ura3 leu2 his3</i> <i>kanMX4-tetOpr-TIF51A ura3::CMV-tTA</i>	Coleção do laboratório
VZL1256	<i>MAT_a can1Δ::STE2pr-Sp_his5 lyp1Δ his3Δ leu2Δ</i> <i>ura3Δ met15Δ TIF51A::natMX4</i>	Coleção do laboratório
VZL1257	<i>MAT_a can1Δ::STE2pr-Sp_his5 lyp1Δ his3Δ</i> <i>leu2Δ ura3Δ met15Δ tif51A-1::natMX4</i>	Este trabalho
VZL1259	<i>MAT_a can1Δ::STE2pr-Sp_his5 lyp1Δ his3Δ leu2Δ</i> <i>ura3Δ met15Δ tif51A^{K56A}::natMX4</i>	Coleção do laboratório
VZL1299	<i>MAT_a ura3 his3</i> <i>kanMX4-tetOpr-TIF51A ura3::CMV-tTA</i> <i>ltn1::LEU2</i>	Este Trabalho
VZL1300	<i>MAT_a ura3 leu2</i> <i>kanMX4-tetOpr-TIF51A ura3::CMV-tTA</i> <i>tae2::HIS3</i>	Este Trabalho
VZL1309	<i>MAT_a ura3</i> <i>kanMX4-tetOpr-TIF51A ura3::CMV-tTA</i> <i>ltn1::LEU2 tae2::HIS3</i>	Este Trabalho
VZL1314	<i>MAT_a can1Δ::STE2pr-Sp_his5 lyp1Δ his3Δ leu2Δ</i> <i>ura3Δ met15Δ tif51A^{K56A}::natMX4 rpl1B::KanMX4</i>	Este Trabalho
VZL1315	<i>MAT_a can1Δ::STE2pr-Sp_his5 lyp1Δ his3Δ leu2Δ</i> <i>ura3Δ met15Δ tif51A^{K56A}::natMX4 tae2::KanMX4</i>	Este Trabalho
VZL1316	<i>MAT_a can1Δ::STE2pr-Sp_his5 lyp1Δ his3Δ leu2Δ</i> <i>ura3Δ met15Δ tif51A-1::natMX4 tae2::KanMX4</i>	Este Trabalho
VZL1317	<i>MAT_a can1Δ::STE2pr-Sp_his5 lyp1Δ his3Δ leu2Δ</i> <i>ura3Δ met15Δ tif51A^{K56A}::natMX4 ltn1::KanMX4</i>	Este Trabalho

Tabela 2. Plasmídeos utilizados neste trabalho.

Plasmídeo	Características	Origem
pSV20	<i>URA3, 2μ</i>	Coleção do Laboratório
pSV36	<i>TIF51A URA3, 2μ</i>	Coleção do Laboratório
pSV60	<i>URA3, CEN</i>	Coleção do Laboratório
pSV138	<i>TIF51A, URA3, CEN</i>	Coleção do Laboratório
pSV272	<i>EFT2, TRP1, 2μ</i>	Coleção do Laboratório
pSV285	<i>TIF51A, LEU2, 2μ</i>	Coleção do Laboratório
pSV	<i>DYS1, TRP1, 2μ</i>	Coleção do Laboratório
pSV	<i>DYS1, TRP1, 2μ</i>	Coleção do Laboratório
pSV	<i>PUB1, TRP1, 2μ</i>	Coleção do Laboratório
pSV1563	<i>FLAG-2A-HIS3-P3-4HA, 2μ, URA3</i>	Este Trabalho
pSV1564	<i>FLAG-2A-HIS3-P6-4HA, 2μ, URA3</i>	Este Trabalho
pSV 1566	<i>FLAG-2A-HIS3-4HA, 2μ, URA3</i>	Bengtson e Joazeiro 2010
pSV 1567	<i>FLAG-2A-HIS3-K12-4HA, 2μ, URA3</i>	Bengtson e Joazeiro 2010
pSV1609	<i>FLAG-EAP1, LEU2, 2μ</i>	Este Trabalho

Tabela 3 - Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.

Oligonucleotídeo	Descrição
<i>P(n)_F</i>	ATTGGCGGCCGCTATCCGTATGACGTCCCGGACTATGCATATCC GTATGACGTCCCGGACTATGCATATCCGTATGACGTCCCGGACTA TGCATAACCCGGGCGCGGATCCTAGTGACACC
<i>P(3)_RV</i>	CAATGCGGCCGCGCTGCATAGTCCGGGACGTCATACGGATATGGT GGTGGACCCGCGCCGGATCCCATAAAAAAC
<i>P(6)_RV</i>	CAATGCGGCCGCGCTGCATAGTCCGGGACGTCATACGGATATGGT GGTGGTGGTGGTGGACCCGCGCCGGATCCCATAAAAAAC
<i>FLAG-EAP1_FW</i>	CGGGATCCACAATGGACTACAAAGACGATGACGACAAGGAACTC AACGACCCTTC
<i>FLAG-EAP1_RV</i>	CCGCTCGAGTTATTTGAAACTTAGCCTGTTACCTGTGCTAG

3.2. MÉTODOS

A manutenção, o cultivo das linhagens de *S. cerevisiae* e de *E. coli*, a composição e o preparo dos meios de cultura e soluções e os protocolos das técnicas utilizados neste trabalho seguiram procedimentos padrão descritos nos manuais de laboratório (Guthrie e Fink 1991; Ausubel 2014; Amberg 2005).

3.2.1. Transformação de levedura

Inicialmente, uma colônia de *S. cerevisiae* foi inoculada em 5 mL de meio apropriado e incubada a 25°C sob agitação por um período de 16 horas. Após esse período, 500 µL da cultura foram centrifugados a 16.000 *xg* por 5 segundos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1 mL de LiAc 100 mM e incubadas sob agitação por 15 minutos a 25°C.

Terminado esse período, as células foram centrifugadas na condição anterior por 5 segundos e os seguintes componentes foram sequencialmente adicionados: 480 µL de PEG 4000 (50%), 72 µL de LiAc 1 M, 100 µL de DNA carregador (DNA de esperma de salmão; 2 mg/mL), 5 µL de DNA plasmidial a ser transformado e 63 µL de água Milli-Q estéril. O conteúdo foi ressuspensionado e logo em seguida incubado por 20 minutos a 42°C para choque térmico. As células foram centrifugadas a 16.000 xg por 10 segundos e ressuspensionadas em 100 µL de água Milli-Q estéril. A seguir, foram plaqueadas em meio seletivo e incubadas na temperatura adequada até a obtenção de colônias.

3.2.2. Teste de crescimento celular

As linhagens de interesse foram cultivadas em 5,0 mL de meio apropriado (YPD ou SC) até atingir concentração celular correspondente à $D.O_{600nm} = 0,6$. As células foram centrifugadas em volume adequado de cultura a 600 xg por 7 minutos e ressuspensionadas em meio de cultura apropriado para concentração final de $2,5 \times 10^8$ células/mL. Foram aplicados 200 µL de cada amostra no primeiro poço da microplaca e os outros poços foram preenchidos (5 colunas) com 180 µL de meio de cultura apropriado. Em seguida, foram realizadas cinco diluições seriadas (1:10) homogeneizando bem em cada etapa. Com ajuda de micropipetador multicanal, foram aplicados 2,5 µL das amostras em meio de cultura apropriado. As placas foram incubadas nas temperaturas de interesse pelo tempo adequado.

3.2.3. Duplo-híbrido em *S. Cerevisiae* (Sistema da linhagem L40)

O sistema de duplo-híbrido da linhagem L40 é baseado nas propriedades das proteínas Gal4 de levedura e LexA de procarioto e utiliza a linhagem L40 para investigar interação física entre duas proteínas. Esta linhagem contém os dois genes repórteres do sistema de duplo-híbrido *HIS3* e *lacZ* e a interação física é identificada pela capacidade de gerar ativação destes genes repórteres. O gene *TIF51A* foi clonado no vetor plasmidial pACT para a produção

da proteína em fusão com domínio de ativação de Gal4 (Gal4-AD) enquanto o gene codificador de eEF2, EFT2, foi clonado no vetor pBTM116, para produzir a proteína em fusão com a proteína de ligação ao DNA LexA (pBTM116-EFT2). O próximo passo foi introduzir ambos plasmídeos na linhagens L40.

Como controles do experimento, a linhagem L40 foi transformada também com a construção pACT-eIF5A juntamente com pBTM-Dys1 e pBTM-Lia1 que são as proteínas presentes na modificação pós-traducional de eIF5A e que, neste ensaio, foram utilizadas como controle de interação forte e fraco, respectivamente. Além disso, também foi utilizada a construção pBTM-Pub1 como controle negativo uma vez que a proteína Pub1 não possui interação física com eIF5A.

Os transformantes foram cultivados em meio SC-leu,-trp (seleção apenas para os plasmídeos) e então testados utilizando os fenótipos His⁺ e β -galactosidade⁺ (atividade de β -galactosidade) através de teste de diluição seriada.

3.2.3.1. Teste de crescimento em meio desprovido de histidina

Protocolo idêntico ao descrito em 3.2.2., porém, os meios utilizados para crescimento foram SC-leu-trp (controle de crescimento) e SC-leu-trp-his (observação da expressão do gene repórter *HIS3*). Todas as placas foram incubadas a 30°C por 3 dias.

3.2.3.2. Ensaio de β -galactosidase

As linhagens de interesse foram cultivadas a 30°C em 5 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 ressuspensas na concentração de $2,5 \times 10^8$ células/mL. 3 μ L da suspensão foram aplicados sobre uma membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences) sobre meio sólido YPD, e deixadas crescer durante uma noite a 30°C. A membrana foi então transferida para uma nova placa de petri e as células foram lisadas por congelamento durante uma hora em freezer -80°C com as células voltadas para cima. Um papel de filtro (Whatman) foi colocado em uma placa de

petri de 100 mm e umidecido com 1,5mL de Tampão Z (Na_2HPO_4 60 mM, NaH_2PO_4 40 mM, KCl 10 mM, MgSO_4 1 mM pH7,0) adicionado de X-gal (0,5 mg/mL). A membrana, com as células voltadas para cima, foi colocada sobre este papel de filtro e incubada a 30°C em câmara úmida até o desenvolvimento de coloração azul.

3.2.4. GST-pulldown

3.2.4.1 – Preparação do extrato celular e *crosslinking*

A linhagem VZL1074 transformada com pSV36 ou pSV20 e foram crescidas em 50 mL de meio de cultura SC-URA e durante 16h. A seguir, foram diluídas em 400mL do meio e crescer até a $\text{D.O.}_{600\text{nm}} = 0,8$. Após o inóculo atingir esta D.O., as células foram tratadas com formaldeído para uma concentração final de 1%, durante 30 minutos a temperatura de 4°C. Para parar a ação do formaldeído, as células foram incubadas com 0,125 mM de glicina por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, centrifugaram-se as culturas em garrafas, previamente geladas, a 3.500 xg por 5 minutos a 4°C. As células foram lavadas com 10,0 mL de tampão (Tris - HCl 20 mM pH 7,5; KAc 50 mM; MgCl_2 10 mM) e, então, transferi-las para tubo cônico de 15 mL e centrifugá-las a 3.500 xg, por 5 minutos a 4°C. Para realizar a lise, as células foram ressuspensas em 350 μL de tampão (Tris - HCl 20 mM pH 7,5; KAc 50 mM; MgCl_2 10 mM) adicionado de inibidores de protease (PLAC 1mM e DTT - ditioneitol 1mM) e transferidas para um tubo de 1,5 mL contendo 1 g de pérolas de vidro, as células foram então submetidas à agitação em aparelho Fastprep MPbio (três ciclos de 20 segundos, na velocidade 4.0, com intervalos de 1 minuto). Os lisados obtidos foram transferidos para um novo tubo e, em seguida, centrifugados a 14.000 xg por 30 minutos a 4°C, para clarificação. Por fim, sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL e medida a $\text{D.O.}_{260\text{nm}}$ da amostra.

3.2.4.2 – Clivagem dos polissomos com RNase A

Ao extrato celular clarificado, foram adicionada RNase A na proporção de 1mg de proteína total para 30 μg de RNase A e a amostra foi incubada em temperatura ambiente por 30 minutos. A eficiência desta etapa de clivagem foi

checada em gradiente de sacarose (perfil polissomal) antes de prosseguir com o ensaio de *GST-pulldown*.

3.2.4.3 – Incubação do extrato com a resina

200 µL de resina Glutathiona Sepharose 4B (GE Healthcare) foram lavados por 3 vezes com 1,0 mL de tampão (Tris - HCl 20 mM pH 7,5; KAc 50 mM; MgCl₂ 10 mM) e incubados com 1,2 mg de proteína total do extrato celular por 2 horas sob agitação em agitador rotativo a 4°C. Posteriormente, centrifugaram-se as amostras por 1 minuto a 10.000 rpm, removeram-se os sobrenadantes e lavaram-se 8 vezes as resinas com 1,5mL de tampão (Tris - HCl 20 mM pH 7,5; KAc 50 mM; MgCl₂ 10 mM). Após as lavagens, as resinas foram ressuspensas em 400 µL de tampão de amostra para proteínas e fervidas por 96°C por 5 minutos.

3.2.5. Perfil polissomal

3.2.5.1 – Preparação do gradiente de sacarose

Os gradientes foram preparados adicionando-se, subsequentemente, em tubo de polialômero (14X89 mm/12,5 mL - Beckman), 6,0 mL de soluções de sacarose 10% e 50% em tampão (Tris - HCl 20 mM pH 7,5; KAc 50 mM; MgCl₂ 10 mM), utilizando uma seringa de 10 mL e agulha de extremidade não-perfurante de 15 cm. Em seguida, os tubos foram colocados para equilibrar o gradiente no aparelho Gradiente Master iP modelo 107 (BIOCOMP).

3.2.5.2 – 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-41.Ti, utilizando ultracentrifuga Beckman. Foram utilizados para o fracionamento dos gradientes de sacarose contendo o extrato de levedura separado por densidade, o sistema da Bio-Rad e um fluxo contínuo de 1,0 mL/minuto de solução de sacarose 60% e a D.O._{254nm} foi determinada por um leitor UV conectado ao sistema.

3.2.6. Western blot

3.2.6.1 – Transferência úmida

As amostras proteicas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) e transferidas para membrana de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas com tampão PBST (PBS 1X, 0,25% Tween-20) contendo leite desnatado a 10%, por 30 minutos. Em seguida, as membranas foram incubadas com uma diluição adequada de soro primário em PBST contendo 5% de leite desnatado por 2 horas a temperatura ambiente. Após esse período, as membranas foram lavadas por três vezes com PBST e incubadas novamente com anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase, diluído corretamente em PBST contendo 5% de leite desnatado, por uma hora a temperatura ambiente. Após três novas lavagens com PBST, as membranas foram tratadas com reagentes quimioluminescentes (0,1 M Tris-HCl pH 8,5; 1,25 mM luminol e 0,250 mM ácido *p*-cumárico) e expostas a filme autorradigráfico.

3.2.6.2 – Transferência semiseca

As amostras proteicas foram separadas por eletroforese em gel de Tris-Glicina 4-20% (Invitrogen) e transferidas para membrana de PVDF. As membranas foram bloqueadas com tampão TBST (40mM Tris-HCl pH 7,4; 150mM NaCl; 0,1% Tween-20) contendo leite desnatado a 5%, por 60 minutos. Em seguida, incubadas com uma diluição adequada de soro primário em TBST contendo 3% de BSA por 1 hora a temperatura ambiente. Após esse período, membranas foram lavadas três vezes com TBST e incubadas novamente com anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase, diluído corretamente em TBST contendo 5% de leite desnatado, por uma hora a temperatura ambiente. Após três novas lavagens com TBST, as membranas foram tratadas com *pierce® ECL western blotting substrate (Thermo Scientific)* por 2 minutos e expostas a filme autorradigráfico. Este protocolo foi utilizado durante o período no laboratório do Dr. Claudio Joazeiro e gerou da figura 18 à 24 deste trabalho.

3.2.7. Cruzamento, esporulação e dissecção de *S. cerevisiae*

A técnica descrita a seguir foi realizada na obtenção de todas as linhagens utilizadas nos testes de interação genética.

3.2.7.1. Cruzamento

As linhagens haplóides de interesse foram cruzadas na superfície de ágar YPD e incubadas por uma noite a 25°C. A seleção de diplóides foi feita 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 de cada linhagem. As placas foram incubadas a 25°C até o aparecimento de massa celular no meio duplo seletivo. O crescimento obtido foi repassado para o mesmo meio seletivo, para isolamento de colônias dos diplóides.

3.2.7.2. Esporulação

Após seleção adequada do diplóide, foi preparado inóculo deste em meio S-SPO líquido (2,5 g de extrato de levedura; 15 g acetato de potássio; 40 mg de adenina, uracila e tirosina; 20 mg de histidina, leucina, lisina, triptofano, metionina e arginina; 100 mg de fenilalanina e 350 mg de treonina em 1 litro de água destilada) e incubado a 25°C, sob agitação, até a formação de ascos (cerca de 5 a 10 dias).

3.2.7.3. Dissecção

Foram centrifugados momentaneamente 200 µL da cultura submetida à esporulação. O sobrenadante foi removido e as células ressuspendidas em 100 µL de sorbitol 20%. A quebra de parede do asco se deu com a adição de 1,5 µL de zimoliase (10µg/µL, β-glucuronidase) e incubação da reação a temperatura ambiente por 8 minutos. Em seguida, foi adicionado 1 mL de sorbitol 20% para diluir a reação de digestão, e as células ficaram em gelo até a dissecção. A dissecção dos ascos foi realizada, utilizando microscópio de dissecção, em placa de meio YPD, que posteriormente foi incubada a 25°C até a obtenção de colônias isoladas.

3.2.7.4. Caracterização de tétrades

As marcas de auxotrofia para os haplóides obtidos foram determinadas

utilizando diferentes meios de cultura seletivos. O *mating type* foi determinado através do cruzamento com cepas de *mating type* conhecido e seleção dos diplóides em meio seletivo apropriado. Outras marcas, como resistência a antibióticos, também foram analisadas utilizando placas de meio YPD/SC- ura contendo esses reagentes.

3.2.8. Curva de crescimento e cálculo do tempo de dobramento

As linhagens de interesse foram cultivadas em 3,0 mL de meio YPD por 24 horas. Estas linhagens foram diluídas para 10 mL de cultura em D.O._{600nm} = 0,15 e a D.O._{600nm} foi medida a cada duas horas e plotar o gráfico usando o programa Office Excel. O tempo de dobramento foi calculado através do período que as linhagens necessitaram para dobrar de uma D.O._{600nm} = 0,30 para 0,60. Ambos experimentos foram realizados em triplicata biológica.

3.2.9. Recombinação homóloga

A técnica de recombinação homóloga foi utilizada na obtenção das linhagens VZL1299 (tetOpr TIF51A Δ ltn1) e VZL1309 (tetOpr TIF51A Δ ltn1 Δ tae2).

3.2.9.1. PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

As reações de PCR foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,5 mL contendo 1 μ M de cada oligonucleotídeo, 100 ng de DNA plasmidial, 1 U da enzima *Phusion* (Invitrogen), 1x tampão e 1 μ L de uma mistura de desoxiribonucleotídeos (10 mM cada), num volume final de reação de 50 μ L. As condições das reações foram estabelecidas de acordo com a temperatura de hibridização dos oligonucleotídeos utilizados. Após o último ciclo, a reação foi mantida a 72°C por 10 minutos e, a seguir, a 4°C até o momento da próxima etapa. Então, os produtos da reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% em TAE (Tris 40 mM, ácido acético glacial 0,11% e EDTA 1 mM), contendo 1 μ g/mL de brometo de etídio. Ao DNA foi adicionado tampão de amostra (azul de bromofenol 0,125%, xileno cianol 0,125% e glicerol 50%) e a

solução foi aplicada no gel. O gel foi submetido a voltagem de 100 V. O DNA foi visualizado utilizando luz ultravioleta e a imagem documentada utilizando o aparelho Alphamager 2200 (Alpha Innotech Corporation). A banda referente ao tamanho do gene amplificado (*LEU2* ou *HIS3*) foi recortada do gel e purificada utilizando o kit de purificação de gel de agarose (QIAGEN).

3.2.9.2. Transformação de levedura para recombinação homóloga

Inicialmente, uma colônia de *S. cerevisiae* (VZL1074) foi inoculada em 5 mL de meio apropriado e incubada a 25°C sob agitação por um período de 16 horas. Após esse período, estas células foram diluídas para 10 mL em uma D.O._{600nm} = 0,2 e novamente incubadas a 25°C sob agitação. Após a cultura atingir D.O._{600nm} = 0,6, as células foram centrifugadas a 8.000 xg por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1 mL de LiAc 100 mM e incubadas sob agitação por 15 minutos a 25°C. Terminado esse período, as células foram centrifugadas na condição anterior e os seguintes componentes foram na sequência adicionados: 280 µL de PEG 4000 (50%), 30 µL de LiAc 1 M, 20 µL de DNA carregador (DNA de esperma de salmão; 2 mg/mL), 2 µg de DNA a ser transformado e 50 µL de água Milli-Q estéril. O conteúdo foi ressuspensado e logo em seguida incubado por 45 minutos a 42°C para choque térmico. As células foram centrifugadas a 8.000 xg por 5 minutos e ressuspensas em 500 µL de YPD estéril e incubada a 25°C sob agitação por um período de 4 horas. A seguir, as células foram novamente centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* resuspensado em 200 µL de água Milli-Q estéril. As células foram plaqueadas em meio seletivo e incubadas na temperatura adequada até a obtenção de colônias.

3.2.10. Obtenção dos genes repórteres

Os genes repórteres deste trabalho foram construídos baseando-se no modelo usado por Bengtson e Joazeiro, 2010, que se utiliza de um plasmídeo que contém o promotor de GPD (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)

O primer *foward* contém um sítio da enzima de restrição *NotI*, 3 vezes a sequência que codifica para o *tag* HA e a região de hibridização complementar à sequência do vetor usado como molde para a reação. Por sua vez, o primer *reverse* possui também um sítio da enzima de restrição *NotI*, 1 sequência do *tag* HA, a sequência de resíduos de prolina (CCA) e uma região de hibridização complementar ao vetor, neste caso a hibridização ocorre na região correspondente ao gene *HIS3*. Após a reação de PCR, o produto amplificado foi checado em gel de agarose 0,8% e a banda adequada foi purificada com kit de purificação de gel de agarose (QIAGEN). O produto desta purificação de gel foi digerido com a enzima de restrição *NotI* por 3 horas a 37°C, sendo que na última hora desta reação foram adicionados 2 µL da enzima de restrição *DpnI* para degradar o DNA molde. Em seguida, esta amostra foi purificada utilizando o Kit de purificação de PCR (QIAGEN) e foi realizada a reação de ligação com 50 ng de DNA, 2 µL de tampão de ligase, 1 µL de ligase (NEB) e volume final de 20 µL e esta reação foi incubada por 2 h na temperatura ambiente. Por fim, foram utilizados 3 µL desta reação de ligação para transformação de bactéria (DH5α *High Efficiency*, INVITROGEN). A bactéria transformada foi plaqueada em meio seletivo. Das colônias selecionadas, foi realizado extração de DNA plasmidial (Kit de mini prep QIAGEN) e a clonagem foi confirmada por sequenciamento de DNA (Genewiz). A Figura 4 apresenta o esquema dos genes repórteres utilizados neste estudo.

3.2.11. Co-imunoprecipitação com tag de FLAG

Inocular a linhagem VZL1074 transformada com gene repórter em 5 mL de meio de cultura SC-URA e incubá-la por 16 horas. A seguir, diluir em 40mL do meio em D.O._{nm} = 0,3 e adicionar doxiciclina na concentração final de 10µg/mL e incubar por 19h, sob agitação, a 30°C. Em seguida, centrifugar as culturas a 3.500 xg por 10 minutos a 4°C. Lavar as células com 5,0 mL de tampão (Tris - HCl 20 mM pH 7,5; KAc 50 mM; MgCl₂ 10 mM) e, então, transferi-las para tubo cônico de 15 mL e centrifugá-las a 3.500 xg, por 5 minutos a 4°C. Para realizar a lise, ressuspender as células em 400 µL de tampão (Tris - HCl 20 mM pH 7,5;

KAc 50 mM; MgCl₂ 10 mM) adicionados de inibidores de protease (PLAC 1mM e DTT - ditioneitol 1mM), transferi-las para um tubo de 1,5 mL contendo 1 g de pérolas de vidro e submetê-las à agitação em aparelho Fastprep (três ciclos de 20 segundos, na velocidade 4.0, com intervalos de 1 minuto). Transferir o lisado obtido para um novo tubo e, em seguida, centrifugá-lo a 6.800 xg por 5 minutos a 4°C, para clarificação. Transferir o sobrenadante para um novo tubo de 1,5 mL e determinar a D.O._{260nm} da amostra.

Incubar 1 µg de anti-FLAG (α-M2-FLAG SIGMA) com 1 mg de proteína total do extrato celular por 2 horas sob agitação, em agitador rotativo a 4°C.

Lavar 20 µL de *beads* magnéticas (*Dynabeads Protein G Life Technologie*) por 3 vezes com 1,0 mL de tampão (Tris - HCl 20 mM pH 7,5; KAc 50 mM; MgCl₂ 10 mM), adicionar as *beads* lavadas à mistura anti-FLAG mais extrato celular e incubar por mais 2 horas sob agitação, em agitador rotativo a 4°C. Posteriormente, lavar as *beads* por 3 vezes com 1,0 mL de tampão (Tris - HCl 20 mM pH 7,5; KAc 50 mM; MgCl₂ 10 mM). Após as lavagens, ressuspender as *beads* em 15 µL de tampão de amostra para proteínas e ferver por 96°C por 5 minutos.

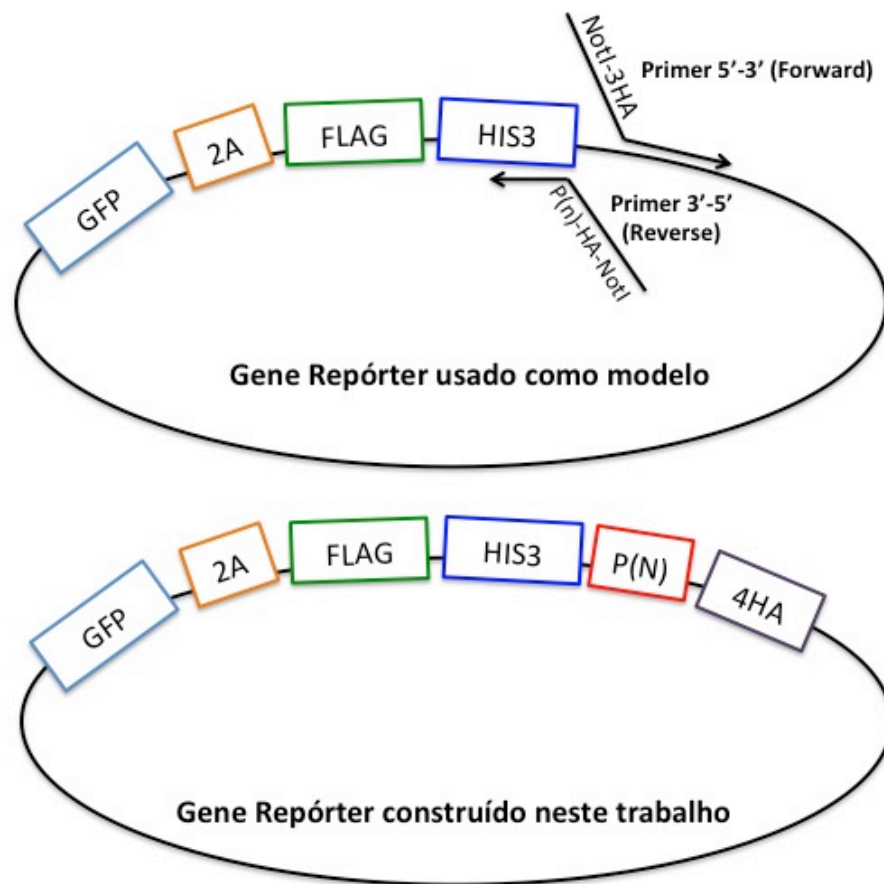


Figura 4. Esquema dos genes repórteres de *stalling* por poliprolina. Foi utilizado como molde para as reações de PCR, o mesmo repórter “K0” presente em Bengtson e Joazeiro, 2010. No primer 5'-3' foram inseridos um sítio de restrição da enzima *NotI* e três regiões codificadoras para HA na região C-terminal do gene repórter. O primer 3'-5' continha as sequências de prolinas (CCA), uma região codificadora para HA e também um sítio de restrição da enzima *NotI*. Os sítios de *NotI* foram inseridos para serem usados na reação de ligação do DNA, após a elongação do gene por PCR.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise da interação física entre eIF5A e eEF2

Apesar de eIF5A ter sido relacionada com início da tradução, mais recentemente, alguns grupos, incluindo o nosso, revelaram a associação de eIF5A com a elongação da tradução e uma relação funcional com eEF2 (Greggio *et al.*, 2009; Saini *et al.*, 2009). Baseados nestes dados, decidimos aprofundar os estudos da relação funcional entre eIF5A e eEF2.

4.1.1. Análise da interação física direta entre eIF5A e eEF2 utilizando o sistema de duplo-híbrido em levedura

É conhecido que existe uma interação física entre eIF5A e eEF2 dependente de ribossomos ativos (Zanelli *et al.*, 2006). Sendo assim, foi investigado se há interação direta entre estes fatores utilizando o sistema de duplo-híbrido *in vivo*. Neste sistema, a levedura modificada L40 contém os genes repórteres *HIS3* e *LacZ* cuja expressão é desencadeada pela proximidade de Gal4-AD (Gal4-activation domain, pACT-eIF5A) e LexA (pBTM116-eEF2). Inicialmente, os níveis das proteínas fusionadas expressas por estes vetores foram testadas por western blot (dados não mostrados). A ausência de crescimento em meio seletivo (SC-leu, -trp, -his) e da atividade de β -gal resultante da combinação de Gal4-eIF5A e LexA-eEF2 indicam que estes fatores não possuem interação física direta em ensaios de duplo-híbrido. (Figura 5).

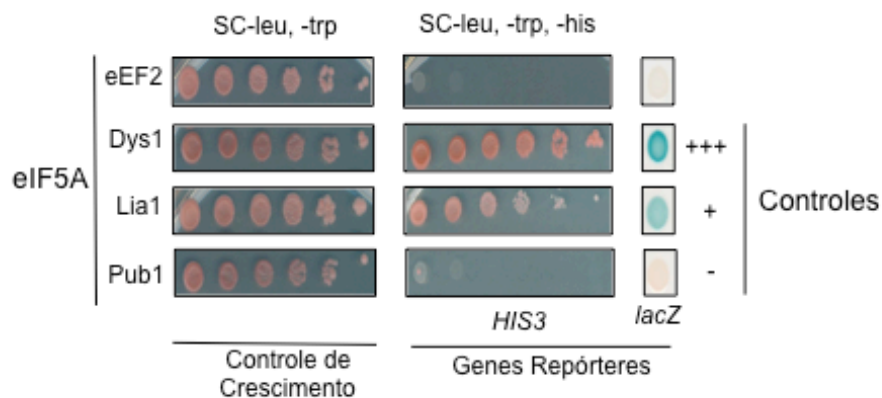


Figura 5. Análise da interação física direta entre eIF5A e eEF2 utilizando o sistema de duplo-híbrido. A linhagem L40 contendo pACT-eIF5A foi transformada com pBTM116-eEF2, Dys1, Lia1 ou Pub1. Foi realizada diluição seriada e os transformantes foram plaqueados em meio SC-leu,-trp (controle de crescimento) e SC-leu,-trp,-His (expressão de *HIS3*). As células foram repassadas para uma membrana de nitrocelulose para teste da atividade de β -gal (expressão de *lacZ*). A interação entre eIF5A e Pub1 foi utilizada como controle negativo, e eIF5A-Dys1 (interação forte) ou eIF5A-Lia1 (interação fraca) foram utilizados como controles positivos.

4.1.2. Análise da interação física entre eIF5A e eEF2 via complexos ribossomais

Para melhor compreender a interação física entre eIF5A e eEF2, optou-se por testar se ambos fatores estão presentes simultaneamente no mesmo ribossomo. Para tanto, foi estabelecido um novo protocolo do ensaio de GST-pulldown onde os polissomos são digeridos com RNase A antes de serem co-purificados com GST-eIF5A, conseguindo assim uma população de ribossomos homogênea em relação à presença de eIF5A.

4.1.2.1. Teste de funcionalidade da construção GST-eIF5A

Antes de iniciar os ensaios com a proteína de fusão GST-eIF5A, foi realizado o teste para comprovar a sua funcionalidade. Para isso, a linhagem VZL1074 (*tetO-TIF51A*), a qual possui controle de expressão de eIF5A endógena por promotor reprimível por tetraciclina, foi transformada com pSV20 (vetor GST vazio, 2 μ), pSV36 (GST-TIF51A, 2 μ), pSV60 (vetor vazio, *CEN*) ou pSV138 (TIF51A, *CEN*). Posteriormente, foi realizado o teste de diluição seriada e analisado crescimento em meio SC-ura, contendo 2% de galactose e adicionado ou não de 3 μ g/mL de doxiciclina (análogo de tetraciclina com eficiência mais alta). As linhagens transformadas com pSV20 e pSV60 (plasmídeos vazios) não foram capazes de crescer nestas condições, o que comprova a eficiência da inibição da expressão de eIF5A endógena pela doxiciclina. Já a linhagem transformada com o pSV138 apresentou crescimento comparável ao meio sem a droga, demonstrando assim a complementação pelo gene selvagem sem fusão com GST. A linhagem transformada com o pSV36 (GST-TIF51A, 2 μ) apresentou os mesmos padrões de crescimento que o controle sem a fusão (pSV138), o que comprova a funcionalidade desta proteína de fusão, possibilitando a sua utilização nos ensaios descritos a seguir (Figura 6).

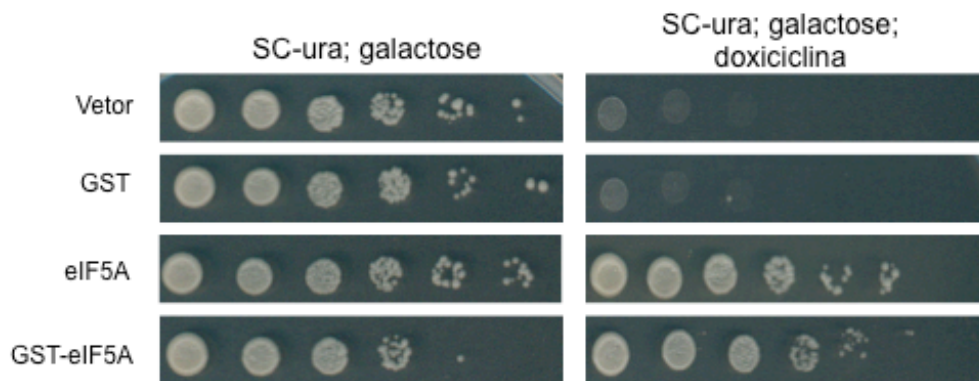


Figura 6. Teste de funcionalidade da proteína de fusão GST-eIF5A. A linhagem VZL1074 (*tetO-TIF51A*) transformada com pSV20 (GST), pSV60 (vetor *CEN* vazio), pSV138 (*TIF51A*, *CEN*) ou pSV36 (*GST-TIF51A*) foram submetidas ao teste de diluição seriada e plaqueadas em meio de cultura na ausência e na presença de 3 µg/mL de doxyciclina para testar a capacidade de complementação da levedura com eIF5A depletada pela construção plasmidial expressando GST-eIF5A.

4.1.2.2. Ensaio de co-purificação, após crosslinking, de ribossomos contendo GST-eIF5A

Existem várias maneiras de se realizar co-purificação de proteínas. Devido à experiência do nosso grupo bem como a disponibilidade dos reagentes necessários, optou-se pelo uso da técnica de “*GST-pulldown*”, utilizando a proteína de fusão GST-eIF5A funcional.

A estratégia utilizada aqui para isolar uma população homogênea de ribossomos que contenha eIF5A e analisar outros fatores ligados ao mesmo tempo aos mesmos ribossomos envolveu a padronização de um protocolo de *GST-pulldown* com GST-eIF5A, utilizando *crosslinking* por formaldeído e obtenção de monossomos pelo tratamento do extrato celular com RNase A.

Anteriormente, a utilização de co-purificação de fatores ligados a eIF5A por *GST-pulldown* foi realizada por nosso grupo (Zanelli *et al.*, 2006) e revelou que eIF5A se associa a ribossomos traducionalmente ativos. No entanto, a técnica utilizada possui um inconveniente pois leva à co-purificação de polissomos, isto é, eIF5A co-purifica polissomos contendo ribossomos em diferentes etapas da tradução e ligados ao mesmo mRNA, revelando um número maior de interações físicas indiretas de diferentes fatores com eIF5A, como esquematizado na Figura 7A.

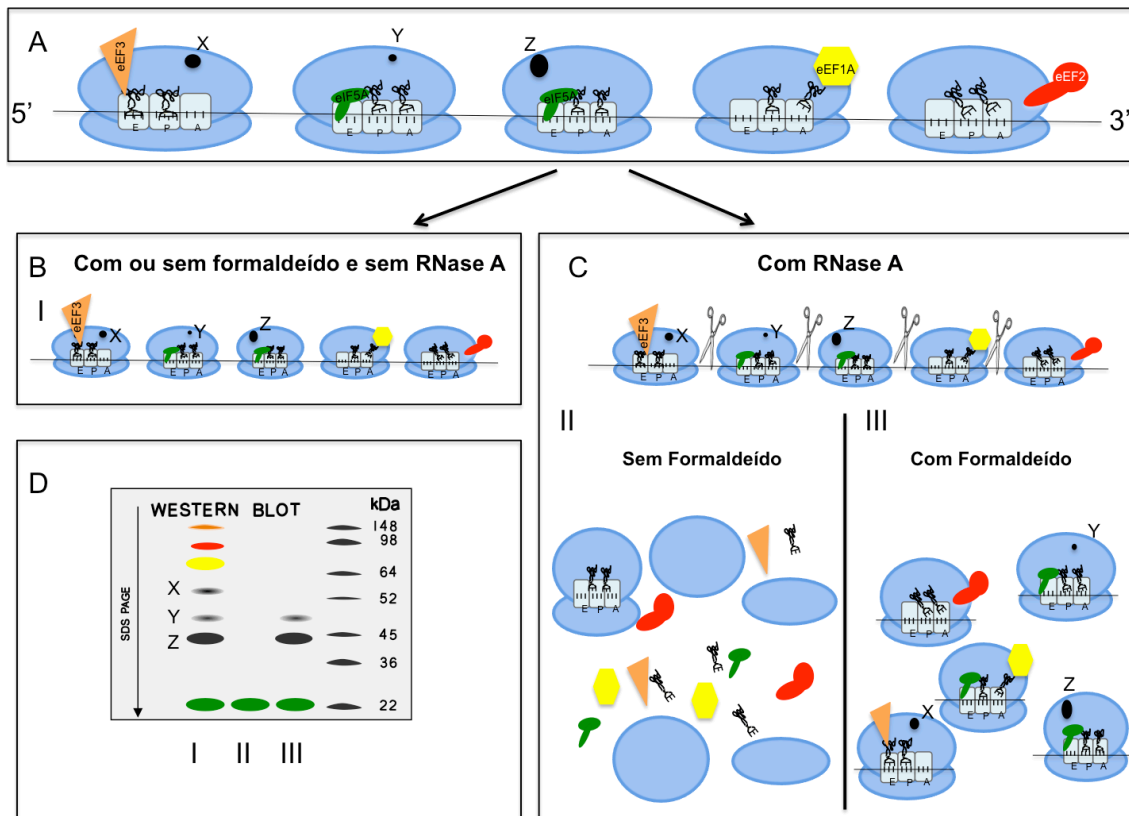
Para remover este inconveniente da técnica, foi proposto utilizar RNase A para digerir os mRNAs do extrato celular para obter amostra apenas contendo monossomos, para subsequente co-purificação. No entanto, foi demonstrado que a utilização de RNase A faz com que o complexo ribossomal perca uma série de componentes associados, entre eles, eIF5A (Jao e Chen, 2006), impossibilitando sua utilização. Para contornar este problema, foi proposto o tratamento deste extrato celular com formaldeído para indução de *crosslinking* entre os fatores ligados aos ribossomos em diferentes passos da elongação da tradução, levando à sua estabilização, o que possibilitaria separação destes monossomos por RNase A sem a perda de componentes da maquinaria de tradução (Figura 7C). Outro fator importante no uso de formaldeído para este experimento é o fato de não prejudicar a análise posterior das amostras por

espectrometria de massas (Sutherland *et al.*, 2008). A estratégia de co-purificação utilizada está esquematizada na Figura 8.

Assim, após geração de extratos celulares totais de linhagens produzindo GST ou GST-eIF5A tratadas com formaldeído, foi realizado um perfil polissomal das amostras antes e depois do tratamento com RNase A, para confirmar a efetividade do formaldeído e de RNase A. Como pode ser visto na Figura 9, a amostra não digerida apresenta os picos de 40S, 60S, 80S e polissomos característicos de um perfil polissomal de linhagem selvagem. Já na amostra digerida com RNase A, observamos um grande aumento do pico de 80S e ausência de polissomos, uma vez que todos os polissomos estão agora na forma de monossomos, ou seja, no pico correspondente a 80S.

Destes mesmos extratos celulares totais de que foram realizados os perfis polissomais, ou seja, linhagens produzindo GST ou GST-eIF5A tratadas com formaldeído, clivadas e não clivadas com RNase A, foi realizado o *GST-pulldown* seguindo o protocolo descrito em Materiais e Métodos e, em seguida, o resultado foi analisado por *western blot* de fatores da maquinaria de tradução anteriormente demonstrados por nosso laboratório como ligantes indiretos de eIF5A (Zanelli *et al.*, 2006). Na Figura 10, as canaletas L8 dos painéis A e B demonstram que o número total de lavagens da resina, após a incubação com o extrato, foi suficiente para eliminar o que não estivesse ligado especificamente à resina, ou seja, tudo que pudesse representar falsos positivos ao experimento. A comparação entre as co-purificações com GST-eIF5A (painel A) e GST (painel B) é necessária para observarmos a especificidade dos ligantes de eIF5A. A proteína ribossomal L5 está presente apenas no material eluído da co-purificação utilizando GST-eIF5A, demonstrando que GST-eIF5A, mas não GST sozinha, é capaz de co-purificar ribossomo em concentrações detectáveis por *western blot*. Além da proteína ribossomal L5, eEF2 também foi observado apenas no ensaio com GST-eIF5A, mas não com GST. Estes resultados estão de acordo com aqueles previamente observados sem a utilização de formaldeído (Zanelli *et al.*, 2006) e indicam que o *crosslinking* por formaldeído não altera as interações do complexo. Por outro lado, o tratamento com RNase

A manteve a co-purificação de L5 por GST-eIF5A, mas a interação com eEF2 foi perdida (Figura 10A). O dado de eEF2 ser co-purificado apenas com a amostra não digerida com RNase A é muito interessante pois sugere que eIF5A e eEF2 não se ligam simultaneamente ao ribossomo ou se ligam mas não ocupam o mesmo ribossomo por muito tempo.



(Figura elaborada pelo autor)

Figura 7. Representação esquemática das etapas envolvidas na técnica de co-purificação por GST-eIF5A utilizada neste trabalho. (A) Representação dos ribossomos traducionalmente ativos ligados a um mesmo mRNA. **(B)** Como é esperado que permaneça o mRNA sem tratamento com RNase A. **(C)** As modificações causadas no mRNA pelo tratamento com RNase A, na ausência ou na presença de tratamento com formaldeído. **(D)** Resultados esperados nos ensaios de co-purificação (Figura elaborada pelo autor).

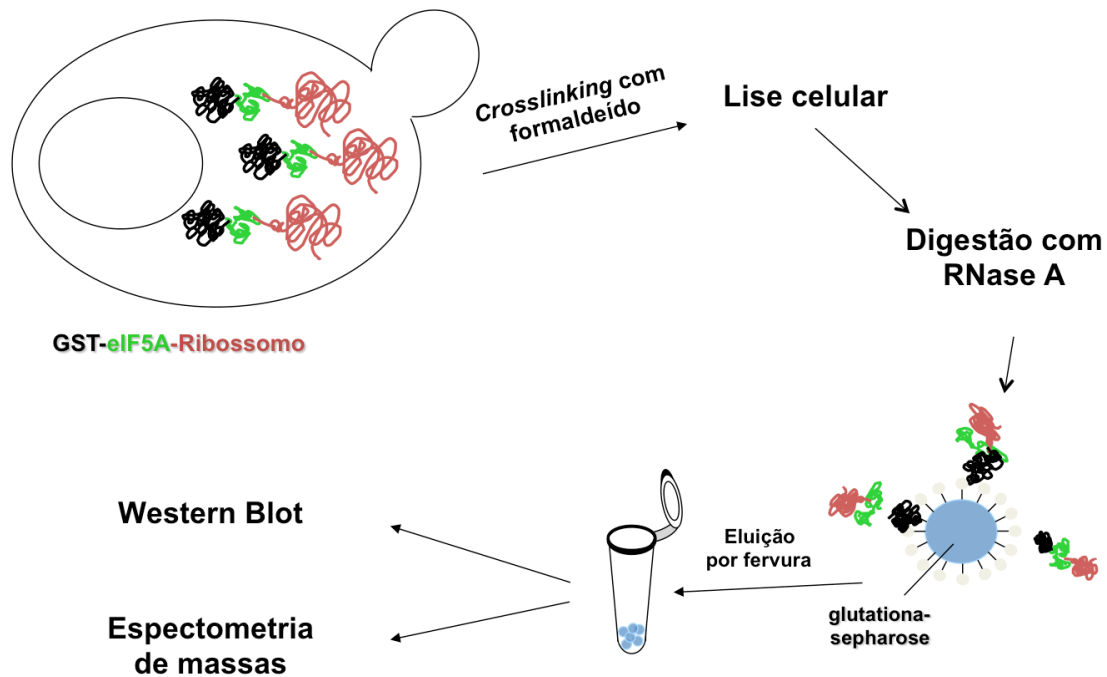


Figura 8. Esquema do ensaio de co-purificação de monossomos por eIF5A, utilizando *crosslinking* e RNase A. A linhagem produzindo GST ou GST-eIF5A é tratada com formaldeído, as células são então lisadas e o extrato celular incubado com RNase A, para ocorrer a separação dos polissomos. Em seguida, é realizada a co-purificação, como descrito em Material e Métodos, e as amostras são analisadas por SDS-PAGE seguido por *Western blot* ou espectrometria de massas.

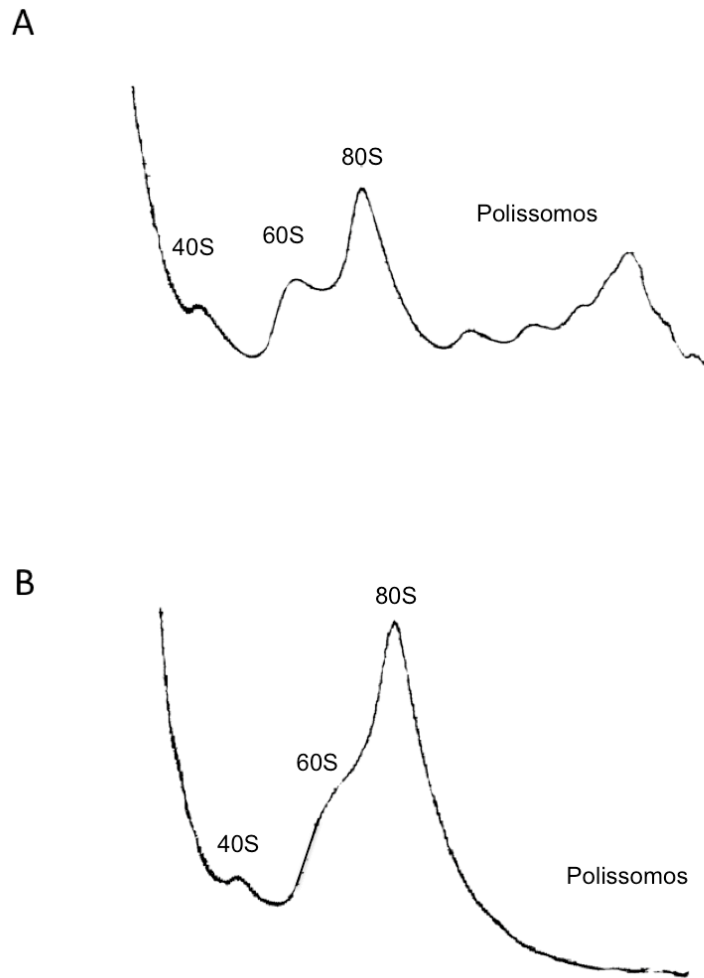


Figura 9. Ensaio de perfil polissomal para verificação da efetividade dos tratamentos com formaldeído e com RNase A. (A) Perfil Polissomal do extrato da linhagem VZL1074 tratadas com formaldeído, mas sem digestão com RNase A. **(B)** Perfil polissomal do extrato da mesma linhagem VZL1074 tratada com formaldeído, porém, digerido com RNase A.

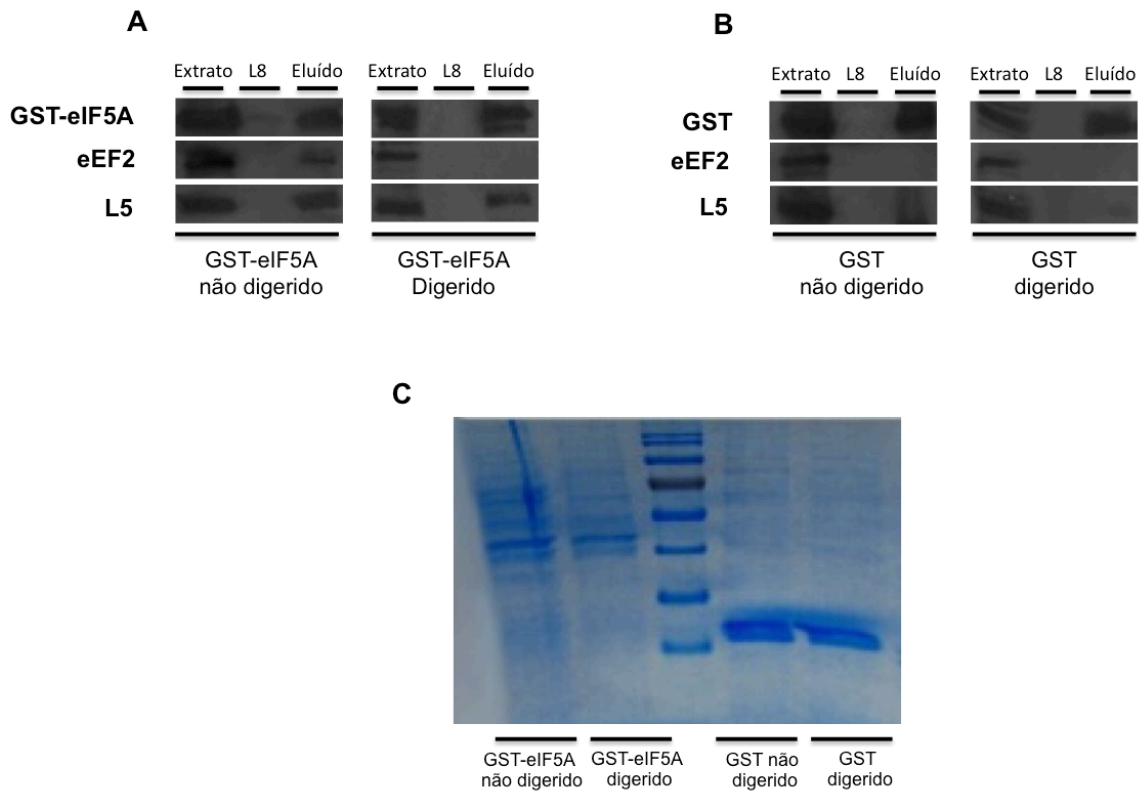


Figura 10. Resultados dos ensaios de co-purificação de ribossomos contendo eIF5A utilizando crosslink com formaldeído (A) Ensaios de western blot da co-purificação utilizando o extrato proteico da linhagem VZL1074 transformada com pSV36 (GST-eIF5A), não digerido e digerido com RNase A. A canaleta L8 representa a amostra obtida na oitava lavagem em que a resina foi submetida antes da eluição, demonstrando não haver ligantes inespecíficos nas amostras. **(B)** Ensaios de western blot da co-purificação utilizando o extrato proteico da linhagem VZL1074 transformada com pSV20 (GST), não digerido e digerido com RNase A. **(C)** Separação das proteínas co-purificadas por SDS-PAGE, após coloração com Coomassie Blue G.

4.1.3. Investigação da presença de eEF2 e outros fatores relacionados à tradução em ribossomos portando eIF5A

Na tentativa de entender melhor em que momento da tradução eIF5A atua , por meio da caracterização de fatores da tradução que estão simultaneamente ligados ao ribossomo e, além disso, confirmar os dados obtidos por western blot que mostram a ausência de eEF2 em ribossomos portando eIF5A, optou-se por submeter as amostras obtidas por GST-pulldown para análise por espectrometria de massas.

Na Figura 10C, é mostrada a separação por SDS-PAGE das amostras proteicas obtidas nas co-purificações, após coloração por Coomassie Blue G. Como esperado, há uma quantidade de bandas substancialmente maior na co-purificação realizada com GST-eIF5A utilizando lisado não tratado com RNase A, uma vez que esta amostra possui diferentes populações de ribossomos. Por outro lado, a co-purificação utilizando lisado tratado com RNase A possui apenas as proteínas presentes simultaneamente a eIF5A no ribossomo. As co-purificações realizadas apenas com GST, utilizando lisado digerido ou não digerido com RNase A, apresentam pouquíssimas bandas, o que está de acordo com os resultados de *western blot* e que demonstram a especificidade do ensaio.

Utilizando-se este gel corado com Coomassie Blue G, as canaletas correspondentes às amostras tratadas com RNase A do gel da Figura 10C foram recortadas separadamente e enviadas para análise por espectrometria de massas (Chemical and Proteomic Mass Spectrometry Core Facility, na Virginia Commonwealth University - EUA).

Como pode ser visto na Figura 11, os resultados obtidos na análise de espectrometria de massas estão de acordo com aqueles obtidos por *western blot*, ou seja, a espectrometria de massas também não detectou concentrações consideráveis de eEF2 co-purificado com GST-eIF5A. Por outro lado, a amostra de GST-eIF5A levou à identificação da isca eIF5A, o que era esperado.

A Figura 12 apresenta os gráficos referentes à identificação por espectrometria de massas de proteínas ribossomais presentes nas amostras

dos ensaios de co-purificação. A maior parte das proteínas ribossomais de ambas as subunidades foram identificadas na análise, sendo que maior parte delas foi identificada apenas com GST-eIF5A ou identificada em maior quantidade com GST-eIF5A. Estes dados estão de acordo com dados anteriores do nosso laboratório, através dos quais foi demonstrado que eIF5A se associa com ribossomos 80S ativos na tradução (Zanelli *et al.*, 2006), porém, não foi possível observar nenhuma interação específica com qualquer proteína ribossomal.

Além disso, é importante ressaltar que além de não ter sido encontrado eEF2 nas amostras de GST-eIF5A, também não foi encontrado o Fator de Elongação 3 (eEF3), este dado, atualmente, pode ser utilizado como um controle do experimento uma vez que já é conhecido que eIF5A e eEF3 se ligam ao sítio E (E-tRNA), que é o sítio de saída do tRNA já desaminoacilado do ribossomo, e, portanto, não devem estar presentes simultaneamente no mesmo ribossomo (Schmidt *et al.*, 2015; Andersen *et al.*, 2006).

Por fim, vale ressaltar que um dos principais objetivos deste experimento era encontrar fatores ligados ao ribossomo que pudessem elucidar melhor em qual momento da tradução eIF5A está atuando, porém, estes dados obtidos pela análise de espectrometria de massas não foram robustos e, por isso, não estão apresentados neste trabalho.

De maneira a complementar resultados deste trabalho, a Dra. Danuza Rossi conduziu, no laboratório do Dr. Christopher Fraser (Universidade Califórnia - Davis), ensaios de competição entre eIF5A e eEF2 por sua ligação em 80S. Estes ensaios foram realizados por ultracentrifugação de 80S, eIF5A e eEF2 através de colchão de sacarose e por teste de anisotropia de fluorescência. Os resultados obtidos pela Dra. Danuza corroboram com os dados obtidos neste trabalho, pois demonstraram que a afinidade de eIF5A pelo ribossomo é consideravelmente menor na presença de eEF2.

Este conjunto de dados fazem parte do manuscrito intitulado “*Negative cooperative binding of eIF5A and eEF2 to the 80S ribosome*”, submetido à revista Plos One (Anexo1).

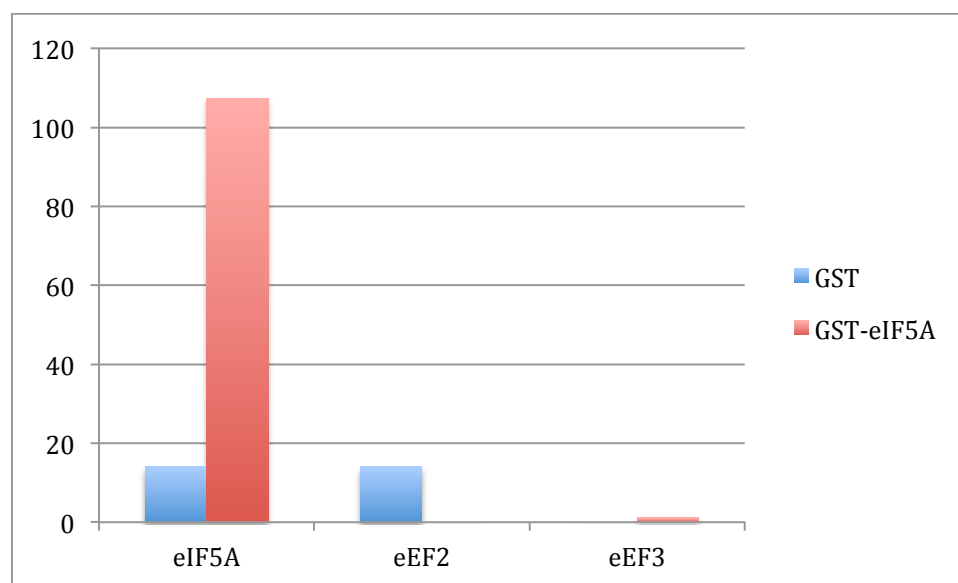
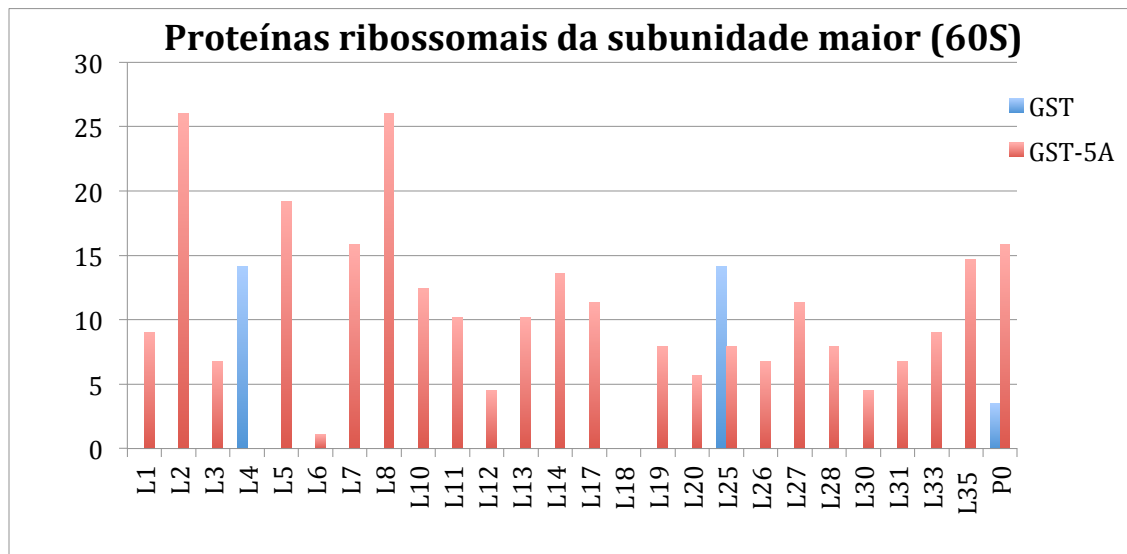


Figura 11. Resultados de espectrometria de massas para identificação de eEF2 nos ensaios de co-purificação de ribossomos portando eIF5A. As barras azuis representam a quantidade de proteína (eIF5A ou eEF2) co-purificadas usando GST como isca (a partir de extrato da linhagem VZL1074 transformada com pSV20). As barras vermelhas indicam as proteínas co-purificadas com GST-eIF5A como isca (linhagem VZL1074 transformada com pSV36). O eixo “y” deste gráfico representa a quantidade relativa de proteína presente na amostra.

(A)



(B)

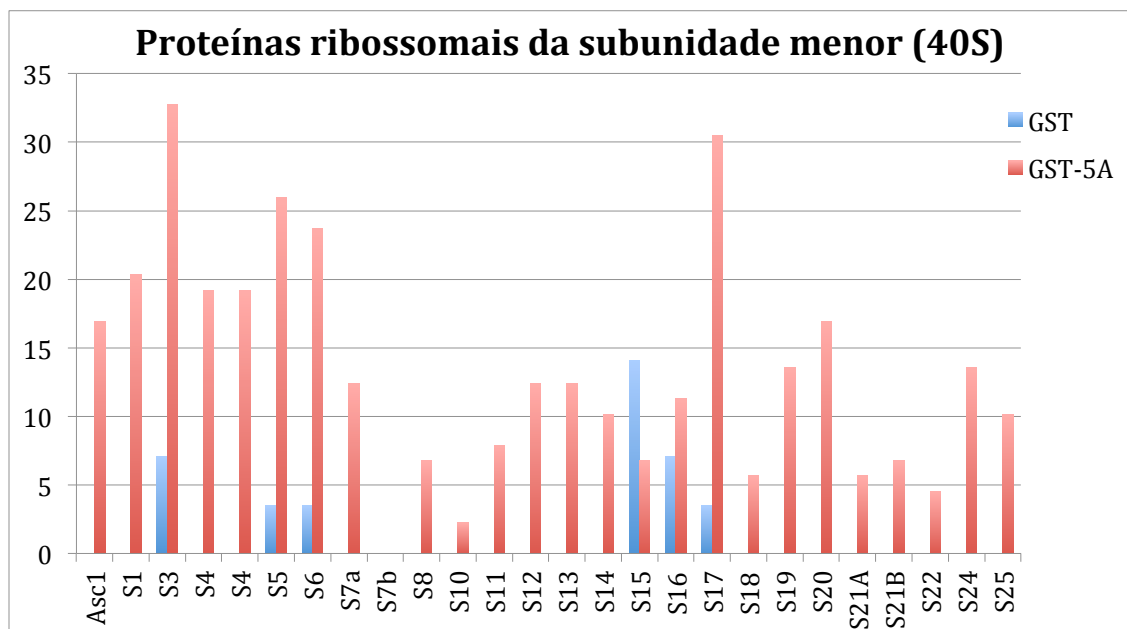


Figura 12. Resultados de espectrometria de massas para identificação de proteínas co-purificadas com GST-eIF5A. Os gráficos representam uma análise da presença das proteínas ribossomais da subunidade maior 60S (A) e da subunidade menor 40S (B). Em vermelho estão representadas as proteínas presentes na amostra de GST-eIF5A, enquanto as barras azuis representam as proteínas identificadas na amostra com GST apenas. O eixo “y” deste gráfico representa a quantidade relativa de proteína presente na amostra.

4.2. Análise da interação funcional entre eIF5A e a proteína ribossomal L1

Recentemente, foi proposta a ligação de eIF5A entre os sítios P e E do ribossomo e, apesar de serem dados de baixa resolução, foi indicado o possível contato físico entre eIF5A e L1A/B (Gutierrez *et al.*, 2013). Essa interação foi recentemente confirmada por ensaio de *Cryo-EM* e com alta resolução (Schmidt *et al.*, 2015).

Como acontece com outras proteínas ribossomais, os genes de *RPL1A* e *RPL1B* são parálogos e codificam proteínas 100% idênticas. No entanto, a expressão de *RPL1B* é muito maior que a de *RPL1A*, de maneira que, apesar de serem genes reduntantes, o efeito do nocaute de *RPL1B* é relativamente mais severo que o de *RPL1A* (Petitjean *et al.*, 1995).

Assim, no nosso trabalho, foi testada inicialmente a interação genética entre mutantes de eIF5A e nocautes de *RPL1A* e *RPL1B* e foi verificada uma interação uma genética sintética entre o mutante *tif51A*^{K56A} de eIF5A, que é um mutante cuja proteína é estável e apresenta defeito de crescimento e síntese proteica em temperaturas semi-permissiva (Dias *et al.* 2008), e o nocaute de *RPL1B* (Figura 13A) mas não com o nocaute de *RPL1A*. Nesta figura está mostrado o teste de diluição seriada utilizando tetrades irmãs deste cruzamento. As linhagens *RPL1B/TIF51A*, *rpl1BΔ/TIF51A* e *RPL1B/tif51A*^{K56A} apresentaram crescimento muito semelhante a 25°C e apenas a linhagem *RPL1B/tif51A*^{K56A} mostrou um atraso no crescimento a 37°C. Por outro lado, na linhagem haplóide contendo a combinação da deleção *rpl1BΔ* e o mutante *tif51A*^{K56A} simultaneamente, o crescimento é bastante afetado nas duas temperaturas testadas.

Em paralelo, o então aluno de doutorado, Fábio C. Galvão, conduziu no laboratório da Dra. Brenda Andrews, na Universidade de Toronto, um rastreamento de interação genética de larga escala (SGA - *Synthetic Genetic Array*), utilizando mutantes de eIF5A cruzados com a coleção de nocautes de *S. cerevisiae*. Este rastreamento mostrou que 22 proteínas ribossomais possuem algum tipo de interação genética sintética com eIF5A. Interessantemente, entre

as 22 interações encontradas, interação genética negativa (*synthetic sick*) entre *rpl1BΔ* e *tif51A^{K56A}* foi revelada, confirmando os nossos resultados.

A partir deste rastreamento, foram analisados os perfis polissomais dos mutantes duplos que revelaram interações genéticas sintéticas de maiores intensidades. Foram selecionados mutantes duplos portando o nocaute de genes tanto da subunidade menor 40S (*rps6BΔ*) quanto da subunidade maior 60S (*rpl1BΔ*, *rpl8AΔ*, *rpl8BΔ*, *rpl16BΔ* e *rpl19BΔ*), além de um mutante do gene que codifica uma proteína que se associa ao ribossomo, utilizado como controle de proteína não ribossomal (*sro9Δ*). Foi interessante observar que apenas as deleções de *RPL1B* (*rpl1BΔ*) e *RPL8A* (*rpl8AΔ*) apresentaram alteração significativa no perfil polissomal quando na presença do mutante *tif51A^{K56A}* (Fábio C. Galvão, dados não publicados).

Para melhor analisar a severidade e especificidade da interação genética entre *rpl1BΔ* e o mutante *tif51A^{K56A}*, foi realizada a comparação do tamanho das colônias dos mutantes duplos de *elf5A* e *L1B* ou *L8A*. O mutante duplo *elf5A* e *L16B* foi incluído na análise como controle, pois nenhuma mudança relevante de fenótipo foi detectada nos ensaios de perfil polissomal. Embora seja possível notar que a presença de todos os alelos mutantes das proteínas ribossomais testados (*rpl1BΔ*, *rpl8AΔ* e *rpl16BΔ*) levam à diminuição no tamanho da colônia do mutante *tif51A^{K56A}*, fica claro que os efeitos da combinação com o alelo mutante *rpl1BΔ* é substancialmente mais severo que nos demais casos (Figura 13B).

Para mensurarmos o impacto do crescimento destas interações genéticas negativas, foram realizadas as curvas de crescimento dos mutantes *tif51A^{K56A}*, *rpl1BΔ*, *rpl16BΔ* e dos mutantes duplo *tif51A^{K56A}/rpl1BΔ* e *tif51A^{K56A}/rpl16BΔ* e os tempos de dobramento determinados. A Figura 14A mostra as curvas de crescimento obtidas e revela que a linhagem *tif51A^{K56A}/rpl1BΔ* possui um crescimento fortemente diminuído. Enquanto o tempo de dobramento da linhagem selvagem (WT) é de aproximadamente 129 minutos, a linhagem *tif51A^{K56A}/rpl1BΔ* precisa de aproximadamente 395 minutos para dobrar o número de células. Ainda, a linhagem *tif51A^{K56A}/rpl16BΔ*, que apresenta uma

ligeira diminuição na curva de crescimento (Figura 14A), divide suas células em aproximadamente 231 minutos (Figura 14B).

Após mostrarmos a existência de interação genética entre o mutante *tif51A*^{K56A} e o nocaute de *RPL1B* (*rpl1BΔ*), e ainda apresentarmos que esta interação é mais severa em comparação com as interações entre o mutante *tif51A*^{K56A} e os demais nocautes de proteínas ribossomais testados, decidiu-se buscar a causa da severidade do fenótipo sintético doente do mutante *tif51A*^{K56A}/*rpl1BΔ*.

Quando este objetivo foi iniciado, era conhecido que o homólogo estrutural de eIF5A em bactérias, EF-P, possuía uma região de ligação à L1B no ribossomo (Blaha *et al.*, 2009) e a posição de ligação de eIF5A no ribossomo era similar à de EF-P (Gutierrez *et al.*, 2013). Então, decidiu-se investigar se a presença de L1B aumenta a afinidade da ligação de eIF5A no ribossomo, o que sugeriria uma ligação direta entre as duas proteínas em levedura.

Inicialmente, foi analisado se o perfil polissomal do mutante duplo *tif51A*^{K56A}/*rpl1BΔ* se correlaciona com o defeito mostrado no crescimento celular. A Figura 15 mostra os perfis polissomais das linhagens analisadas e revela que o mutante duplo *tif51A*^{K56A}/*rpl1BΔ* possui um grave defeito de início de tradução, uma vez que a razão polissomo/monossomo (P/M) desta linhagem (2,97) é significativamente inferior à da linhagem selvagem (5,08), do mutante *tif51A*^{K56A} (6,04) e do mutante *rpl1BΔ* (5,50).

Outra informação importante contida na Figura 15 é o padrão de migração de eIF5A nas frações do polissomo. Ao comparar as linhagens *TIF51A/RPL1B* e *TIF51A/rpl1BΔ* pode ser visto claramente que enquanto na linhagem selvagem eIF5A está presente em todas as frações do polissomo, a deleção de L1B causa uma diminuição desta migração. Na linhagem com deleção de L1B, eIF5A é identificada com robustez apenas até o primeiro pico de polissomo (fração 7), que coincide com o *halfmer* (acúmulo de 40S no polissomo). A presença de *halfmer* é um evento típico para deleções de proteínas ribossomais, mas que no caso específico de L1B tem sua presença menos severa (McIntosh, et al, 2011).

A migração diminuída de eIF5A na linhagem *rpl1BΔ* está de acordo com os resultados obtidos em colaboração com a aluna de doutorado do nosso laboratório, Natália M. Barbosa, que realizou um rastreamento de sítios de eIF5A importantes para a sua ligação ao ribossomo, através da técnica de *alanine scanning*. A combinação da modelagem molecular utilizando o cristal de eIF5A ligado à subunidade 60S e a estratégia de *alanine scanning* determinaram possíveis sítios de ligação de eIF5A ao ribossomo. Foram gerados 4 novos mutantes, porém, apenas um deles, chamado de *tif51A-7*, mostrou acentuada diminuição de afinidade pelo ribossomo através de ensaios de GST-*pulldown* e anisotropia de fluorescência. Interessantemente, a região modificada de eIF5A deste novo mutante é um local de interação com a proteína ribossomal L1 (Anexo 2). Sendo assim, os nossos dados de diminuição da migração de eIF5A na linhagem *rpl1BΔ* e a diminuição de afinidade do mutante *tif51A-7* pelo ribossomo estão de acordo com os dados obtidos por Cryo-EM que mostram que a presença da proteína ribossomal L1 é necessária para que eIF5A tenha uma alta afinidade de ligação pelo ribossomo (Schmidt *et al.*, 2015).

Apesar de a linhagem nocaute de *RPL1B* não mostrar diminuição acentuada no pico de 60S e 80S (Figura 15), já é conhecido que este mutante apresenta uma redução de 70% e 40%, respectivamente, na concentração de L1 nesses picos e concentrações equivalentes à selvagem nos polissomos (McIntosh *et al.*, 2011). Sendo assim, foi postulado que este déficit de L1 nas frações correspondentes às subunidades 60S e 80S comprometeria a ligação de eIF5A e seria a causa do fenótipo de crescimento lento da linhagem *rpl1BΔ* (Figuras 13 e 14).

Considerando que a afinidade do mutante eIF5A^{K56A} é, aproximadamente, 20 vezes menor que a proteína selvagem (Anexo 1), é possível sugerir que os defeitos de crescimento (Figuras 13 e 14) e de início de tradução mostrado por perfil polissomal (Figura 15) do mutante duplo eIF5A^{K56A}/*Rpl1BΔ* são devidos à baixa afinidade do mutante aos ribossomos ativos, possivelmente levando à diminuição da síntese proteica na célula.

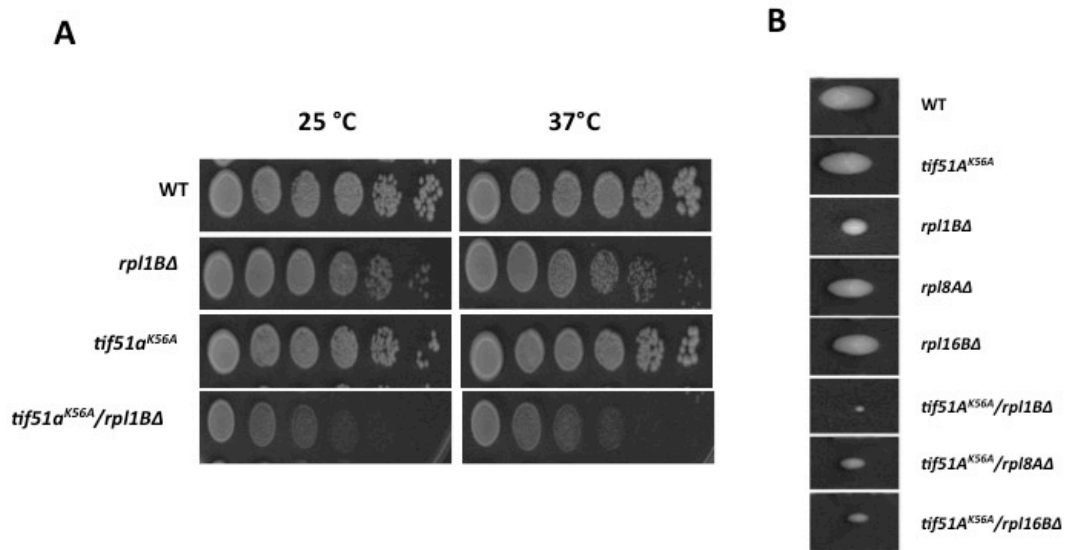


Figura 13. Análise de interação genética entre eIF5A e proteínas ribossomais. (A) Diluições seriadas das células haplóides obtidas da mesma tétrade *RPL1B/TIF51A*, *rpl1BΔ/TIF51A*, *RPL1B/tif51a^{K56A}* e *rpl1BΔ/tif51a^{K56A}* foram cultivadas em meio YPD e incubadas nas temperaturas permissiva (25°C) e semipermissiva para o mutante *tif51a^{K56A}* (37°C). **(B)** Tamanho das colônias dos mutantes duplos de eIF5A (*tif51a^{K56A}*) e das proteínas ribossomais L1B, L8A ou L16B, na temperatura permissiva.

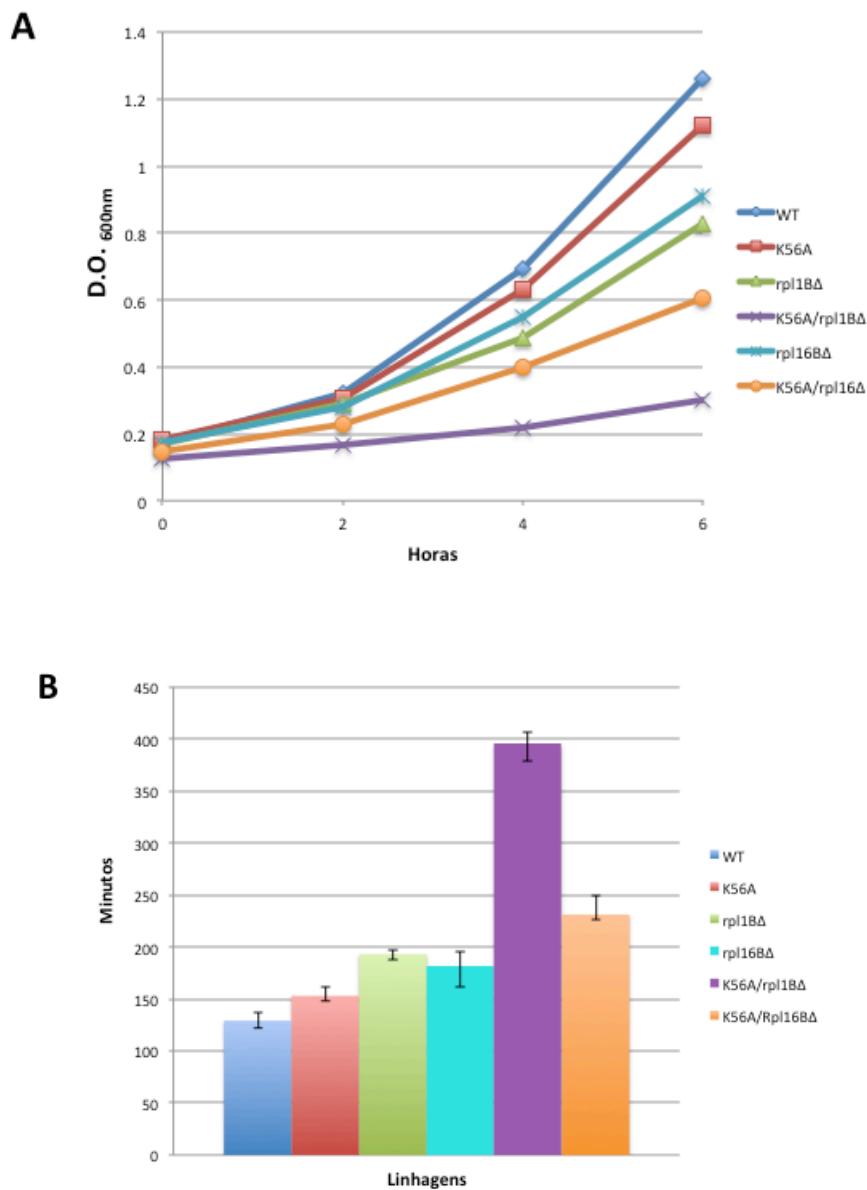


Figura 14. Análise do fenótipo de crescimento celular dos mutantes duplos de *elf5A* e proteínas ribossomais. (A) Curva de crescimento das linhagens indicadas. As linhagens foram diluídas para uma D.O._{600nm} 0,15 e as células foram contadas a cada 2 horas, totalizando 6 horas. **(B)** Gráfico referente ao tempo de dobra das linhagens indicadas. As linhagens foram diluídas para uma D.O._{600nm} 0,15 e o tempo de dobramento calculado entre as D.O._{600nm} 0,3 e 0,6. Ambos ensaios foram realizados a 25°C e em triplicata biológica.

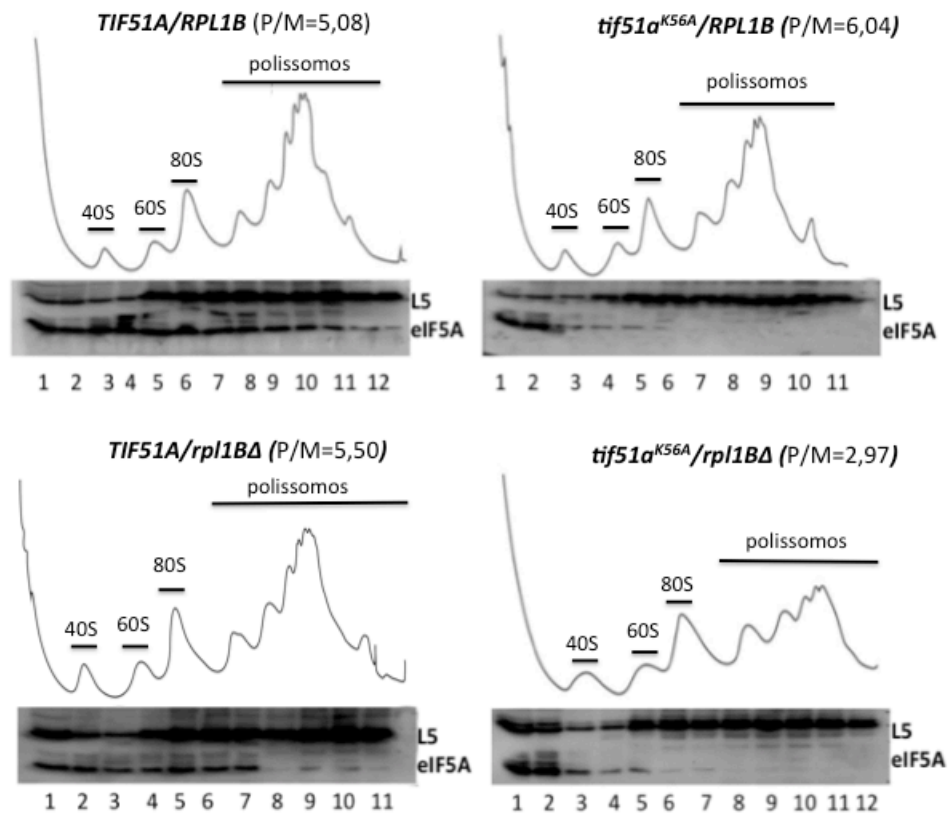


Figura 15. Análise do perfil polissomal do mutante duplo de eIF5A e L1B. Perfil polissomal das linhagens *TIF51A/RPL1B*, *tif51a^{K56A}/RPL1B*, *TIF51A/Δrpl1B* e *tif51a^{K56A}/Δrpl1B*. As frações dos perfis foram coletadas, as proteínas precipitadas com TCA e submetidas a ensaios de *western blot*. Foram utilizados os anticorpos policlonais anti-eIF5A e anti-L5.

4.3. Análise da interação funcional entre eIF5A e o complexo RQC (Ribosome Quality Control)

Como já apresentado na Introdução, recentemente, foi mostrado que mutantes de eIF5A causam uma parada na tradução de proteínas contendo sequência de poliprolina com, pelo menos, três resíduos de prolina consecutivos (Gutierrez *et al.*, 2013). Foi mostrado também que o complexo RQC (formado por Ltn1, Tae2, Rqc1 e Cdc48 mais seus co-fatores) é o responsável pela detecção, remoção e ubiquitinação do peptídeo nascente na ocorrência de *stalling* causado por polilisina (poli-K) (Brandman *et al.*, 2012; Defenouillère *et al.*, 2013; Verma *et al.*, 2013). À luz destes dados, decidiu-se buscar uma possível relação funcional entre eIF5A e o complexo RQC.

4.3.1. Análise de Interação genética entre mutantes de eIF5A e dos fatores Ltn1 e Tae2 do complexo RQC

Uma vez que os papéis de Ltn1 e Tae2 estão melhor estabelecidos e estes fatores parecem atuar de maneira mais específica na resposta de RQC (Lyumkis *et al.*, 2014; Shen *et al.*, 2015), o estudo foi iniciado pela análise de interação genética de eIF5A com estes fatores. *LTN1* e *TAE2* são genes não essenciais em *S. cerevisiae*, portanto, para a análise das interações genéticas foram testados os nocautes desses genes e dois alelos mutantes de eIF5A, *tif51A*^{K56A} e *tif51A-1* (P83S) que, assim como o mutante *tif51A*^{K56A}, possui fenótipo de defeito de crescimento nas temperaturas semi-permissivas, porém, a proteína é degradada nestas condições.

A deleção de Ltn1 causa um aumento na sensibilidade ao antibiótico higromicina (Bengtson e Joazeiro, 2010). Por esta razão, foi testado o comportamento do mutante duplo em meio YPD na presença de diferentes concentrações deste antibiótico. Como pode ser observado na Figura 16, a presença do mutante *tif51A*^{K56A} aumenta a sensibilidade à higromicina da linhagem *ltn1Δ*. Este comportamento é visto na cultura utilizando as concentrações de 25 e 50 µg/mL de higromicina. Portanto, este ensaio

demonstra que o mutante *tif51A*^{K56A} possui interação genética negativa com a linhagem *ltn1Δ* para a sensibilidade à higromicina.

Uma vez que o mutante *tif51A*^{K56A} é sensível a temperatura, foi avaliado também o crescimento do mutante duplo em diferentes temperaturas, porém, não foi observada interação genética entre o mutante *tif51A*^{K56A} e *LTN1Δ* (dados não mostrados).

Além do mutante estável *tif51A*^{K56A}, estes ensaios também foram realizados utilizando o mutante de depleção de eIF5A *tif51A-1* (P83S) e os resultados obtidos foram semelhantes aos mostrados para o mutante *tif51A*^{K56A} (dados não mostrados).

Outro fator do complexo RQC testado foi Tae2. A Figura 17A apresenta uma interação genética negativa discreta entre o mutante estável *tif51A*^{K56A} e a linhagem nocaute, ou seja, o crescimento celular do mutante duplo *tif51A*^{K56A}/*tae2Δ* se mostrou levemente reduzido. Esta interação negativa entre eIF5A e Tae2 foi evidenciada tanto na temperatura semipermissiva (38°C) como na permissiva (25°C). Por outro lado, o mutante *tif51A-1* apresentou um fenótipo de melhora do crescimento em combinação com *tae2Δ* (Figura 17B), pois a presença da deleção de Tae2 faz com que o crescimento celular da linhagem mutante *tif51A-1* seja similar à linhagem selvagem.

Esta interação alelo específica pode ser explicada pelo fato da proteína mutante *tif51A-1* ser instável nas temperaturas semipermissivas e do mutante eIF5A^{K56A} ser estável, mas menos hipusinada devido à modificação próxima à alça de hipusinação. Assim, a ausência de Tae2 prejudica o crescimento da linhagem que produz eIF5A pouco hipusinada, mas melhora o crescimento da linhagem com baixa concentração de eIF5A.

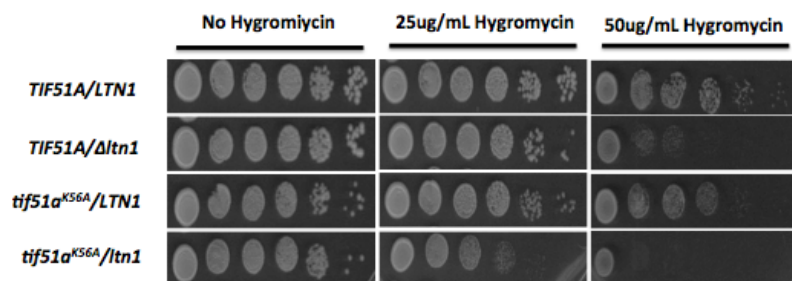


Figura 16. Análise da interação genética entre *TIF51A* e *LTN1*. A linhagem mutante *tif51A^{K56A}* foi cruzada com a linhagem nocaute de *LTN1*. Diluições seriadas das células haplóides obtidas da mesma tétrade *TIF51A/LTN1*, *TIF51A/ltn1Δ*, *tif51A^{K56A}/LTN1* e *tif51A^{K56A}/ltn1Δ* foram plaqueadas em meio YPD, adicionado de diferentes concentrações de higromicina, e cultivadas na temperatura permissiva (25°C).

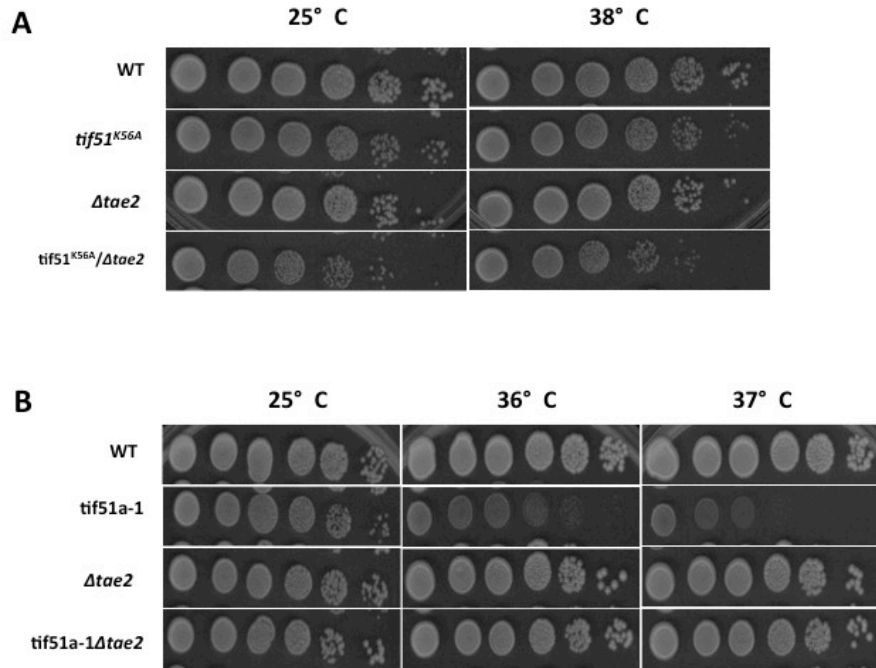


Figura 17. Análise da interação genética entre *TIF51A* e *TAE2*. (A) Diluições seriadas das células haplóides derivadas da mesma tétrade *TIF51A/TAE2*, *tif51A^{K56A}/TAE2*, *TIF51A/tae2Δ*, e *tif51A^{K56A}/tae2Δ* foram cultivadas em meio YPD e nas temperaturas permissiva (25°C) e semipermissiva (38°C) para o mutante *tif51A^{K56A}*. (B) Diluições seriadas das células haplóides derivadas da mesma tétrade *TIF51A/TAE2*, *tif51A-1/TAE2*, *TIF51A/tae2Δ*, e *tif51A-1/tae2Δ* foram cultivadas em meio YPD e incubadas nas temperaturas permissiva (25°C) e semipermissivas (36°C e 37°C) para o mutante *tif51A-1*.

4.3.2. Investigação do papel do complexo RQC no *stalling* de poliprolinas

Como apresentado na Introdução, foi mostrado em mutantes de eIF5A que ocorre parada na tradução em sequências de três ou mais prolina consecutivas (Gutierrez *et al.*, 2013). Neste estudo, foram testadas sequências com 3, 4, 6, 8 e 10 resíduos de prolina e o efeito mais severo foi obtido com 6 e 8 resíduos. Sendo assim, optou-se aqui por produzir genes repórteres com 3, 6 ou 12 prolina (GFP-2A-FLAG-HIS3-poli-P-HA), como descrito em Materiais e Métodos. Infelizmente, não foi possível obter o gene repórter com 12 prolina pela técnica utilizada, pois a reação de PCR não foi capaz de amplificar o gene contendo 12 resíduos de prolina. Tentou-se algumas alternativas como, por exemplo, trocar ou intercalar os diferentes códons do resíduo de prolina e também modificar o local de inserção dos sítios através do desenho de novos primers, porém, nenhuma das estratégias levaram ao êxito (dados não mostrados).

Dessa forma, foi testada a expressão dos genes repórteres portando 3 ou 6 prolina na linhagem VZL1074 (*kanMX4-tetOpr-TIF51A*), cuja expressão do gene de eIF5A é reprimida por doxiciclina. Como pode ser observado na Figura 18, a diminuição dos níveis de eIF5A na célula não foi capaz de produzir a diminuição da expressão do gene repórter com 3 ou com 6 resíduos de prolina. Mesmo não observando a parada na tradução destes genes repórteres após diminuição dos níveis de eIF5A, a expressão destes repórteres também foi testada nas linhagens VZL1299 (*kanMX4-tetOpr-TIF51A ltn1::LEU2*) e VZL1309 (*kanMX4-tetOpr-TIF51A ltn1::LEU2 tae2::HIS3*) devido ao fato de Ltn1 ser essencial para a degradação do peptídeo nascente em *stalling* de polilisina K12 (Bengtson e Joazeiro, 2010) e Tae2 ser essencial à formação de agregados proteicos desde que também tenha ausência de Ltn1. (Dr. Claudio Joazeiro, comunicação pessoal). No entanto, mais uma vez, não foi observada diminuição da expressão do repórter poliprolina com a diminuição dos níveis de eIF5A (Figuras 19 e 20).

Com o insucesso utilizando os nossos genes repórteres, optou-se por uma nova estratégia para testar o possível papel do complexo RQC no *stalling*

causado pela sequência de poliprolinas. No mesmo estudo que mostrou o envolvimento de eIF5A na tradução de sequências de poliprolinas (Gutierrez *et al.*, 2013), foi demonstrado também que três proteínas (Eap1, Ldb17, Vrp1), que por possuírem sítios de poliprolina, tinham a produção diminuída em mutantes de eIF5A. Decidiu-se por testar apenas Eap1 pelo fato desta proteína possuir vários sítios de poliprolina e por estes sítios estarem localizados na porção C-terminal, o que facilitaria a detecção das bandas da proteína na forma truncada, ou seja, um polipeptídeo mais curto cuja tradução foi, por algum motivo, parada antes do códon de parada da ORF do gene (Figura 21A). Na Figura 21B podemos observar que apenas a linhagem selvagem (WT) foi capaz de produzir a proteína de fusão FLAG-Eap1 completa, com tamanho aproximadamente 70 kDa. O mutante *tif51A*^{K56A} não foi capaz de produzir a proteína FLAG-Eap1 completa, mas foram observadas 3 bandas mais fracas referentes às formas truncadas geradas pelos sítios de poliprolina. Esta informação é importante pois revela que, nas condições testadas, o mutante *tif51A*^{K56A} não foi capaz de expressar a proteína com sítios de poliprolina. Era esperado que a combinação do mutante de eIF5A com a deleção de Ltn1 proporcionasse o aumento da concentração das bandas truncadas de Eap1, uma vez que estas bandas truncadas, que são os peptídeos nascentes causados pelo *stalling*, poderiam ser substrato da E3-ligase Ltn1, e, por conseguinte, degradadas pelo proteassoma. As canaletas referentes a esta linhagem não mostram este acúmulo de bandas truncadas. Os níveis destas bandas truncadas no mutante de eIF5A não se alteraram com a deleção de Ltn1 e este comportamento sugere que a maquinaria do RQC não é responsável pela degradação do peptídeo nascente resultante do *stalling* causado por sítio de poliprolinas em mutantes de eIF5A.

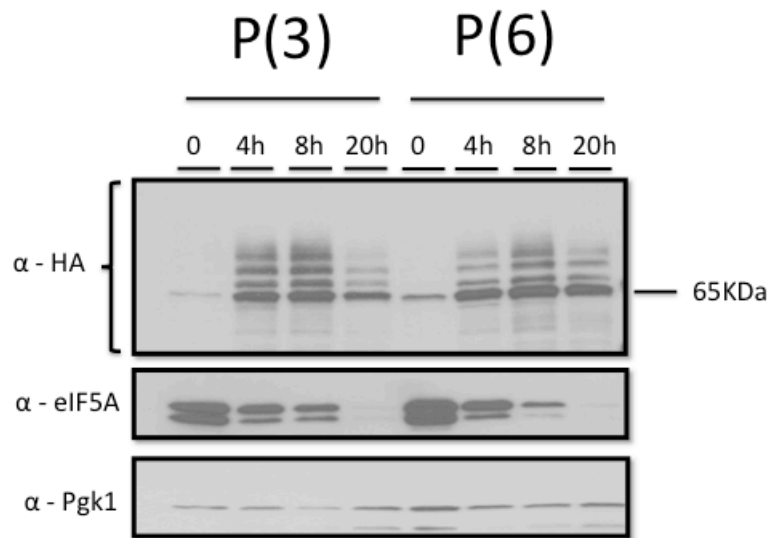


Figura 18. Análise dos níveis de tradução de poliprolinas em condição de depleção de eIF5A. A linhagem VZL1074 (*tetO-TIF51A*) transformada com gene repórter portando 3 ou 6 resíduos de prolina foi crescida *por* 16 horas, diluída para $D.O_{600nm} = 0,3$ e incubada, na presença ou não de doxiciclina (10 $\mu\text{g/mL}$), pelos tempos indicados. Foi utilizado o anticorpo monoclonal α -HA para detectar a proteína repórter, de aproximadamente 65 kDa. O anticorpo policlonal α -eIF5A foi utilizado para mostrar os níveis da proteína eIF5A, como controle do tratamento com doxiciclina. A proteína Pgk1 foi utilizada como normalizador da concentração proteica.

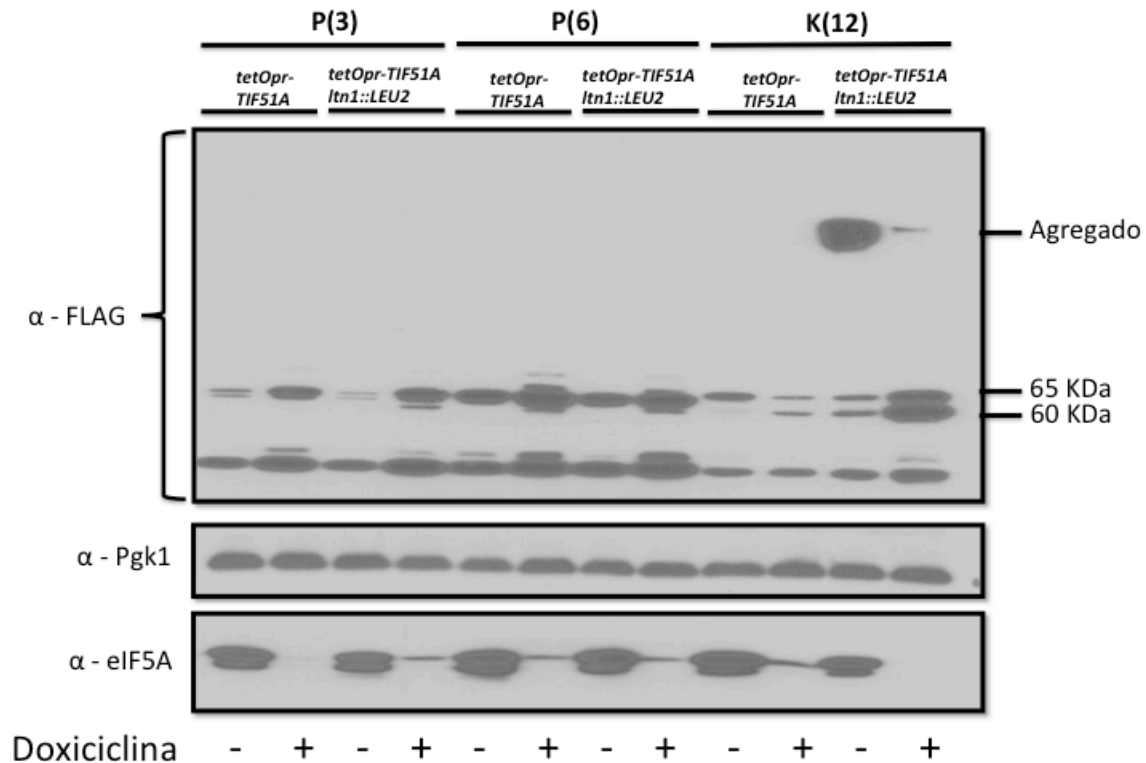


Figura 19. Efeito da deleção de Ltn1 na expressão de repórteres de poliprolina (P3 e P6) e polilisina (K12). As linhagens VZL1074(*tetO-TIF51A*) e VZL1299 (*tetO-TIF51A ltn1::LEU2*) transformadas com o gene repórter portando 3 ou 6 resíduos de prolina ou com 12 resíduos de lisina foram crescidas por 16 horas, diluídas para D.O._{600nm} = 0,3 e incubadas na presença ou não de doxiciclina (10 µg/mL), por 19 horas. O gene repórter com 12 resíduos de lisina foi usado como controle da função de Ltn1 em células com *stalling* no ribossomo (Bengtson e Joazeiro, 2010). Foi utilizado o anticorpo monoclonal α-FLAG (Sigma) para detectar o gene repórter que tem, aproximadamente, 65 kDa em seu tamanho completo e, aproximadamente, 60 kDa na forma truncada, α-eIF5A para testar os níveis desta proteína antes e após o tratamento com doxiciclina e α-Pgk1 foi o fator escolhido para normalização da concentração proteica.

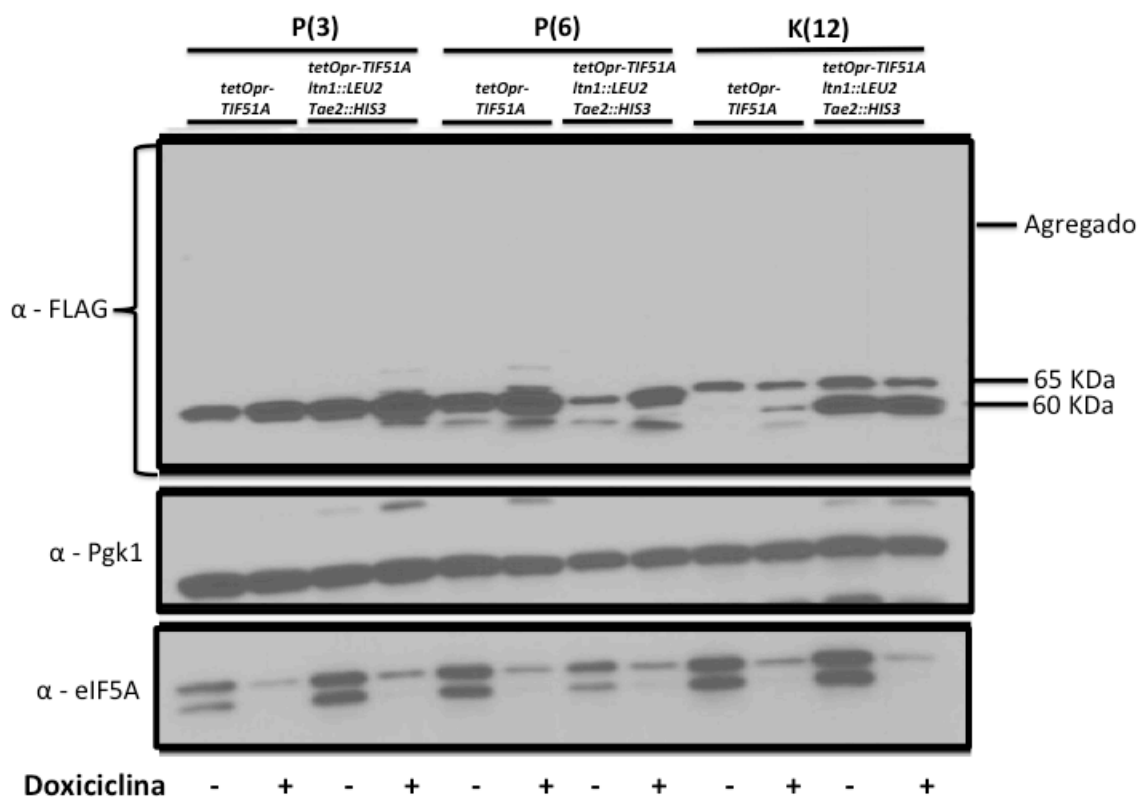


Figura 20. Efeito da deleção de Ltn1 e Tae2 na expressão de repórteres de poliprolina (P3 e P6) e polilisina (K12). As linhagens VZL1074(*tetO-TIF51A*), VZL1299 (*tetO-TIF51A ltn1::LEU2*) e VZL 1309 (*tetO-TIF51A ltn1::LEU2 tae2::HIS3*) transformadas com o gene repórter portando 3 ou 6 resíduos de prolina ou também com 12 resíduos de lisina foram crescidas por 16 horas, diluídas para D.O._{600nm} = 0,3 e incubadas, na presença ou não de doxiciclina (10 µg/mL), por 19 horas. Novamente, foi utilizado o repórter K(12) como controle. Os anticorpos utilizados são os mesmos da Figura 19.

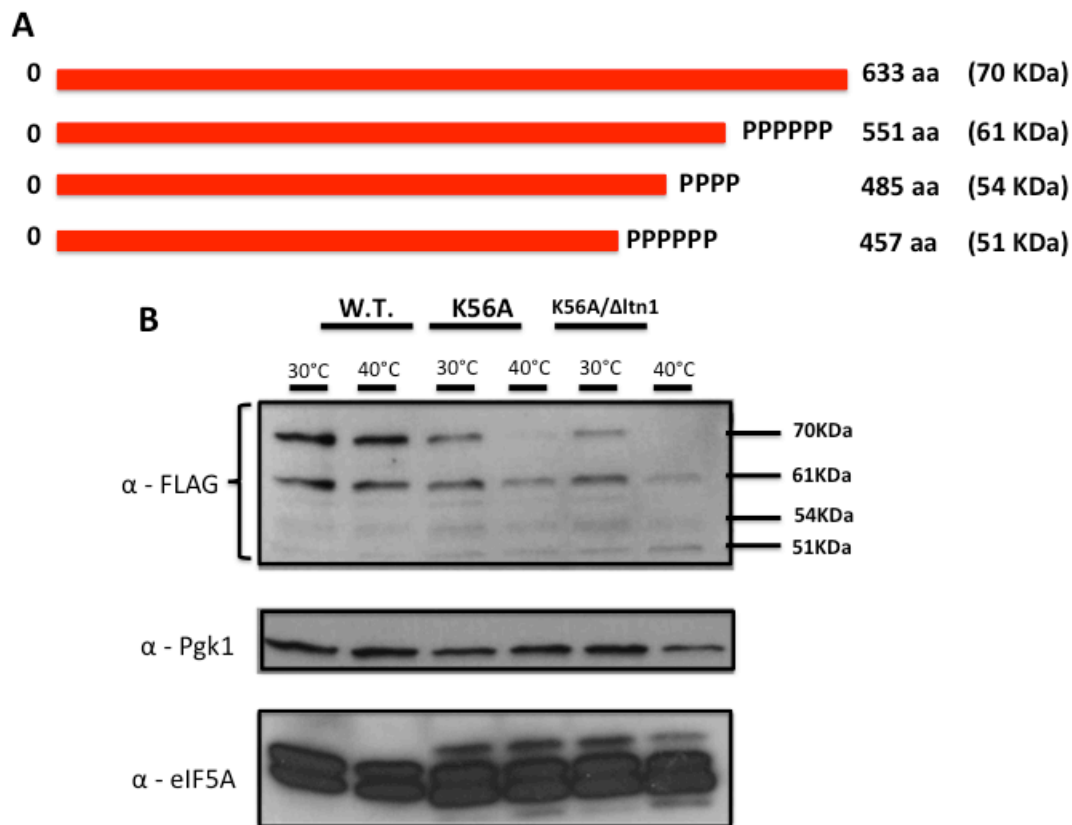


Figura 21. Estudo dos níveis da expressão da proteína Eap1 em mutante de eIF5A e nocaute de Ltn1. (A) Posição dos resíduos consecutivos de prolina presentes na proteína Eap1. **(B)** As linhagens VZL1256 (WT), VZL1259 (*tif51A^{K56A}*) e VZL1313 (*tif51A^{K56A} ltn1::LEU2*) transformadas com pSV1609 (*FLAG-EAP1*) foram cultivadas por 16 horas, diluídas para D.O._{600nm} = 0,4 e incubadas por seis horas sob agitação, nas temperaturas indicadas. Em seguida, as células foram lisadas e os extratos celulares analisados por *western blot*, utilizando os mesmos anticorpos da Figura 19.

4.3.3. Análise da participação de eIF5A no funcionamento do complexo RQC e na formação de agregados proteicos.

Curiosamente, ao usar o repórter polilisina (K12) como controle positivo para o nocaute de *LTN1* nos experimentos descritos anteriormente, foi observado que a depleção de eIF5A afeta a formação de agregados proteicos causados pela deleção de *Ltn1* (Figura 19). A formação destes agregados proteicos é ainda pouco clara, mas se acredita que eles são compostos por peptídeos nascentes removidos do ribossomo que sofreu *stalling* causados por polilisina (Dr. Claudio Joazeiro, comunicação pessoal). Dado interessante é que a deleção de *TAE2* na célula com *LTN1* já deletada, também impede a formação dos agregados proteicos (Figura 20). Esta essencialidade de *Tae2* na formação dos agregados proteicos foi observada tanto nos ensaios deste projeto quanto em outros experimentos do laboratório do Dr. Claudio Joazeiro. Este fato, somado às interações genéticas já apresentadas neste trabalho, e à localização de eIF5A no ribossomo, sugere uma possível participação de eIF5A no processo de resposta do RQC ligado a ribossomo durante a tradução de polilisinas.

A partir destes resultados, foi aprofundada a investigação dessa possível função de eIF5A no funcionamento do complexo RQC. Com o objetivo de revelar os diferentes fatores se ligam ao ribossomo na resposta de RQC na presença e na ausência de eIF5A, foi realizada, então, co-imunoprecipitação do repórter de FLAG-2A-HIS3-K12-4HA utilizando a linhagem VZL1299 (*kanMX4-tetOpr-TIF51A ltn1::LEU2*), tratada e não com doxiciclina. A Figura 22A mostra os extratos celulares destas amostras, com acentuada diminuição da formação de agregado celular relacionada à redução dos níveis de eIF5A na célula, como já observado na Figura 19. A partir dos extratos celulares, foram realizadas co-imunoprecipitações, sendo que 10% do volume total do eluato destas co-imunoprecipitações foi utilizado para checar a qualidade da amostra por SDS-PAGE 4-20%, seguida de coloração por prata (Figura 22B). As amostras foram enviadas para identificação de proteínas por espectrometria de massas no laboratório do Prof. Dr. Salim Merali (Institute for Cancer Research and Molecular Biology, Temple University - Philadelphia - EUA).

O resultado desta análise por espectrometria de massas mostrou consideráveis diferenças entre as amostras depletada ou não de eIF5A. Na Tabela 4 estão listados os fatores identificados. As proteínas ribossomais foram removidas da lista, pois estiveram presentes em ambas amostras. Curiosamente, os fatores Sis1 e Cdc48, ambos possivelmente relacionados à formação de agregados proteicos e à maquinaria do RQC, foram co-purificados somente na condição de níveis normais de eIF5A.

Sis1 é um tipo de chaperona associada às chaperonas HSP70 e desempenha papel no *misfolding* de proteínas (Luke *et al.*, 1991) e formação de agregados de poliglutamina, poliQ (Park *et al.*, 2013).

Cdc48 é um componente do complexo RQC, que remove o peptídeo nascente da subunidade 60S e o torna disponível para a degradação pelo proteassomo (Brandman *et al.*, 2012; Defenouillère *et al.*, 2013; Verma *et al.*, 2013).

Embora estes sejam dados preliminares, a correlação entre níveis celulares normais de eIF5A e a presença de Sis1 e Cdc48 nos agregados sugere um papel para eIF5A no complexo RQC.

Para continuar a investigação do papel de eIF5A no funcionamento do RQC, foram realizados experimentos de co-imunoprecipitação utilizando repórter FLAG-2A-HIS3-K12-4HA nas linhagens VZL1074 (*kanMX4-tetOpr-TIF51A*), VZL1299 (*kanMX4-tetOpr-TIF51A ltn1::LEU2*) e VZL1300 (*kanMX4-tetOpr-TIF51A tae2::HIS3*), além da utilização do repórter FLAG-2A-HIS3-4HA na linhagem VZL1074 como controle negativo do experimento.

A Figura 23 apresenta a análise por *western blot* da co-imunoprecipitação realizada com a linhagem VZL1299 (*kanMX4-tetOpr-TIF51A ura3::CMV-tTA ltn1::LEU2*). Confirmando os dados obtidos com extrato total, a FLAG-IP foi incapaz de co-imunoprecipitar o agregado celular em condições de redução dos níveis de eIF5A. Além disso, este experimento mostrou que apenas traços da proteína ribossomal L3 está presente no eluato, sugerindo que, praticamente, não existe subunidade 60S presente no agregado celular. A ausência de 60S no agregado celular já era esperada, devido ao fato de não ser possível revelar o

agregado celular por *western blot* utilizando anti-L3 (Dr. Claudio Joazeiro, comunicação pessoal). A Figura 24 apresenta o resultado das demais imunoprecipitações realizadas nesta etapa. Os controles deste experimento foram realizados com a linhagem VZL1074 transformada com o gene repórter portando K(12) ou (K0) e, como esperado, não foi possível co-purificar o agregado celular nestas amostras. A imunoprecipitação realizada com o gene repórter K12 em linhagem VZL1309 (*tae2Δ*) também foi incapaz de co-precipitar agregados proteicos, visto que a deleção de *Tae2* impede a formação destes agregados. Por outro lado, este experimento foi capaz de co-precipitar eIF5A. Os dados de co-imunoprecipitação nos mostrou que, assim como a deleção de *Tae2*, a redução brusca dos níveis de eIF5A reduz a formação de agregados proteicos no extrato celular e também na co-imunoprecipitação utilizando o gene repórter como isca. Além disso, apenas a co-imunoprecipitação realizada na linhagem VZL1309 ($\Delta tae2$) foi capaz de co-imunoprecipitar eIF5A, o que sugere, mais uma vez, uma correlação funcional entre eIF5A e *Tae2*.

Como já dito na Introdução deste trabalho, o principal papel atualmente atribuído à *Tae2* é promover a elongação de uma cadeia peptídica denominada cauda CAT pelo recrutamento de tRNA Ala (IGC) e tRNA Thr (IGU) para o sítio A do ribossomo. A tradução desta cauda não necessita da presença da subunidade 40S do ribossomo (Shen *et al.*, 2015) e, portanto, eIF5A poderia desempenhar um papel catalítico e facilitar a ligação peptídica entre os resíduos de aminoácido envolvidos nesta síntese.

Outro dado que corrobora o possível papel de eIF5A junto ao RQC é o fato de que, apesar de ser descrito o papel catalítico de eIF5A no ribossomo 80S, esta proteína liga-se também com alta afinidade na subunidade 60S (Anexo 1).

Para comprovar este papel de eIF5A, está sendo investigada, por espectrometria de massas, a presença da cauda CAT em amostras obtidas por co-imunoprecipitação utilizando o gene repórter K12 como isca e nas condições de ausência e presença de eIF5A. Esses experimentos estão sendo realizados em colaboração com o Dr. Mario Palma, do Instituto de Biociências na Unesp de

Rio Claro - SP, utilizando metodologia semelhante à utilizada para comprovação do papel de Tae2 no RQC (Shen *et al.*, 2015).

Adicionalmente, mesmo na deleção da proteína Tae2, o gene repórter AT10 (FLAG-2A-HIS3-10XAT) é capaz de induzir a formação dos agregados proteicos (Dr. Claudio Joazeiro, comunicação pessoal). Sendo assim, optou-se por investigar a formação de agregados proteicos utilizando este gene repórter na condição de depleção de eIF5A. Esses ensaios estão sendo realizados.

Com esses experimentos, espera-se determinar se eIF5A possui um papel direto no complexo RQC ou apenas atua de forma indireta, participando no controle da expressão gênica dos fatores envolvidos neste processo de controle de qualidade.

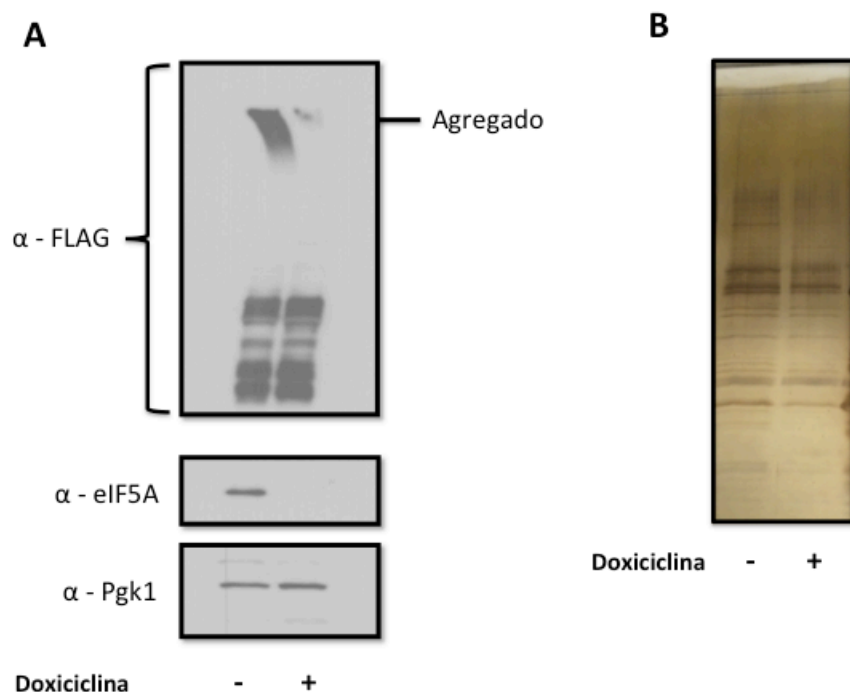


Figura 22. Co-imunoprecipitação do repórter FLAG-2A-HIS3-K12-4HA na linhagem VZL1299 (*tetO*)-*TIF51A ltn1::LEU2*). (A) A linhagem VZL1299 (*tetO*)-*TIF51A ltn1::LEU2*) foi transformada com o gene repórter com 12 resíduos de lisina e foi crescida por 16 horas, diluídas para D.O._{600nm} = 0,3 e incubadas, na presença ou não de doxiciclina (10 µg/mL), por 19 horas. Foi realizado western blot destes extratos celulares e os anticorpos utilizados são os mesmos da Figura 19. (B) SDS-PAGE 4-20% de 10% do volume total dos eluatos obtidos pela co-imuniprecipitação, após coloração com prata.

Tabela 4. Proteínas identificadas por espectrometria de massas em amostras obtidas por co-imunoprecipitação, utilizando o gene repórter K12 como isca.

Proteína	Doxiciclina (+) (sem eIF5A)	Doxiciclina (-) (com eIF5A)
Imidazoleglycerol-phosphate dehydratase (<i>HIS3</i>)	X	X
Actin (<i>ACT1</i>)	X	X
Elongation factor 1-alpha (<i>TEF1</i>)	X	X
J domain-containing protein APJ1 (<i>APJ1</i>)	X	
Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein GN=ASC1 - (GBLP_YEAST)	X	X
Heat shock protein SSA3 (HSP73)	X	
Suppressor protein STM1 (STM1)	X	X
ATP-dependent molecular chaperone (HSC82)	X	
GTP-binding nuclear protein GSP1/CNR1 (<i>GSP1</i>)	X	
Histone H3 (H3)	X	
Oleate-activated transcription factor 1 (OAF1)	X	
Histone H4 (H4)	X	
Eukaryotic translation initiation factor 6 (IF6)	X	X
Ubiquitin-40S ribosomal protein S31 (RS27A)	X	
Histone H2A.Z (H2AZ)	X	
ATP synthase subunit beta, mitochondrial (ATPB)	X	
Heat shock protein SSB1 (HSP75)	X	X
RNA annealing protein (YRA1)	X	
Ras-related protein SEC4 (<i>SEC4</i>)	X	
Protein BMH1 (BMH1)	X	
C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic (C1TC)		X
Heat shock protein SSA2 (HSP72)		X
Protein SIS1 (SIS1)		X
6-phosphofructo-2-kinase 1 (6P21)		X
Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit gamma (IF2G)		X
UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase (UGPA1)		X
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (<i>G3P1</i>)		X
Cell division control protein 73 (CDC73)		X

Small nuclear rib nucleoprotein-associated protein B GN=SMB1 - (RSMB_YEAST)		X
RNA annealing protein YRA1 (YRA1)		X
Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit beta (IF2B)		X
Cell division control protein 48 (CDC48)		X
U2 small nuclear rib nucleoprotein B (MSL1)		X
RNA polymerase-associated protein CTR9 (CTR9)		X
Protein HSH49 (HSH49)		X
Putative inosine-5'-monophosphate dehydrogenase (IMDH1)		X
Malate dehydrogenase, peroxisome GN=MDH3 (MDHP)		X
Tyrosine-protein phosphatase (PVH1)		X
Large subunit ATPase 1 (LSG1)		X
RNA polymerase II-associated protein 1 (PAF1)		X
Probable metalloprotease ARX1 (ARX1)		X
Cold sensitive U2 snRNA suppressor 2 (CUS2)		X
Histone H2B.2 (H2B2)		X
Single-stranded DNA-binding protein RIM1, mitochondrial (RIM1)		X
Protein transport protein SEC61 (SC61A)		X
Uncharacterized protein YGR169C-A (YG169)		X
GTP cyclohydrolase 1 (GCH1)		X
Ribosome-associated complex subunit SSZ1 (SSZ1)		X
Protein transport protein SSS1 (SC61G)		X
Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial (GLYM)		X
Pre-mRNA-splicing factor 19 (PRP19)		X
Ribosome-interacting GTPase 1 (RBG1)		X
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I (EIF3I)		X
Histone H2A.Z (H2AZ)		X
Pre-mRNA-splicing factor PRP21 (PRP21)		X

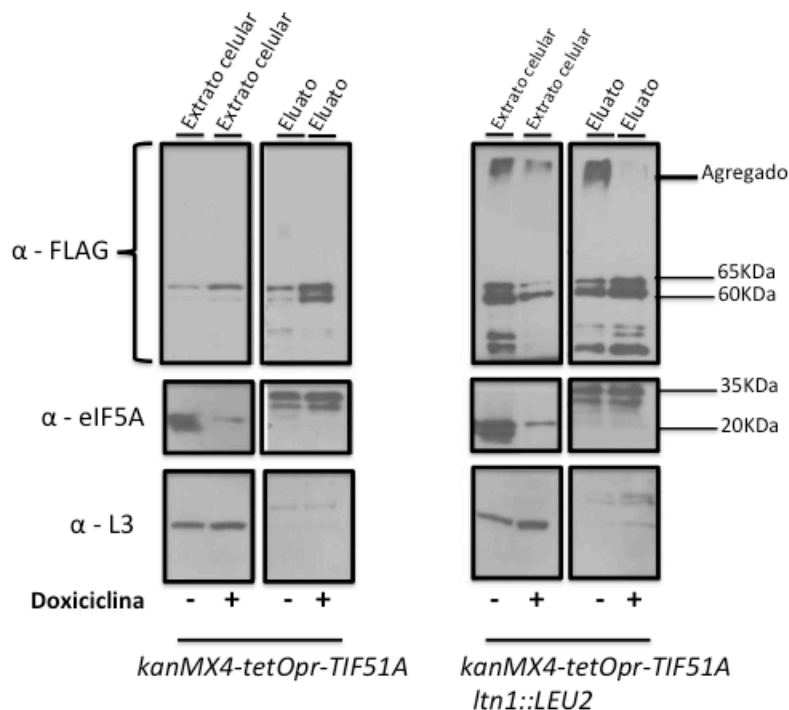


Figura 23. Ensaio de co-imunoprecipitação utilizando o gene repórter K12 nas linhagens VZL1074 e VZL1299. Ensaio de imunoprecipitação utilizando gene repórter (GFP-FLAG-2A-HIS3-K12-4HA) como isca. Foram utilizadas as linhagens VZL1074 (*tetO-TIF51A*) e VZL1299 (*tetO-TIF51A ltn1::LEU2*) tratadas ou não tratadas com 10 μ g/mL de doxíciclina por 19 horas. Foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-FLAG (Sigma) para detectar o gene repórter que tem, aproximadamente, 65 kDa em seu tamanho completo e, aproximadamente, 60 kDa na forma truncada. O anticorpo policlonal α -eIF5A mostrou os níveis da proteína eIF5A. O α -L3 foi utilizado para revelar a presença ou não da subunidade maior do ribossomo na amostra.

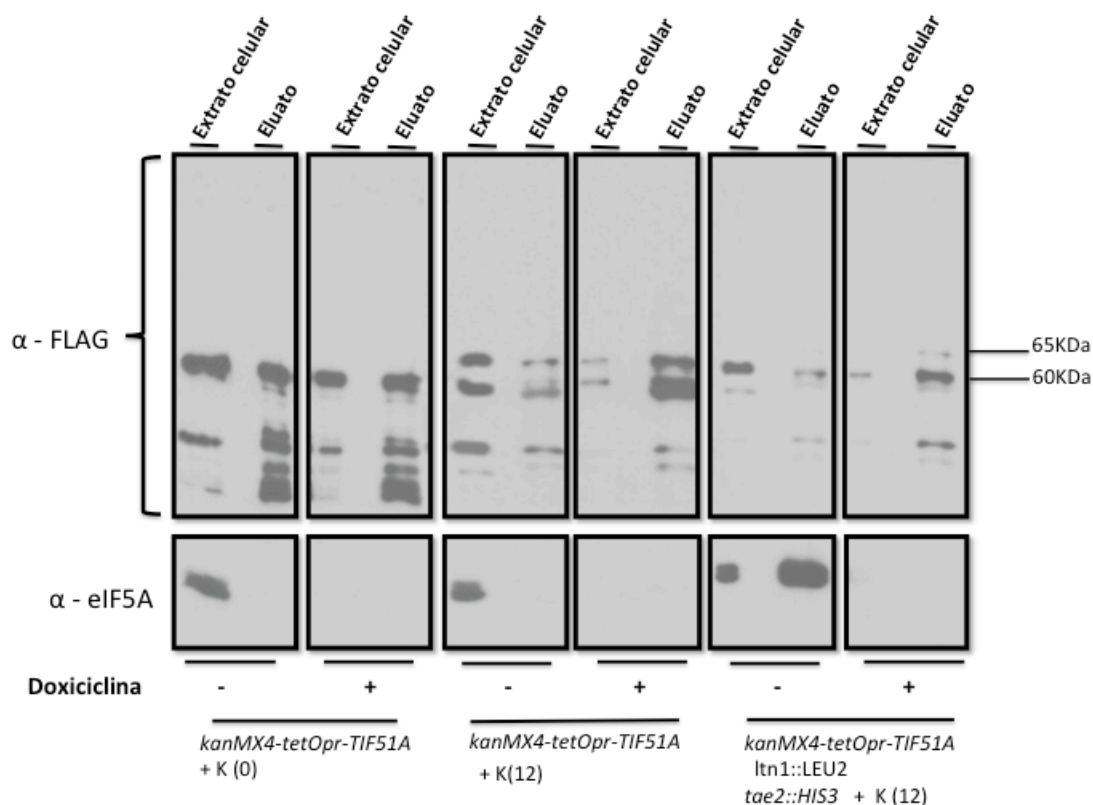


Figura 24. Ensaio de co-imunoprecipitação utilizando os genes repórteres K0 ou K12 nas linhagens VZL1074 e VZL1309. Ensaio de imunoprecipitação utilizando FLAG-tag como isca. Foram utilizadas a linhagem VZL1074 (*kanMX4-tetOpr-TIF51A*) transformada com o gene repórter GFP-FLAG-2A-HIS3-K12-4HA ou GFP-FLAG-2A-HIS3-4HA e a linhagem VZL1309 (*kanMX4-tetOpr-TIF51A ura3::CMV-tTA ltn1::LEU2 tae2::HIS3*) transformada com o gene repórter FLAG-2A-HIS3-K12-4HA. Todas as células foram tratadas ou não com 10µg/mL de doxiciclina por 19 horas. Foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-FLAG (Sigma) para detectar o gene repórter que tem, aproximadamente, 65 kDa em seu tamanho completo e, aproximadamente, 60 kDa na forma truncada. O anticorpo policlonal α-eIF5A mostrou os níveis da proteína eIF5A.

5. CONCLUSÕES

5.1. *Análise da interação física entre eIF5A e eEF2*

- eIF5A não interage fisicamente de forma direta com eEF2 através de ensaios de duplo-híbrido.
- A interação física entre eIF5A e eEF2 é dependente de complexos ribossomais.
- eIF5A e eEF2 não se ligam simultaneamente ao mesmo ribossomo ou se ligam mas não ocupam o mesmo ribossomo por muito tempo.

5.2. *Análise da interação funcional entre eIF5A e a proteína ribossomal L1*

- Os genes *TIF51A* e *RPL1B* possuem forte interação genética sintética negativa, demonstrada pelo impacto no crescimento celular e no perfil polissomal.
- A presença de L1 é possivelmente requerida para a correta interação de eIF5A no ribossomo.

5.3. *Análise da interação funcional entre eIF5A e o complexo RQC (Ribosome Quality Control)*

- O gene *TIF51A* interage geneticamente com os genes *LTN1* e *TAE2*.
- O complexo RQC não é recrutado em *stalling* de poliprolinas.
- eIF5A é necessária para a formação de agregados proteicos causados por poli-K (K12).
- eIF5A pode desempenhar um papel no funcionamento do RQC em *stalling* de polilisinas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amberg, D., 2005 *Methods in yeast genetics*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp., edited by D. Burke e S. JN.
- Andersen, C.B.F., Becker, T., Blau, M., Anand, M., Halic, M., *et al.* 2006. Structure of eEF3 e the mechanism of transfer RNA release from the E-site. *Nature* 443(7112):663-8.
- Ausubel, F., 2004 *Current protocols in molecular biology*, New York, pp., edited by R. Brent, R. Kingston, D. Moore, J. Sedman, J. Smith *et al.*
- Bailly, M., e V. de Crécy-Lagard, 2010 Predicting the pathway involved in post-translational modification of elongation factor P in a subset of bacterial species. *Biol Direct* 5: 3.
- Bengtson, M.H., e Joazeiro, C.A.P. 2010. Role of a ribosome-associated E3 ubiquitin ligase in protein quality control. *Nature* 467: 470-473.
- Blaha, G., Stanley, R. E e Steitz, T.A. 2009. Formation Of the first peptide bond: the structure of EF-P bound to the 70S ribosome. *Science* 325: 966-970
- Brandman O, Jacob Stewart-Ornstein, Daisy Wong, Adam Larson, Christopher C. Williams *et al.*, 2012 A ribosome-bound quality control complex triggers degradation of nascent peptides and signals translation stress. *Cell* 151(5):1042–1054
- Brochier, C., P. López-García e D. Moreira, 2004 Horizontal gene transfer and archaeal origin of deoxyhypusine synthase homologous genes in bacteria. *Gene* 330: 169-176.
- Cano, V. S., G. A. Jeon, H. E. Johansson, C. A. Henderson, J. H. Park *et al.*, 2008 Mutational analyses of human eIF5A-1 - identification of amino acid residues critical for eIF5A activity and hypusine modification. *Febs J* 275: 44-58.
- Chen, K. Y., e A. Y. Liu, 1997 Biochemistry and function of hypusine formation on eukaryotic initiation factor 5A. *Biol Signals* 6: 105-109.
- Defenouillère Q, Yao Y, Mouaikel J, Namane A, Galopier A, 2013 Cdc48-associated complex bound to 60S particles is required for the clearance of aberrant translation products. *Proc Natl Acad Sci*:110(13):5046-51
- Dever, T.E., Gutierrez, E. e Shin, B.S. The hypusine-containing translation factor eIF5A. 2014. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 49(5):413-25.

- Dias, C. A., V. S. Cano, S. M. Rangel, L. H. Apponi, M. C. Frigieri *et al.*, 2008. 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.
- Dimitrova L.N., Kuroha K., Tatematsu T. e Inada T. 2009. Nascent peptide-dependent translation arrest leads to Not4p-mediated protein degradation by the proteasome *J. Biol. Chem.*, 284, 10343–10352
- Doerfel, L. K., I. Wohlgemuth, C. Kothe, F. Peske, H. Urlaub *et al.*, 2013. EF-P is essential for rapid synthesis of proteins containing consecutive proline residues. *Science* 339: 85-88.
- Gough, J., K. Karplus, R. Hughey e C. Chothia, 2001. 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.
- Gregio, A. P., V. P. Cano, J. S. Avaca, S. R. Valentini e C. F. Zanelli, 2009. eIF5A has a function in the elongation step of translation in yeast. *Biochem Biophys Res Commun* 380: 785-790.
- Guthrie, C., e G. R. E. Fink, 1991 *Guide to Yeast Genetics*. New York, NY. Academic Press,
- Gutierrez, E., B. S. Shin, C. J. Woolstenhulme, J. R. Kim, P. Saini *et al.*, 2013. eIF5A Promotes Translation of Polyproline Motifs. *Mol Cell*.
- Hanawa-Suetsugu, K., S. Sekine, H. Sakai, C. Hori-Takemoto, T. Terada *et al.*, 2004. Crystal structure of elongation factor P from *Thermus thermophilus* HB8. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 9595-9600.
- Jao, D. L., e K. Y. Chen, 2006. 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.
- Kim, K. K., L. W. Hung, H. Yokota, R. Kim e S. H. Kim, 1998. Crystal structures of eukaryotic translation initiation factor 5A from *Methanococcus jannaschii* at 1.8 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 10419-10424.
- Letzring, D.P., Wolf, A.S., Brule, C.E., Grayhack, E.J. 2013. Translation of CGA codon repeats in yeast involves quality control components and ribosomal protein L1. *RNA*. 2013 (9):1208-17.

- Li, T., Belda-Palazón, B., Ferrando A. e Alepuz P. 2014. Fertility polarized cell growth depends on eIF5A for translation of polyproline-rich formins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 197(4):1191-200.
- Luke, M.M., Sutton, A. e Arndt, K.T.. 1991. Characterization of SIS1, a *Saccharomyces cerevisiae* homologue of bacterial dnaJ proteins. *J Cell Biol* 114(4):623-38
- Lyumkis, D., Dos Passos, D.O., Tahara, E.B., Webb Cristofor *et al.*, 2014. Strutural basis for translational surveillance by the large ribossomal subunit-associated protein quality control complex. *Proc Natl Acad.* pii: 201413882.
- Magdolen, V., H. Klier, T. Wohl, F. Klink, H. Hirt *et al.*, 1994. The function of the hypusine-containing proteins of yeast and other eukaryotes is well conserved. *Mol Gen Genet* 244: 646-652.
- Mcintosh, K. B., Bhattacharya, A. Willis, I.M., Warner, J.R., 2011. Eukaryotic Cells Producing Ribosomes Deficient in Rpl1 Are Hypersensitive to Defects in the Ubiquitin- Proteasome System. *PlosOne* 6(8).
- Navarre, W. W., S. B. Zou, H. Roy, J. L. Xie, A. Savchenko *et al.*, 2010. PoxA, yjeK, and elongation factor P coordinately modulate virulence and drug resistance in *Salmonella enterica*. *Mol Cell* 39: 209-221.
- Park, M. H., 1989 The essential role of hypusine in eukaryotic translation initiation factor 4D (eIF-4D). Purification of eIF-4D and its precursors and comparison of their activities. *J Biol Chem* 264: 18531-18535.
- Park, M. H., 2006. The Post-Translational Synthesis of a Polyamine-Derived Amino Acid, Hypusine, in the Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A (eIF5A). *J Biochem (Tokyo)* 139: 161-169.
- Park, M. H., Y. A. Joe e K. R. Kang, 1998. Deoxyhypusine synthase activity is essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 273: 1677-1683.
- Park, M. H., K. Nishimura, C. F. Zanelli e S. R. Valentini, 2010. Functional significance of eIF5A and its hypusine modification in eukaryotes. *Amino Acids* 38: 491-500.
- Park, M. H., E. C. Wolff e J. E. Folk, 1993. Hypusine: its post-translational formation in eukaryotic initiation factor 5A and its potential role in cellular regulation. *Biofactors* 4: 95-104.
- Park, S.H., Kukushkin, Y., Gupta, R., Chen, R. et al., 2013. PolyQ proteins interfere with nuclear degradation of cytosolic proteins by sequestering the Sis1p chaperone. *Cell* 154(1):134-45

- Peat, T. S., J. Newman, G. S. Waldo, J. Berendzen e T. C. Terwilliger, 1998. Structure of translation initiation factor 5A from *Pyrobaculum aerophilum* at 1.75 Å resolution. *Structure* 6: 1207-1214.
- Petitjean, A., Bonneaud, N., Lacroute, F. 1995. The duplicated *Saccharomyces cerevisiae* gene SSM1 encodes a eucaryotic homolog of the eubacterial and archaeobacterial L1 ribosomal proteins. *Mol Cell Biol* 15:5071–5081.
- Rotenberg, M.O., Moritz, M. e Woolford J.L.Jr. 1988. Depletion of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal protein L16 causes a decrease in 60S ribosomal subunits and formation of half-mer polyribosomes. *Genes Dev* 2: 160–170.
- Saini, P., D. E. Eyler, R. Green e T. E. Dever, 2009. Hypusine-containing protein eIF5A promotes translation elongation. *Nature* 459: 118-121.
- Schmidt, C., Becker, T., Heuer, A., Braunger, K., et al., 2015. Structure of the hypusinylated eukaryotic translation factor eIF-5A bound to the ribosome. *Nucleic Acids Research*,1-8 (Ahead of print)
- Schnier, J., H. G. Schwelberger, Z. Smit-McBride, H. A. Kang e J. W. Hershey, 1991. Translation initiation factor 5A and its hypusine modification are essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 11: 3105-3114.
- Smit-McBride, Z., J. Schnier, R. J. Kaufman e J. W. Hershey, 1989. Protein synthesis initiation factor eIF-4D. Functional comparison of native and unhypusinated forms of the protein. *J Biol Chem* 264: 18527-18530.
- Shen, P.S., Park, J., Qin, Y., Li, X., et al., 2014. Protein synthesis. Rqc2p and 60S ribosomal subunits mediate mRNA-independent elongation of nascent chains *Science*. 2015 Jan 2;347(6217):75-8.
- Subramanian, A. R. e Dabbs, E. R. 1980. Functional studies on ribosomes lacking protein L1 from mutant *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 112(2):425-30.
- Sutherland, B. W., Toews, J. e Kast, J. 2008. Utility of formaldehyde cross-linking and mass spectrometry in the study of protein-protein interactions. *J Mass Spectrom*, v. 43, n. 6, p. 699-715,
- Thompson, J. E., M. T. Hopkins, C. Taylor e T. W. Wang, 2004. Regulation of senescence by eukaryotic translation initiation factor 5A: implications for plant growth and development. *Trends Plant Sci* 9: 174-179.
- Tong, Y., I. Park, B. S. Hong, L. Nedyalkova, W. Tempel et al., 2009. Crystal structure of human eIF5A1: insight into functional similarity of human eIF5A1 and eIF5A2. *Proteins* 75: 1040-1045.

- Ude, S., J. Lassak, A. L. Starosta, T. Kraxenberger, D. N. Wilson *et al.*, 2013. Translation elongation factor EF-P alleviates ribosome stalling at polyproline stretches. *Science* 339: 82-85.
- Verma, R., Oania, R.S., Kolawa, N.J. e Deshaies, R.J., 2013. Cdc48/p97 promotes degradation of aberrant nascent polypeptide bounds to the ribosome. *elife* 2:e00308.
- Weir, B. A., e M. P. Yaffe, 2004. Mmd1p, a novel, conserved protein essential for normal mitochondrial morphology and distribution in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* 15: 1656-1665.
- Yanagisawa, T., T. Sumida, R. Ishii, C. Takemoto e S. Yokoyama, 2010. A paralog of lysyl-tRNA synthetase aminoacylates a conserved lysine residue in translation elongation factor P. *Nat Struct Mol Biol* 17: 1136-1143.
- Yao, M., A. Ohsawa, S. Kikukawa, I. Tanaka e M. Kimura, 2003 Crystal structure of hyperthermophilic Archaeal initiation factor 5A: a homologue of eukaryotic initiation factor 5A (eIF-5A). *J Biochem (Tokyo)* 133: 75-81.
- Zanelli, C. F., A. L. Maragno, A. P. Gregio, S. Komili, J. R. Pandolfi *et al.*, 2006. eIF5A binds to translational machinery components and affects translation in yeast. *Biochem Biophys Res Commun* 348: 1358-1366.

Capítulo 2
(Artigos e manuscritos relacionados
a este trabalho)

ANEXO 1

Negative Cooperative Binding of the Translation Factors eIF5A and eEF2 to the 80S Ribosome

Danuza Rossi^{1,2}, Natalia M. Barbosa¹, Fabio C. Galvão¹, Paulo E. G. Boldrin¹, John W. B. Hershey²,
Cleslei F. Zanelli¹, Christopher S. Fraser², Sandro R. Valentini^{1*}

¹From the Department of Biological Sciences, School of Pharmaceutical Sciences, UNESP - Univ.

Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brazil, 14801

²Department of Molecular and Cellular Biology, University of California, Davis, CA, USA, 95616

Running title: **Negative cooperative binding of eIF5A and eEF2 to the 80S**

To whom correspondence should be addressed: Sandro R. Valentini, Department of Biological Sciences,
School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University-UNESP, Rod Araraquara-Jaú Km01,
Araraquara, SP, Brazil, Tel.: (+55) 16 3301-6996; Fax: (+55) 16 33016954; Email:
valentsr@fcar.unesp.br

Keywords: eIF5A (eukaryotic initiation factor 5A); eEF2 (eukaryotic elongation factor 2); translational
control; translation elongation; ribosome binding; fluorescence anisotropy; hypusine

Abstract

eIF5A is the only protein known to contain the essential and unique amino acid residue hypusine. eIF5A functions in both translation initiation due to its stimulation of methionyl-puromycin synthesis and translation elongation, being highly required for peptide-bound formation of specific ribosome stalling sequences such as poly-proline. The functional interaction between eIF5A, tRNA, and eEF2 on the surface of the ribosome is further clarified herein. Fluorescence anisotropy assays were performed to determine the affinity of eIF5A to different ribosomal complexes and reveal its interaction exclusively and directly with the 60S ribosomal subunit in a hypusine-dependent manner ($K_i^{60S-eIF5A-Hyp}=16$ nM, $K_i^{60S-eIF5A-Lys}=385$ nM). A 3-fold increase in eIF5A affinity to the 80S is observed upon charged-tRNA_i^{Met} binding, indicating positive cooperativity between P-site tRNA binding and eIF5A binding to the ribosome. Previously identified conditional mutants of yeast eIF5A, eIF5A^{Q22H/L93F} and eIF5A^{K56A}, display a significant decrease in ribosome binding affinity. Binding affinity between ribosome and eIF5A-wild type or mutants eIF5A^{K56A}, but not eIF5A^{Q22H/L93F}, is impaired in the presence of eEF2 by 4-fold, consistent with negative cooperativity between eEF2 and eIF5A binding to the ribosome. Interestingly, high-copy eEF2 is toxic only to eIF5A^{Q22H/L93F} and causes translation elongation defects in this mutant. These results suggest that binding of eEF2 to the ribosome alters its conformation, resulting in a weakened affinity of eIF5A and impairment of this interplay compromises cell growth due to translation elongation defects.

Introduction

eIF5A was initially classified as the eukaryotic translation initiation factor 5A due to its stimulation of methionyl-puromycin synthesis (1,2). This essential factor is a small acidic protein (17 kDa) composed of two predominantly β -barrel domains. The N-terminal, positively charged, is highly conserved in Archaeas and eukaryotes (3) and is the target of a specific and essential posttranslational modification called hypusination (4-6). To be modified, deoxyhypusine synthase (DHPS in human and Dys1 in yeast) transfers a 4-aminobutyl moiety from the polyamine spermidine to a specific lysine residue of eIF5A to form deoxyhypusine, in an NAD-dependent manner. Thus, the hydroxylation of the second carbon of the deoxyhypusine residue is catalyzed by deoxyhypusine hydroxylase (DOHH in human and Lia1 in yeast, (7,8).

Despite the initial evidence for a function in the initiation step of translation, eIF5A was also involved in the translation elongation as loss-of-function mutants of this factor revealed, by polysome profile and ribosome transit time analysis, defects in elongating ribosomes, suggestive of malfunctioning of a canonical translation elongation factor (9,10).

eIF5A has a structural and functional homolog in bacteria, the elongation factor P (EF-P) (reviewed in (11)). Similarly to eIF5A, different species of bacteria undergo post-translation modifications in a corresponding loop of EF-P that is modified in eIF5A: β -lysinylation, an incorporation of lysine in a specific lysine (12-14), and arginine-rhamnosylation, an incorporation of rhamnose in a specific residue of arginine (15).

The crystal structure of EF-P(unmodified)-70S complex was determined (16) and a model of eIF5A binding to the ribosome was proposed based on hydroxyl-radical probing (17). Both structural data show EF-P/eIF5A binding site between the P and E sites of the 80S with the modified long loop reaching towards the peptidyl-transferase center (PTC). Although no crystal structure is yet available for modified EF-P/eIF5A bound to the ribosome, the positioning revealed by molecular modeling for hypusine, lysyl-lysine and rhamnose-arginine residues in the PTC region is in the vicinity of the CCA-tRNA end, which

likely helps to stabilize the P-site peptidyl-tRNA (15). Moreover, based on the fact that the binding site on the ribosome partially overlaps with that of E-site tRNA, it has been suggested that eIF5A binds to the ribosome only when this site is empty (18), *i. e.*, in the first round of peptide formation, in agreement with a function in translation initiation (19), and in each cycle of elongation (9,10).

More recently, it was shown that both eIF5A and EF-P promote peptide-bound formation of proline-rich ribosome stalling sequences (17,20,21). This function has been more extensively studied for EF-P, where ribosome stalling events do not depend only on proline-rich ribosome stalling sequences (22-26), but also on its location relative to the start codon and the translation efficiency due to the ribosome occupancy on the mRNA (26), indicating that other elements contribute to slowing down elongation rates.

In this context, it is not known whether other translation factors influence EF-P/eIF5A relief of stalling ribosomes. Regarding the functional correlation of eIF5A and other translation factors, we have previously shown that eIF5A interacts genetically and functionally with the eukaryotic elongation factor 2 (eEF2), as the growth and protein synthesis defects of the loss-of-function mutant eIF5A^{K56A} are suppressed in the presence of high-copy eEF2 (27).

In order to better understand the dynamics behind the elongation step of translation, we herein demonstrate the effect of eEF2 on eIF5A ribosome binding affinity. Our results show that the binding of eEF2 weakens eIF5A affinity for the 80S, possibly induced by conformation changes. Moreover, *in vivo* data suggest that this interplay between eIF5A and eEF2 binding to the ribosome is important for a balance in translation elongation.

Materials and methods

Sample preparation

The human eIF5A isoform 1 hypusine-containing (heIF5A-Hyp) and unmodified lysine-containing (heIF5A-Lys) were expressed and purified based on previous protocol (28), slightly modified. Briefly, 2 L of BL21(DE3)groES (Takara Bio) cells containing the polycistronic vector co-expressing eIF5A and its modifying enzymes (DHPS and DOHH) were harvested after 16 h of induction at 18 °C. Cells were treated as previously described and the first ion exchange chromatography to purify eIF5A was performed using the 5 mL HiTrap-Q column (GE Healthcare). To separate both forms of eIF5A, it was used the 5 mL HiTrap-SP column (GE Healthcare). eIF5A-Hyp and eIF5A-Lys elute approximately at 130 mM of KCl and 230 mM KCl, respectively.

Expression and purification of yeast eIF5A proteins (yeIF5A-wt (wild type), or mutants yeIF5A^{C39A}, yeIF5A^{C39A,K56A} and yeIF5A^{C39A,Q22H,L93F}) were similar to human proteins, using the polycistronic vector co-expressing the corresponding yeast genes of the modifying enzymes (*DYS1* and *LIA1*). In this case, *TIF51A* was cloned in a vector that allows the addition of a 6xHis-tag sequence in the N-terminus of the protein. Cells were induced, harvested and lysed as previously described in the ice-cold Buffer A' (50 mM Tris-Cl pH 7.0; 0.1 mM EDTA; 300 mM KCl; 1 mM DTT; 20 mM Imidazole). The lysate was mixed with 5 mL of equilibrated NiNTA resin (Qiagen) and proteins were eluted in Buffer B' (Buffer A' containing 250 mM imidazole). Eluate was dialyzed against Buffer C' (50 mM Tris-Cl pH 7.0; 0.1 mM EDTA; 1 mM DTT) and cationic chromatography in SP column was performed as described.

Yeast ribosomes were prepared based on previous protocols (29,30) with some modifications. About 30-40 g of cells from early saturated culture of 1-2 OD were immediately frozen in liquid N₂ and lysed in 40 mL of Lysis Buffer (20 mM Hepes pH 7.5; 100 mM KCl, 5 mM Mg(OAc)₂, 1 mM DTT, Protease Inhibitors). Cells were splitted into 3-4 round-bottom tubes containing 20 g of glass beads and vortexed during 6 cycles of 1 min ON - 1 min OFF, at 4°C. Twenty-five mL of clarified lysate were

loaded on the top of a 20% sucrose cushion (20 mM Hepes pH 7.5; 100 mM KCl; 5 mM Mg(OAc)₂; 1 mM DTT) in a Beckman Ti45 tube. The purification of ribosomes and the separation of 40S and 60S subunits were performed as previously described (29).

Human ribosomes were purified from HeLa cell extracts exactly as previously described (29). Human initiator tRNA was *in vitro* transcribed with T7 RNA polymerase and methionylated by *Escherichia coli* methionyl-tRNA synthetase as previously described (29). Recombinant 6xHis-eEF2 was purified as published (31). The molarity of tRNAs, proteins and ribosomes were determined by 280 or 260 nM absorbance and their molecular mass.

Protein labeling with fluorescein

The purified single-cysteine mutant of human eIF5A, eIF5A^{C22A,C38A,C73A,C129A,T142C} (eIF5A^{T142C}), was labeled with fluorescein-5-maleimide (fl) (Thermo Scientific) following the published protocol (32). After the labeling reaction, eIF5A-fl was purified from the free dye by spinning in a 2 mL size exclusion column of 6 kDa (BioRad). The amounts of dye and protein were evaluated by 495 nM absorbance and quantitative dotblot using the wild-type protein as standard. Only the preparation with more than 95% of labeling was used for fluorescence anisotropy assays.

Separation of ribosomal complexes

The mixture of ribosomes and the proteins of interest were isolated by ultracentrifugation in sucrose cushion following published protocols (33,34). Yeast 80S ribosomes were incubated at 0.5 μM or 1.0 μM with stoichiometric amounts of eIF5A-Hyp, eIF5A-Lys or eEF2 in a 25 μL final reaction (20 mM Hepes pH 7.5; 100 mM KOAc; 2.5 mM Mg(OAc)₂; 1 mM DTT; 15 μM BSA). The reaction was incubated at 30 °C for 30 min and rapidly chilled on ice. Only 10% of this volume was reserved as input (I) and 20 μL was layered on the top of a 10% sucrose cushion (100 μL) followed by centrifugation at 200.000 rcf for 1 hr at 4 °C (Beckman rotor TLS-55). Then, an aliquot of 20 μL from the top of the

supernatant (S) was saved and the pellet (P) was resuspended in 20 μ L of Milli-Q water. Fractions of I, S and P were analyzed by western blot using polyclonal anti-eIF5A, anti-Rpl5 and anti-eEF2 and fluorescent secondary antibody (Thermo).

Fluorescence Anisotropy

Binding experiments with fluorescein-labeled eIF5A (eIF5A-fl) were conducted using a VICTOR X5 Multilabel Plate Reader (Perkin Elmer), as previously described (29,32). A concentration of eIF5A-fl was maintained at 5-10 nM in each reaction. Ribosomes were titrated for each complex with final concentrations at: 2 μ M 40S; 1 μ M 60S and 500 nM 80S. For competition assays, the concentration of ribosome was constant at 50 nM with 5 μ M of starting competitors concentration. The addition of higher concentrations of either ribosome or competitor did not change the equilibrium inhibition constant values, indicating that the reaction was prepared in saturating conditions. Anisotropy binding reactions were set up in 22 μ L final volume in reaction buffer (20 mM Hepes pH 7.5; 100 mM KOAc; 2.5 mM Mg(OAc)₂; 1 mM DTT; 15 μ M BSA) and increasing concentrations of ribosome were added indicated in the Figure 3 legend. Twenty μ L of each reaction was transferred to a 384-wells plate, and incubated at 30 °C for 30 min to reach equilibrium. Fluorescence Polarized light (FP) and total fluorescence were measured and the anisotropy change (r) was converted into the fraction of eIF5A-fl bound to the ribosome and fitted to the solution of a quadratic equation describing an equilibrium reaction (32). Inhibition constants (K_i) of non-labeled eIF5As were determined in a similar way to that described above, using a preformed ribosomal complex-eIF5A-fl. The values presented in the Table 1 were obtained from the average of three independent experiments, and the errors are standard deviations of the mean.

Physical interaction by two-hybrid system

The used assay was previously optimized (35). The L40 strain (SVL86) was transformed with plasmids encoding Gal4-eIF5A (vector pACT, pSV285) and *lexA-eEF2* (vector pBTM116, pSV272) to test for the transcription of the reporter genes *HIS3* and *lacZ* (35,36).

GST-pulldown

Wild-type cells (VZL1074) expressing GST (pSV20) or GST-eIF5A (pSV36) were grown in SC-ura + 2% galactose until $OD_{600}=0.8$. Cells were collected in chilled bottles and treated with 1% formaldehyde for 30 min at 4 °C. To quench the formaldehyde, 125 mM glycine was added to the treated cells and incubated for 5 min. After washing, cells were disrupted in lysis buffer 1x (Tris - HCl 20 mM pH 7.5; KOAc 50 mM; $MgCl_2$ 10 mM; DTT 1mM and protease inhibitor cocktail) by vortex agitation with glass beads. The clarified lysate was subjected to RNase A digestion (1 mg extract : 30 µg RNase A) for 30 min at room temperature. A volume of the lysate corresponding to 10 $OD_{254\text{ nm}}$ units was loaded onto an analytical 10-50% sucrose gradient to confirm the digestion of polysomes. The remaining extract was subjected to GST-pulldown according to a published protocol (37). Western blot analysis of input (I), wash (data not shown) and bound (B) fractions from GST-eIF5A and GST was performed using rabbit polyclonal specific antibodies against eIF5A, Rpl5 and eEF2, and an ECL system of detection.

Total Protein synthesis

The measurement of total protein synthesis of wild-type eIF5A (VZL838) and the mutants eIF5A^{K56A} (VZL987) and eIF5A^{Q22H/L93F} (VZL821), in the absence (pSV65) or presence of high-copy eEF2 (pSV262), was conducted as described previously (38).

Polysome profile and fraction analysis

The polysome profile of the same strains described above, in the absence or presence of high-copy eEF2, was performed as previously described (39). Proteins from 500 μ L of each fraction were precipitated by the addition of 175 μ L of 100% trichloroacetic acid (TCA) (final concentration of 13%). After 1-16 h at -20 $^{\circ}$ C, proteins were pelleted by centrifugation at 20,000 rcf for 20 min at 4 $^{\circ}$ C and washed with 1 mL of pure acetone for 1 h at -20 $^{\circ}$ C. The protein pellet was resuspended into 40 μ L of 1X SDS loading buffer and 10 μ L was analyzed by SDS-PAGE and western blotting. To better detect the differences between the amount of polysomes from each sample, the area of polysome/monosome fractions was calculated (NIH Image J), using the distance from the lower valley to the highest peak.

Results

Mutually exclusive binding of eIF5A and eEF2 to translating ribosomes

We have previously described the physical interaction between eIF5A and eEF2 and show that this interaction is dependent on the ribosomes (37). The possibility of a direct physical interaction between these factors was further investigated *in vivo* by two-hybrid analysis in yeast (Fig. 1A). The modified yeast strain L40 carries the reporter genes *HIS3* and *lacZ* whose expression is triggered in the system used by the proximity of Gal4-AD (Gal4-activation domain, pACT-eIF5A) and lexA (pBTM116-eEF2). Initially, the levels of fused proteins were tested by western blot to ensure their expression (data not shown). The absence of growth in the selective medium (SC-leu, -trp, -his) and the lack of β -gal activity resultant in the combination of eIF5A and eEF2 (Fig. 1A) indicate that these factors do not interact directly or close enough to activate the transcription of *HIS3* and *lacZ*, respectively.

Figure 1. Evaluation of physical interaction between eIF5A and eEF2 by two-hybrid and GST-pulldown of monosomes. **A.** Two-hybrid assay. The strain L40 containing pACT-eIF5A was transformed with pBTM116-eEF2, Dys1, Lia1 or Pub1. Ten-fold serial dilution of the transformants were grown on SC-leu,-trp (growth control) and SC-leu,-trp,-his (*HIS3* expression). Cells were dropped on nitrocellulose membrane to perform the β -gal activity filter assay (*lacZ* expression). The interaction eIF5A-Pub1 was used as negative control, and eIF5A-Dys1 (strong) or eIF5A-Lia1 (weak) were used as positive controls (8). **B.** Schematic of sample preparation for the *in vivo* GST-eIF5A pull down of monosomes (left panel). Cells were treated with formaldehyde 1% and the extract was treated or not with RNase A to digest polysomes. Polysome profile analysis of the total extract treated or untreated with RNase A (right panel). **C.** GST-pulldown assay. Western blot analysis of GST-pull down fractions, input (I) and bound (B), using specific polyclonal antibodies against eEF2, Rpl5 and eIF5A.

In order to evaluate whether this interaction can occur on the same ribosome, we investigated whether the binding of these proteins is dependent on monosomes or polysomes. To this end, a functional GST-eIF5A fusion protein was used in an *in vivo* pull-down assay. Cells expressing GST-eIF5A or GST were first treated with formaldehyde to preserve the translation machinery (40). Total cell extracts were then incubated in the absence or presence of RNase A to digest the mRNA, converting active polysomes into monosomes (Fig. 1B, left panel). The efficiency of mRNA digestion was confirmed, as a single peak of well preserved 80S monosomes can be seen in the sample treated with RNase A (Fig. 1B, right panel). GST-eIF5A pull-downs from untreated, or RNase A treated, lysates are shown in Figure 1C as input (I) and bound (B) fractions. A negative control of GST alone was carried out in parallel to confirm the specificity of the GST-eIF5A pull-down assay. The ribosomal protein L5 (Rpl5) was used to confirm the co-purification of ribosomes by GST-eIF5A. The presence of eEF2 in the fraction B of untreated sample confirms our published data that eIF5A copurifies with ribosome complexes containing eEF2 (37). Strikingly, eEF2 is no longer detected in the fraction B after the digestion of polysomes with RNase A. This implies that the interaction between eIF5A and eEF2 only occurs when multiple ribosomes on the same mRNA (polysomes) are purified rather than monosomes. This is consistent with negative cooperativity between eIF5A and eEF2 binding to the 80S ribosome.

eEF2 and hypusine-containing eIF5A are able to displace endogenous eIF5A from the ribosome

Since eIF5A and eEF2 act in the same step of translation but are not detected on the same ribosome, we tested if purified eIF5A and eEF2 can dissociate endogenous eIF5A from purified ribosomes. Pre-assembled 80S ribosomes were purified from yeast lysate and incubated with recombinant eEF2, eIF5A-Lys or eIF5A-Hyp (1 μ M of each component) followed by ultracentrifugation in a 10% sucrose cushion. Western blot analysis of the input (I), supernatant (S) and pellet (P) fractions are shown

in Figs. 2A and 2B. Endogenous eIF5A, eEF2 and Rpl5 were detected in all samples of pre-assembled 80S (I fractions). The P fraction of the sample containing only 80S reveals the endogenous level of eIF5A and eEF2 (Fig. 2A, left panel). The addition of recombinant eEF2 to the 80S displaces endogenous eIF5A from the ribosome (Fig. 2A, right panel).

Figure 2. Displacement of endogenous eIF5A from the 80S ribosome by eEF2 or the hypusine-containing eIF5A. Ultracentrifugation of pre-assembled 80S on a 10% sucrose cushion after incubation with recombinant eEF2 (A), eIF5A-Lys or eIF5A-Hyp (B). Input (I), supernatant (S) and pellet (P) samples were subjected to western blot analysis and the proteins eEF2, eIF5A and Rpl5 were detected using specific antibodies.

To determine if hypusinated eIF5A is required for ribosome binding, the ability of recombinant eIF5A-Lys or eIF5A-Hyp to displace endogenous eIF5A was tested. In this case, the P fractions revealed that both recombinant proteins bind to ribosomes, but only the active form of eIF5A can displace the endogenous eIF5A (Fig. 2B). This suggests that the binding affinity of eIF5A-Hyp to the ribosome is higher than eIF5A-Lys, and that the displacement of endogenous eIF5A is due to direct competition. The fact that endogenous eIF5A can also be displaced by the addition of eEF2 confirms that both factors cannot co-exist in the same ribosome at the same time under these experimental conditions.

The hypusine-containing eIF5A efficiently binds to different ribosomal complexes and its binding affinity is dramatically reduced in the mutants eIF5A^{Q22H/L93F} and eIF5A^{K56A}

A fluorescence anisotropy assay was developed to quantitatively evaluate the effect of eEF2 on the affinity of eIF5A binding to the 80S ribosome. In order to generate a robust anisotropy signal, we

explored the binding of several yeast and human eIF5A-single cysteine mutants to purified yeast ribosomes. Using both yeast and human eIF5A proteins for this purpose is made possible in light of the finding that wild-type human eIF5A is able to replace the endogenous yeast eIF5A *in vivo* (6). Only the functional human eIF5A mutants were purified and then fluorescein-labeled in an *in vitro* reaction using both the hypusine and non-hypusine containing eIF5A proteins (see Material and Methods). Among nine different single-cys mutants obtained (data not shown) and tested for fluorescence anisotropy, the human eIF5A^{C22A, C38A, C73A, C129S, T142C} (eIF5A^{T142C}) was selected among several mutants for further assays.

To first investigate the binding of human hypusine-containing eIF5A to purified human 60S subunits, the purified subunit was titrated into 5-10 nM of human eIF5A-fluorescein (eIF5A^{T142C}-fl) and the anisotropy changes were measured. Converting *r*-values into the fraction of eIF5A bound to 60S yields an equilibrium dissociation constant (K_d) of 128 nM (Table 1). To determine whether the mutations and the presence of the fluorescein affect the interaction with 60S subunits, we also determined equilibrium dissociation constants for an unlabeled eIF5A “inhibitor” (K_i) by titrating the non-labeled eIF5A into a fixed amount of pre-formed complex (60S-eIF5A-fl), as described in ‘Experimental Procedures’. In this case, the maximum anisotropy change reveals a high affinity for the non-labeled-eIF5A-60S, K_i = 16 nM (Table 1, solid black line in Fig. 3A). The graph in Fig. 3A shows the fraction of eIF5A-fl bound to the 60S in the presence of increasing amounts of hypusine (heIF5A1-Hyp) and non-hypusine containing eIF5A (heIF5A1-Lys), with the average values for each inhibition constant (K_i , nM) shown in parenthesis. The discrepancy between K_d and K_i (8-fold change) suggests that the fluorophore affects the binding affinity of eIF5A to the 60S. Due to this observation, all the following equilibrium binding data were generated using the non-labeled form of human eIF5A^{T142C} in competition assays. Furthermore, the importance of the hypusine residue was also determined by eIF5A-ribosome anisotropy change using the non-hypusine containing eIF5A^{T142C}, as a competitor. Equilibrium binding of non-hypusinated eIF5A^{T142C} to purified 60S subunits was 24-fold weaker than hypusine-containing eIF5A (K_i = 385 nM, dashed black line in Fig. 3A), in agreement with the requirement of hypusine for eIF5A function (6,41).

Table 1. Values of mean and standard deviation of the anisotropy change and equilibrium binding constants K_d and K_i .

	K_d^a (nM)	K_i^b (nM)	r_{free} or r_{min}^c	r_{bound}^d	Δr_{max}^e
$f_{\text{eIF5A-fl}}$					
Met-tRNA _i ^{Met}	nc	nd	0.176 ± 0.001	0.178 ± 0.004	0.002 ± 0.001
40S	$i > 1700$	nd	0.179 ± 0.007	0.186 ± 0.006	0.006 ± 0.001
60S	128 ± 3	16 ± 3	0.173 ± 0.001	0.228 ± 0.006	0.055 ± 0.005
40S+60S	13 ± 1	12 ± 0.5	0.180 ± 0.001	0.314 ± 0.001	0.135 ± 0.001
40S+60S + tRNA _i Met-Met	7 ± 1	$j \leq 5$	0.198 ± 0.002	0.304 ± 0.006	0.106 ± 0.004
^g 80S	10 ± 1	$j \leq 5$	0.187 ± 0.005	0.287 ± 0.001	0.100 ± 0.005
^g 80S + eEF2	41 ± 1	nd	0.134 ± 0.001	0.259 ± 0.005	0.125 ± 0.005
$f_{\text{60S-eIF5A-fl}}$					
eIF5A-Lys	nd	385 ± 18	0.186 ± 0.003	0.262 ± 0.001	0.076 ± 0.003
$h_{\text{80S-eIF5A-fl}}$					
eIF5A	nd	9 ± 1	0.177 ± 0.001	0.247 ± 0.006	0.069 ± 0.006
eIF5A ^{K56A}	nd	569 ± 12	0.182 ± 0.003	0.248 ± 0.007	0.066 ± 0.009
eIF5A ^{Q22H/L93F}	nd	189 ± 8	0.168 ± 0.005	0.244 ± 0.006	0.076 ± 0.001
$h_{\text{80S-eIF5A-fl} + \text{eEF2}}$					
eIF5A	nd	51 ± 3	0.174 ± 0.001	0.242 ± 0.008	0.067 ± 0.007
eIF5A ^{K56A}	nd	539 ± 53	0.204 ± 0.006	0.237 ± 0.010	0.033 ± 0.005

eIF5A ^{Q22H/L93F}	nd	454 ± 40	0.188 ± 0.009	0.241 ± 0.010	0.052 ± 0.005
----------------------------	----	----------	---------------	---------------	---------------

^a Equilibrium binding constant obtained by titrating ribosomal complexes into fixed amount of eIF5A-fl;

^b Equilibrium binding constant obtained by titrating eIF5A as a competitor into fixed amount of ribosome-eIF5A-fl;

^c Anisotropy values for the free eIF5A-fl or the minimum anisotropy detected for the competition assays;

^d Anisotropy of the eIF5A-fl bound to the ribosomal complex in the absence of competitors;

^e Maximum anisotropy change obtained by the difference between r_{free} or r_{min} and r_{bound} ;

^f Determination of anisotropy change using human proteins and ribosome;

^g The ribosomal complex is the yeast pre-assembled 80S;

^h Determination anisotropy change using yeast eIF5As as competitor and yeast 80S;

ⁱ Lower limits of detection was not superior of 1 μM ;

^j Upper limits of detection was not inferior of 5 nM;

nd = not determined measurements;

nc = not calculated binding constant.

Figure 3. Determination of binding affinity of the hypusine-containing human eIF5A to different ribosomal complexes by fluorescence anisotropy assays. **A.** Fluorescence anisotropy changes were measured to calculate the inhibition constant (K_i) for the heIF5A-60S interaction. Equilibrium binding of eIF5A-fl to 60S under the competition with the hypusine and non-hypusine containing eIF5A (heIF5A-Hyp and heIF5A-Lys). **B.** Equilibrium binding of eIF5A-fl to human ribosomal complexes 60S, 40S+60S, 40S+60S+Met-tRNA_i^{Met} and pre-assembled yeast 80S under the competition with heIF5A-Hyp. Each point represents the real measurements from three independent triplicates and the error bars correspond to the standard deviations of the mean. Inhibition constants (nM) are shown in parenthesis. Values of anisotropy and equilibrium binding constants (K_d and K_i) as well as the standard deviations of the mean are noted in Table 1.

It is well described for the translation initiation step that the eukaryotic initiation factors (eIFs) binding affinity to the 40S is extremely variable depending on the composition of the ribosomal complexes (42). Therefore, we investigated binding affinity of eIF5A to 40S, 40S+60S, 40S+60S+Met-tRNA_i^{Met} or *in vivo* pre-assembled 80S (heterogeneous mixture of yeast 80S). We first determined the equilibrium dissociation constant of human eIF5A-fl to the human 40S+60S, 40S+60S+Met-tRNA_i^{Met} or yeast pre-assembled 80S complexes (Table 1). Inhibition constants were also determined by titrating non-labeled hypusine-containing human eIF5A (eIF5A-Hyp) into fixed amount of ribosome-eIF5A-fl complexes (Fig. 3B and Table 1). The graph in the Fig. 3B shows the fraction of eIF5A-fl bound to 60S (black curve), 40S+60S (green), 40S+60S+Met-tRNA_i^{Met} (orange) and yeast pre-assembled 80S complexes (red). The values of K_i are in parenthesis. The apparent K_i values are not significantly different when the 80S is reconstituted ($K_i^{40S+60S}=12$ nM), compared to the 60S alone (16 nM). Curiously, the addition of tRNA to the preparation of reconstituted 80S increases the affinity of eIF5A to the ribosome roughly 3-fold ($K_i^{40+60+tRNA} \leq 5$ nM), which is similar to the affinity of eIF5A to the yeast pre-assembled 80S complexes ($K_i^{80S} \leq 5$ nM). Due to the fact that these constants are similar to the concentration of the labeled protein (5 nM), the apparent K_i values are likely upper limits.

Molecular modeling based on the structure of the EF-P-70S crystal (16) and 25S rRNA cleavage assays (17) strongly suggest that eIF5A does not interact with the small ribosomal subunit 40S. Titrating 40S instead of 60S under the fixed amount of eIF5A-fl generated very low measurements of anisotropy change (r_{bound} and Δr_{max} , Table 1), consistent with a lack of interaction between eIF5A and purified 40S subunits. The calculated $K_d > 1700$ nM is not precise due to the lower limits of detection. Similarly, interaction between eIF5A-fl and aminoacylated-tRNA_i^{Met} was tested and also revealed very low measurements for anisotropy change (Table 1), also consistent with no interaction between eIF5A and aminoacylated-tRNA_i^{Met}.

Yeast eIF5A was also used in our fluorescence anisotropy assay to determine its binding affinity to purified yeast 80S complexes. The same single-cys mutant (eIF5A^{T142C}) was used to preserve the same conditions and allow comparisons with assays performed using human proteins and ribosomes. Since the

highest affinity ribosomal complex for human eIF5A was either human 80S+tRNA or yeast pre-assembled 80S (≤ 5 nM), the last was chosen to evaluate the binding affinity of the following single-cysteine yeast proteins: eIF5A^{C39A} (wt), eIF5A^{C39A,K56A} (eIF5A^{K56A}) and eIF5A^{C39A,Q22H,L93F} (eIF5A^{Q22H/L93F}).

To determine the binding affinity to the 80S, these proteins were titrated individually into a fixed amount of pre-formed 80S-eIF5A-fl, and the change in fluorescence anisotropy was measured to calculate the inhibition constant in equilibrium conditions (Table 1). The fraction of eIF5A-fl bound to 80S and the K_i values are shown in Fig. 4B (solid lines). The binding assays revealed a very similar affinity of yeast wt eIF5A compared with human eIF5A for 80S complexes ($K_i=9$ nM, black solid line). Interestingly, slightly weaker binding affinities were obtained for the mutants eIF5A^{K56A} and eIF5A^{Q22H/L93F}, resulting in decreased ribosome binding affinity by 20 and 60-fold, respectively ($K_i=189$ nM, red solid line; $K_i=569$ nM, green solid line).

Figure 4. Analysis of the anticooperative effect of eEF2 on eIF5A ribosome binding. **A.** Equilibrium binding of eIF5A-fl to the yeast 80S in the presence or not of yeast eEF2. **B.** Equilibrium binding of eIF5A-fl to the 80S under the competition with wt, eIF5A^{K56A} or eIF5A^{Q22H/L93F}, in the presence or not of saturating eEF2. The mean of K_i values is shown in parenthesis. The values of equilibrium binding constants and anisotropy changes are shown in Table 1.

eEF2 impairs ribosome interaction of wild type eIF5A and eIF5A^{K56A} but not eIF5A^{Q22H/L93F}

Having determined the eIF5A equilibrium binding constants to different ribosomal complexes, we evaluated the effect of the presence of eEF2 on eIF5A ribosome binding. The *in vivo* pre-assembled purified 80S was used in the assay as it forms the most stable complex with eIF5A. The pre-assembled 80S ribosome was titrated into fixed amount of eIF5A-fl in the absence or presence of saturating eEF2 (1 μ M). The equilibrium binding constant obtained in the presence of eEF2 ($K_d = 40$ nM) was 4-fold weaker than in the absence of eEF2 ($K_d = 10$ nM), supporting the hypothesis that eEF2 weakens the interaction of

eIF5A with the ribosome (Fig. 4A and Table 1). To confirm the saturation condition of eEF2, this assay was carried out also in the presence of 2 μ M eEF2 and similar results were obtained (data not shown).

The evidence for an anticooperative binding mechanism between eIF5A and eEF2 for the 80S ribosome was further investigated under conditions where the eIF5A-ribosome interaction is partially lost, *e.g.*, as in the case of the mutants eIF5A^{K56A} and eIF5A^{Q22H/L93F}. Again, changes in anisotropy measurements (Table 1) were detected and Fig. 4B shows curves of fraction of eIF5A-fl bound to 80S under the competition with wt (black), eIF5A^{K56A} (red) or eIF5A^{Q22H/L93F} (green), in the absence (solid lines) or presence of eEF2 (dash lines). The equilibrium binding reveals a 3-fold decreased affinity to 80S for the mutant eIF5A^{K56A} in the presence of eEF2, similarly to what was observed for the wt eIF5A (4-fold). Surprisingly, the addition of eEF2 did not cause any effect on eIF5A^{Q22H/L93F} affinity to the ribosome, revealed by similar binding constants ($K \approx 500$ nM). These results reveal that Q22 and L93 play an essential role in the negative cooperative binding of eIF5A and eEF2 to the 80S.

eEF2 overexpression in the mutant eIF5A^{Q22H/L93F} is toxic due to the impairment in the dynamics behind the elongation step of translation

Given the different effects that eEF2 has on eIF5A^{Q22H/L93F} and eIF5A^{K56A} ribosome binding affinity, we wanted to test if this difference correlates with any effect of eEF2 overexpression on the phenotypic defects of both eIF5A mutants, specially those related to translation.

Figure 5A shows the overexpression of eEF2 in the mutants eIF5A^{Q22H/L93F} and eIF5A^{K56A} at the permissive temperature (25 °C). As already described for eIF5A^{K56A} (38), the effect of eEF2 on growth phenotype at 25 °C is almost imperceptible (Fig. 5A, left panels). However, overexpression of eEF2 in the mutant eIF5A^{Q22H/L93F} decreases the rates of growth at the permissive temperature (Fig. 5A, left panels). Additionally, the sensitivity to sordarin (200 ng/mL), an antifungal that impairs both subunit

disassembling and eEF2 activity, is only observed for the mutant eIF5A^{Q22H/L93F} in the condition of eEF2 overexpression (Fig. 5A, right panels).

Figure 5. Analysis of the effect of eEF2 overexpression on the phenotypic defects of the mutants eIF5A^{K56A} and eIF5A^{Q22H/L93F}. **A.** Ten-fold serial dilutions of wt, eIF5A^{Q22H/L93F} or eIF5A^{K56A}, containing empty vector or high-copy eEF2, were grown in SC-ura at 25°C in the presence or not of sordarin (200 ng/mL). **B.** Total protein synthesis was measured in the same cells by the incorporation of [³H]leucine, relative to the wt strain. **C and D.** Polysome profile analysis of the same cells was carried out and the quantification of polysome and monosome areas (P/M) were performed to show the levels of translation. **E.** Polysome profile fractions of eIF5A^{Q22H/L93F} and eIF5A^{K56A} in the presence of high-copy eEF2 were analyzed by western blot to detect the presence of eIF5A, eEF2 and Rpl5.

To evaluate whether the defect in cellular growth of eIF5A^{Q22H/L93F} caused by high-copy eEF2 under permissive conditions is due to a defect in translation, we evaluated in wt eIF5A and eIF5A^{Q22H/L93F} or eIF5A^{K56A} mutants the rate of total protein synthesis by incorporation of [³H]Leucine. Interestingly, eEF2 overexpression impairs protein synthesis by 30% only in the mutant eIF5A^{Q22H/L93F} (Fig. 5B). The improvement in protein synthesis for the wt and the mutant eIF5A^{K56A} is in agreement with our previously published data (38).

Polysome profile analysis of the same cells was carried out to investigate whether the decreased protein synthesis in eIF5A^{Q22H/L93F} mutant is caused by defects in translation elongation. The polysome profile of eIF5A-wt, eIF5A^{Q22H/L93F} and eIF5A^{K56A}, in the presence or absence of high-copy eEF2, are shown in Fig. 5C. The peaks corresponding to the 40S, 60S, 80S and polysomes are indicated in the first profile. The graph in Fig. 5D shows the ratio P/M (polysome/monosome ratio) obtained by the quantification of polysome (P) and monosome (M) peak areas, relatively to the wt. No considerable differences can be seen in the polysome profiles in the absence of eEF2 high-copy (Fig. 5C and 5D). However, in the presence of eEF2 a slight increase in the 80S and a decrease in the polysome for both wt

($P/M^{+eEF2}=0.8$) and eIF5A^{K56A} mutant ($P/M^{+eEF2}=0.7$) are observed. In a very distinct way, the mutant eIF5A^{Q22H/L93F} displays both significant decreased 80S and increased polysomes in the presence of high-copy eEF2 ($P/M=1.8$, 2-fold increased P/M). This result clearly suggests that eEF2 overexpression leads to impairment of the translation elongation process in the mutant eIF5A^{Q22H/L93F} (Fig. 5C and 5D).

Finally, eleven fractions from polysome profiles of the mutants eIF5A^{Q22H/L93F} and eIF5A^{K56A} under overexpression of eEF2 were analyzed by western blot and the proteins eEF2, Rpl5 and eIF5A were probed (Fig. 5E). This analysis revealed that eIF5A^{K56A} is present only in the beginning of the profile, similarly to eIF5A-wt (data not shown). The mutant eIF5A^{Q22H/L93F} exhibited again a highly distinct scenario with significantly imprisoned eIF5A in the polysomes even in the presence of eEF2. This result is in agreement with the fact that eEF2 does not exert any effect on the ribosome binding affinity of the mutant eIF5A^{Q22H/L93F} (Fig. 4B).

Taken together, these results demonstrate that eEF2 overexpression is only toxic to the mutant eIF5A^{Q22H/L93F} due to the incapacity of eEF2 to displace this mutated form of eIF5A from the ribosome, leading to stalled translation machinery by the impairment of the dynamic interplay of these two translation factors.

DISCUSSION

Translation elongation is a crucial step of protein synthesis and little is known about its dynamics in eukaryotes. Although elongation is often not the rate-limiting step of translation, it is the most energy consuming process, consuming 2 molecules of GTP and ATP to proceed through each cycle of elongation.

Herein, we addressed the question of how eIF5A and eEF2 functionally interacts to guarantee the functioning of translation elongation. The interaction between eIF5A and eEF2 was initially suggested when they were co-purified *in vivo* by GST-eIF5A pulldown (37). Later on, a functional relation was described for both factors raising the hypothesis of a positive cooperative effect in the elongation step of translation as high-copy eEF2 suppressed the translation defects of the conditional mutant eIF5A^{K56A} (38). Guided by that evidence, we investigated the functional interaction between these two translation factors. A two-hybrid method was used to test for a physical interaction between eIF5A and eEF2, but revealed no direct interaction. The absence of direct physical interaction was expected since the binding sites for eIF5A and eEF2 are structurally distant into the ribosome (reviewed in (43) and (17)).

Since eIF5A interacts with ribosomes engaged in translation (37,39), we next investigated in which type of ribosomes occurs the interaction with eEF2. Curiously, it was observed that the physical interaction of eIF5A and eEF2 is dependent on polysomes, suggesting that eIF5A and eEF2 do not occupy the same ribosome at the same time (17,44). Therefore, we used a non-equilibrium pull-down assay to investigate whether the presence of eEF2 affects the binding of eIF5A to 80S. The addition of eEF2 to pre-assembled 80S complexes containing endogenous eIF5A results in displacement of this factor from the ribosome. In addition, adding recombinant eIF5A-Hyp, but not the non-hypusine containing eIF5A (eIF5A-Lys), displaces also eEF2 from these complexes. These results are consistent with a negative cooperative effect of eEF2 on eIF5A-ribosome interaction, contrary to what has been reported before (27).

To resolve this apparent controversy, we conducted fluorescence anisotropy assays using labeled-eIF5A and different ribosomal complexes to determine the equilibrium binding constants for each

complex. It was shown for the first time that the direct interaction of eIF5A to 60S ribosomal subunit occurs without any scaffolding protein and with high affinity ($K_i=16$ nM). This interaction is hypusine-dependent, as the non-hypusinated protein displays an equilibrium-binding constant 24-fold higher ($K_i=385$ nM). The positively charged hypusine residue promotes an extension of the highly conserved loop that may reach further into the PTC, allowing a close binding to the peptidyl-tRNA 3'-CAA (17). The biological essentiality of hypusine can be explained by providing much more points of contact and, therefore, stabilizing the protein in a proper position into the ribosome. Consequently, the essential hypusine confers higher activity for eIF5A in translation.

Surprisingly, the eIF5A binding affinity to the reconstituted 80S ribosome (40S+60S) was quite similar (12 nM). The major and transient intersubunit bridges formed between 40S and 60S upon subunit joining and the conformational changes generated overall did not interfere with the eIF5A affinity to the ribosome, even showing higher values of anisotropy change ($r_{bound}=0.314$). By using a more physiologically relevant pre-assembled 80S complex (80S), it was possible to detect an increase by at least 3-fold in the binding affinity of eIF5A for the ribosome. Importantly, both the 40S+60S+tRNA and pre-assembled 80S complexes likely contain an enriched amount of PRE-state ribosomes containing tRNA in the P-site (45), due to the favorite stability of the tRNAs (reviewed in (46)). This observation strongly suggests that charged-tRNA_i^{Met} in the P-site strengthens the affinity of eIF5A to the ribosome by increasing the points of contact through the interaction eIF5A-Hyp-charged-tRNA_i^{Met}.

The interaction of human eIF5A with yeast pre-assembled 80S was very similar to the human reconstituted 80S ($K_i \leq 5$ nM), suggesting that the complementation of yeast eIF5A by the human homolog (6) is due to its high affinity to the ribosome. However, the opposite is not true, as the interaction of yeast eIF5A with human ribosomes was also tested by anisotropy change and revealed much lower affinity (>2000 nM; data not shown). Curiously, it was recently described that the configuration and the interactions of tRNA and ribosome in the P/P and E/E states through the cycles of elongation are significantly divergent between bacteria and mammalian ribosomes (reviewed in (45)), which leads to specific events during translation elongation in these organisms. Therefore, some of these differences

could modify the interaction between eIF5A and tRNA/ribosome in different organisms and explain the fact that yeast eIF5A does not bind very well to human ribosome.

After determining in the human system the binding affinities of eIF5A to different ribosomal complexes, it was then determined the affinity of yeast eIF5A protein in the yeast 80S complex. As expected, the binding affinity of wild-type yeast eIF5A to the yeast 80S was similar to that determined for human ($K_i=9$ nM). Again, the high affinity of eIF5A to the 80S, confirmed also in the yeast system, underscores an important evolutionarily conserved direct interaction between eIF5A and the ribosome.

Yeast conditional mutants of eIF5A are well known for their defect in cellular growth and translation efficiency under restrictive conditions (3,9,38). In the case of both eIF5A^{Q22H/L93F} and eIF5A^{K56A} mutants, the protein is not depleted when grown at the restrictive temperature, which is in contrast to most other eIF5A mutants (3). This finding allows us to investigate the loss-of-function even in the presence of the protein. We described for the first time defects for these mutants even under the permissive temperature. Equilibrium binding under the titration of hypusine-containing eIF5A^{Q22H/L93F} and eIF5A^{K56A} revealed a dramatic decrease in the ribosome binding affinity of more than 20-fold when compared to the wt protein. We directly investigated the influence of eEF2 on eIF5A ribosome binding by measuring the anisotropy change of the eIF5A-80S complex in the presence of saturating eEF2. In agreement with the ability of eEF2 to weaken the eIF5A-ribosome binding affinity in non-equilibrium assays, we determined that eEF2 binding to the ribosome promoted a 4-fold reduction in the affinity of eIF5A to the 80S ribosomal complex.

It will be important in future to understand the biological significance of the negative cooperativity between eIF5A and eEF2. It is likely that the dynamic interplay of these essential factors functions to enhance the rate of translation elongation. Assuming the physiological concentration of eIF5A and eEF2 in eukaryotic cells are much higher than the observed affinities (47), the individual factors are likely in saturating amounts, thereby not affecting the final concentration of the active ribosomal complex *per se*. Instead, the changes in affinity may signify important conformational changes on the ribosome to promote stages of elongation, in particular on polyproline stretches. Likely changes in

the lifetime of the individual factors on the ribosome may also be critical in regulating the generation of the intermediate complexes. It is worth noting that while the affinity of eIF5A and eEF2 to the pre-assembled 80S is very similar (48) the abundance of both active factors are very different. Considering that the expression of eIF5A is almost 3 times higher than eEF2 (47), and that all eIF5A is modified (active) in normal cells, it is possible that the occurrence of the eIF5A-80S complex may be higher than eEF2-80S, even eEF2 being clearly required in every cycle of translation elongation. Although this work suggests that the presence of eEF2 weakens the eIF5A-ribosome interaction, further work is still needed to address the kinetics between eIF5A and eEF2 and thus understanding the sequential reactions along the translation elongation process.

The proposed model for the dynamic interplay between eIF5A and eEF2 is reasonable considering wt proteins and complexes. However, to validate this model, it was also tested whether the anticooperative effect of eEF2 on eIF5A ribosome interaction would occur with the loss-of-function mutants of eIF5A. Similarly, the wt eIF5A and the mutant eIF5A^{K56A} showed a 3-4-fold decrease in the affinity to 80S in the presence of eEF2. Surprisingly, the eIF5A^{Q22H/L93F} binding affinity was not affected by the addition of eEF2. These results not only strengthen the model but also strongly suggest that the interplay between these factors requires a certain level of binding affinity to ribosome, which is not observed for the eIF5A^{Q22H/L93F} protein.

In order to further validate the model, it was analyzed the *in vivo* effect of overexpression of eEF2 in both eIF5A mutants. As expected, the overexpression of eEF2 does not affect cellular growth and stimulates total protein synthesis and running-off of the polysomes (P/M rates) in wt and eIF5A^{K56A} mutant. Contrarily, eEF2 overexpression causes slow growth phenotype, sensitivity to sordarin, decrease in protein synthesis and accumulation of polysomes in the eIF5A^{Q22H/L93F} mutant. The diverse responses for this mutant in the presence of high-copy eEF2 correlates very well with the biochemical difference in terms of the negative cooperative effect of eEF2 on eIF5A ribosome interaction. The imprisoning of eEF2 in the ribosome caused by sordarin, that also inhibits its tRNA translocation activity, is even more toxic for the eIF5A^{Q22H/L93F} mutant in the presence of high-copy eEF2 than in the absence of sordarin.

Interestingly, it was not seen any sensitivity of eIF5A^{Q22H/L93F} in the presence of high-copy eEF2 against other drugs that impair protein synthesis, *e.g.* hygromycin, anisomycin, paromomycin and puromycin (data not shown). It strongly suggests that the impairment of protein synthesis and cell surveillance is not due to a general problem in translation but a disturbance on the dynamic between eIF5A and eEF2 and its negative effect on eIF5A ribosome interaction.

As the last attempt to validate the model, we investigated the migration of these factors using sucrose gradients to identify any defects in eIF5A and eEF2 binding capacity to the polysomes *in vivo*. As expected, the mutant eIF5A^{Q22H/L93F} was the only eIF5A protein detected in the late polysomes, when compared to the wt and eIF5A^{K56A} mutant. The lowest binding affinity of eIF5A^{Q22H/L93F} is not in agreement with imprisoned mutated eIF5A in the polysomes. This apparent conflicting data could be explained by the kinetics of the protein k_{off}/k_{on} that considers not only the free energy difference ($\Delta G^0 = K_d$) between initial and final state, but also the free energy difference $\Delta G^1 (k_{off})$ and $\Delta G^2 (k_{on})$ between initial/final state and transition states. The stay-bound state of eIF5A^{Q22H/L93F} disturbs the effect of eEF2 on the stimulation of eIF5A exit when it binds to the ribosome, resulting in lack of the proper dynamic interplay of both factors. This interplay must be an essential key for the elongation rates of translation, and helps to explain why eEF2 is toxic for the mutant eIF5A^{Q22H/L93F} and suppresses the growth and translation defects of the mutant eIF5A^{K56A} (27). Kinetic studies are still required to explain the fine-tuning of the anticooperative effect of eEF2 on eIF5A ribosome interaction and help to determine the limiting rates for translation elongation.

Taken together, this work suggests that eEF2 bound to the ribosome reduces eIF5A ribosome binding affinity, prior to the translocation event. During translocation, eEF2 and the tRNAs could also display some negative effect on the eIF5A ribosome interaction. Moreover, the proper interplay between eEF2 and eIF5A requires normal or quasi-normal levels of eIF5A ribosome binding affinity. The lack of this relation impacts the elongation rates and leads to the accumulation of queuing polysomes and consequently compromising cell survival.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants to S.R.V. from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and PADC from Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP. We also thank FAPESP for fellowships awarded to the authors (D. R.; N. M. B.; P. E. B.; F. C. G).

REFERENCES

1. Kemper, W. M., Berry, K. W., and Merrick, W. C. (1976) Purification and properties of rabbit reticulocyte protein synthesis initiation factors M2B α and M2B β . *J Biol Chem* **251**, 5551-5557
2. Benne, R., and Hershey, J. W. (1978) The mechanism of action of protein synthesis initiation factors from rabbit reticulocytes. *J Biol Chem* **253**, 3078-3087
3. 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., and Valentini, S. R. (2008) 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
4. Park, M. H., Joe, Y. A., and Kang, K. R. (1998) Deoxyhypusine synthase activity is essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **273**, 1677-1683
5. Park, M. H., Wolff, E. C., and Folk, J. E. (1993) Hypusine: its post-translational formation in eukaryotic initiation factor 5A and its potential role in cellular regulation. *Biofactors* **4**, 95-104
6. Schnier, J., Schwelberger, H. G., Smit-McBride, Z., Kang, H. A., and Hershey, J. W. (1991) Translation initiation factor 5A and its hypusine modification are essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **11**, 3105-3114

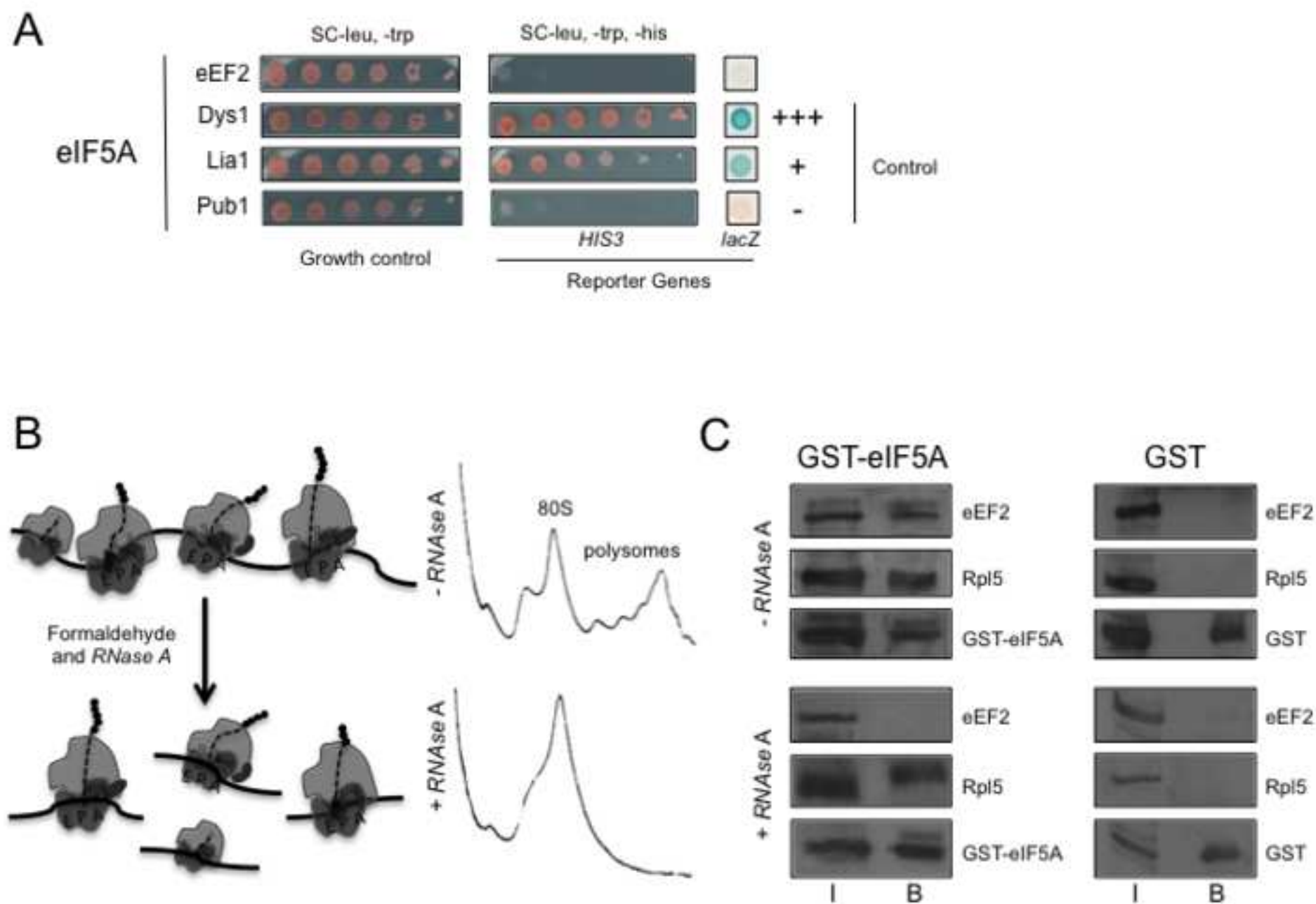
7. Park, M. H., Liberato, D. J., Yergey, A. L., and Folk, J. E. (1984) The biosynthesis of hypusine (N epsilon-(4-amino-2-hydroxybutyl)lysine). Alignment of the butylamine segment and source of the secondary amino nitrogen. *J Biol Chem* **259**, 12123-12127
8. Thompson, G. M., Cano, V. S. P., and Valentini, S. R. (2003) Mapping eIF5A binding sites for Dys1 and Lia1: in vivo evidence for regulation of eIF5A hypusination. *Febs Letters* **555**, 464-468
9. Gregio, A. P., Cano, V. P., Avaca, J. S., Valentini, S. R., and Zanelli, C. F. (2009) eIF5A has a function in the elongation step of translation in yeast. *Biochem Biophys Res Commun* **380**, 785-790
10. Saini, P., Eyler, D. E., Green, R., and Dever, T. E. (2009) Hypusine-containing protein eIF5A promotes translation elongation. *Nature* **459**, 118-121
11. Rossi, D., Kuroshu, R., Zanelli, C. F., and Valentini, S. R. (2014) eIF5A and EF-P: two unique translation factors are now traveling the same road. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **5**, 209-222
12. Bailly, M., and de Crécy-Lagard, V. (2010) Predicting the pathway involved in post-translational modification of elongation factor P in a subset of bacterial species. *Biol Direct* **5**, 3
13. Navarre, W. W., Zou, S. B., Roy, H., Xie, J. L., Savchenko, A., Singer, A., Edvokimova, E., Prost, L. R., Kumar, R., Ibba, M., and Fang, F. C. (2010) PoxA, yjeK, and elongation factor P coordinately modulate virulence and drug resistance in *Salmonella enterica*. *Mol Cell* **39**, 209-221
14. Peil, L., Starosta, A. L., Virumäe, K., Atkinson, G. C., Tenson, T., Remme, J., and Wilson, D. N. (2012) Lys34 of translation elongation factor EF-P is hydroxylated by YfcM. *Nat Chem Biol* **8**, 695-697
15. Lassak, J., Keilhauer, E. C., Fürst, M., Wuichet, K., Gödeke, J., Starosta, A. L., Chen, J. M., Søgaaard-Andersen, L., Rohr, J., Wilson, D. N., Häussler, S., Mann, M., and Jung, K. (2015) Arginine-rhamnosylation as new strategy to activate translation elongation factor P. *Nat Chem Biol* **11**, 266-270
16. Blaha, G., Stanley, R. E., and Steitz, T. A. (2009) Formation of the first peptide bond: the structure of EF-P bound to the 70S ribosome. *Science* **325**, 966-970

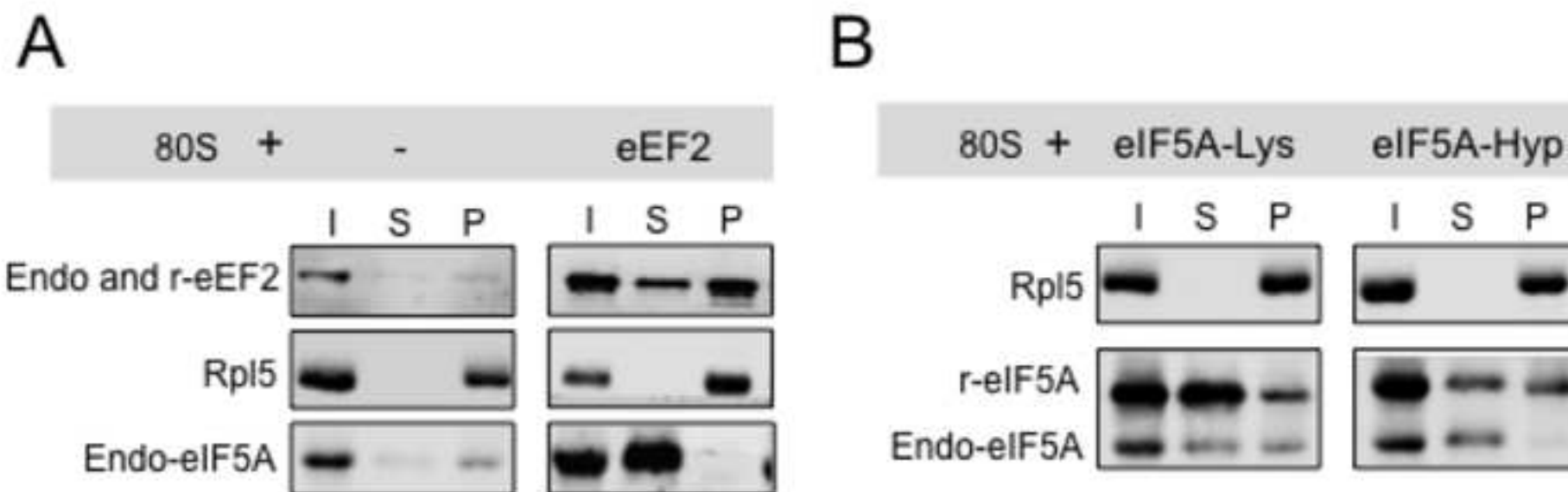
17. Gutierrez, E., Shin, B. S., Woolstenhulme, C. J., Kim, J. R., Saini, P., Buskirk, A. R., and Dever, T. E. (2013) eIF5A Promotes Translation of Polyproline Motifs. *Mol Cell*
18. Dever, T. E., Gutierrez, E., and Shin, B. S. (2014) The hypusine-containing translation factor eIF5A. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **49**, 413-425
19. Henderson, A., and Hershey, J. W. (2011) Eukaryotic translation initiation factor (eIF) 5A stimulates protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 6415-6419
20. Doerfel, L. K., Wohlgemuth, I., Kothe, C., Peske, F., Urlaub, H., and Rodnina, M. V. (2013) EF-P is essential for rapid synthesis of proteins containing consecutive proline residues. *Science* **339**, 85-88
21. Ude, S., Lassak, J., Starosta, A. L., Kraxenberger, T., Wilson, D. N., and Jung, K. (2013) Translation elongation factor EF-P alleviates ribosome stalling at polyproline stretches. *Science* **339**, 82-85
22. Ude, S., Lassak, J., Starosta, A. L., Kraxenberger, T., Wilson, D. N., and Jung, K. (2013) Translation elongation factor EF-P alleviates ribosome stalling at polyproline stretches. in *Science*, United States. pp 82-85
23. Doerfel, L. K., Wohlgemuth, I., Kothe, C., Peske, F., Urlaub, H., and Rodnina, M. V. (2013) EF-P is essential for rapid synthesis of proteins containing consecutive proline residues. in *Science*, United States. pp 85-88
24. Hersch, S. J., Wang, M., Zou, S. B., Moon, K. M., Foster, L. J., Ibba, M., and Navarre, W. W. (2013) Divergent protein motifs direct elongation factor P-mediated translational regulation in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*. *MBio* **4**, e00180-00113
25. Woolstenhulme, C. J., Parajuli, S., Healey, D. W., Valverde, D. P., Petersen, E. N., Starosta, A. L., Guydosh, N. R., Johnson, W. E., Wilson, D. N., and Buskirk, A. R. (2013) Nascent peptides that block protein synthesis in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, E878-887

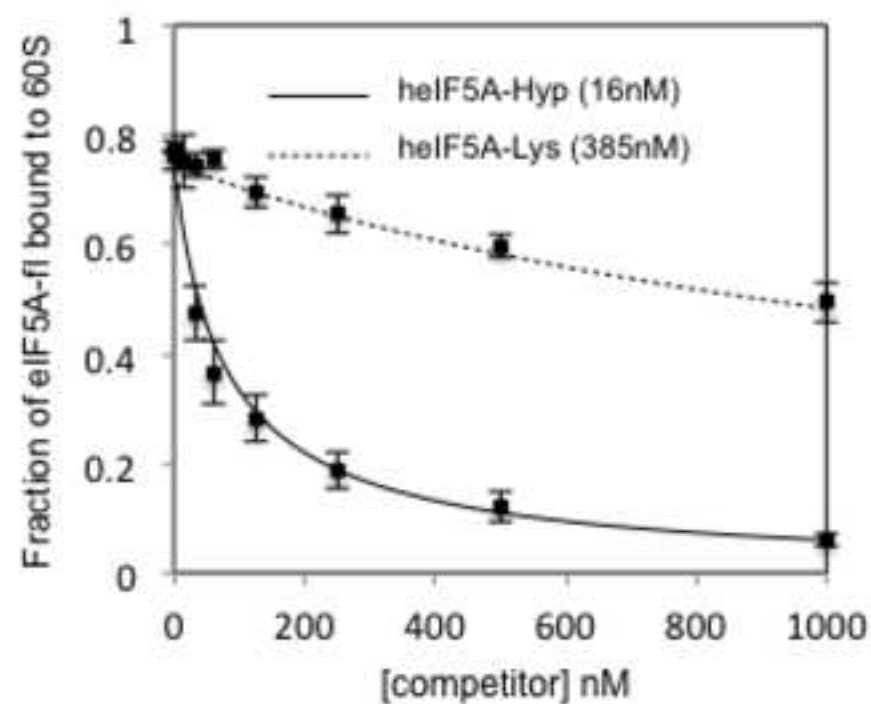
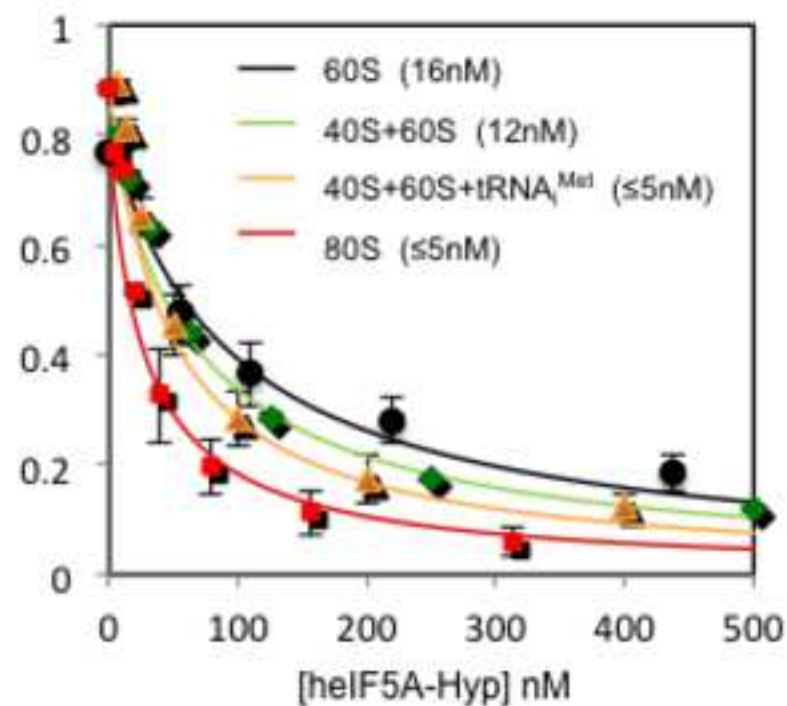
26. Woolstenhulme, C. J., Guydosh, N. R., Green, R., and Buskirk, A. R. (2015) High-Precision Analysis of Translational Pausing by Ribosome Profiling in Bacteria Lacking EFP. *Cell Rep* **11**, 13-21
27. Dias, C. A. O., Borges Gregio, A. P., Rossi, D., Galvao, F. C., Watanabe, T. F., Park, M. H., Valentini, S. R., and Zanelli, C. F. (2012) eIF5A interacts functionally with eEF2. *Amino Acids* **42**
28. Park, J. H., Dias, C. A., Lee, S. B., Valentini, S. R., Sokabe, M., Fraser, C. S., and Park, M. H. (2011) Production of active recombinant eIF5A: reconstitution in E.coli of eukaryotic hypusine modification of eIF5A by its coexpression with modifying enzymes. *Protein Eng Des Sel* **24**, 301-309
29. Fraser, C. S., Berry, K. E., Hershey, J. W., and Doudna, J. A. (2007) eIF3j is located in the decoding center of the human 40S ribosomal subunit. *Mol Cell* **26**, 811-819
30. Ben-Shem, A., Jenner, L., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2010) Crystal structure of the eukaryotic ribosome. *Science* **330**, 1203-1209
31. Jørgensen, R., Carr-Schmid, A., Ortiz, P. A., Kinzy, T. G., and Andersen, G. R. (2002) Purification and crystallization of the yeast elongation factor eEF2. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**, 712-715
32. Sokabe, M., and Fraser, C. S. (2014) Human eukaryotic initiation factor 2 (eIF2)-GTP-Met-tRNAi ternary complex and eIF3 stabilize the 43 S preinitiation complex. *J Biol Chem* **289**, 31827-31836
33. Shin, B. S., Maag, D., Roll-Mecak, A., Arefin, M. S., Burley, S. K., Lorsch, J. R., and Dever, T. E. (2002) Uncoupling of initiation factor eIF5B/IF2 GTPase and translational activities by mutations that lower ribosome affinity. *Cell* **111**, 1015-1025
34. Moreno, J. M., Kildsgaard, J., Siwanowicz, I., Mortensen, K. K., and Sperling-Petersen, H. U. (1998) Binding of Escherichia coli initiation factor IF2 to 30S ribosomal subunits: a functional role for the N-terminus of the factor. *Biochem Biophys Res Commun* **252**, 465-471

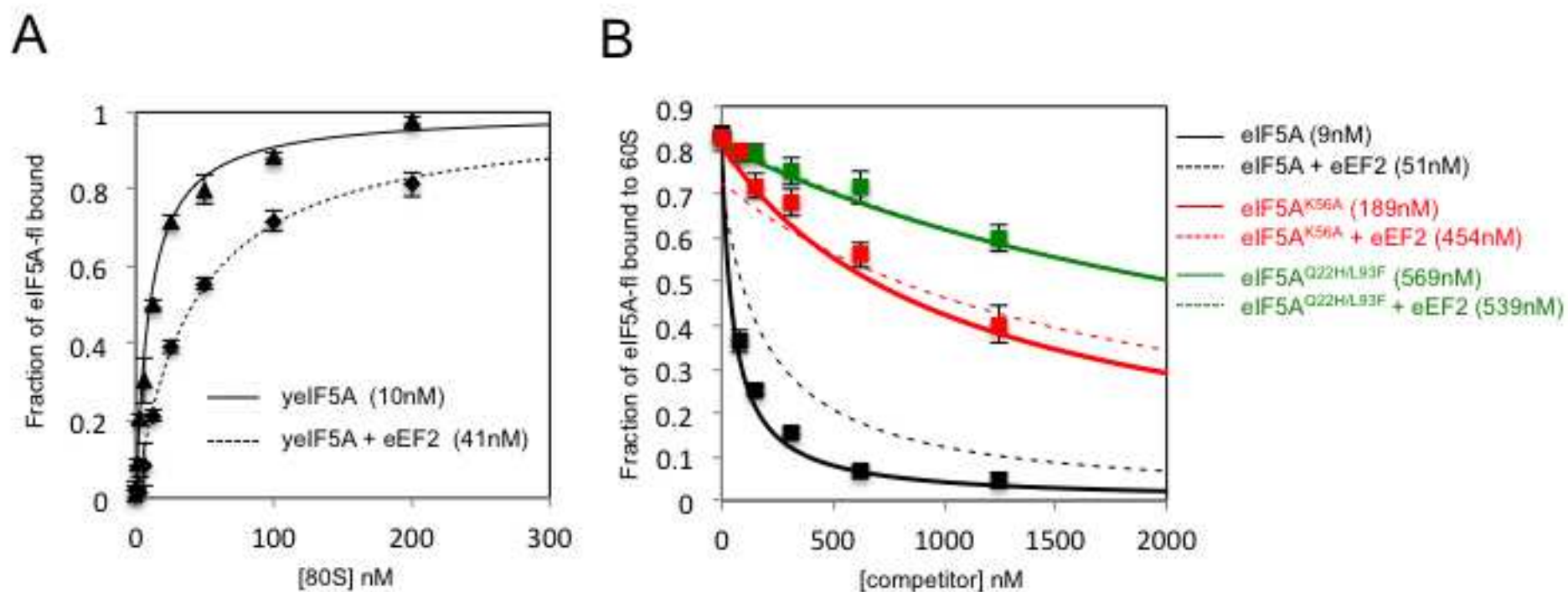
35. Thompson, G. M., Cano, V. S., and Valentini, S. R. (2003) Mapping eIF5A binding sites for Dys1 and Lia1: in vivo evidence for regulation of eIF5A hypusination. *FEBS Lett* **555**, 464-468
36. Vojtek, A. B., and Hollenberg, S. M. (1995) Ras-Raf interaction: two-hybrid analysis. *Methods Enzymol* **255**, 331-342
37. Zanelli, C. F., Maragno, A. L., Gregio, A. P., Komili, S., Pandolfi, J. R., Mestriner, C. A., Lustri, W. R., and Valentini, S. R. (2006) eIF5A binds to translational machinery components and affects translation in yeast. *Biochem Biophys Res Commun* **348**, 1358-1366
38. Dias, C. A. O., Borges Gregio, A. P., Rossi, D., Galvao, F. C., Watanabe, T. F., Park, M. H., Valentini, S. R., and Zanelli, C. F. (2012) eIF5A interacts functionally with eEF2. *Amino Acids* **42**, 697-702
39. Galvão, F. C., Rossi, D., Silveira, W. a. S., Valentini, S. R., and Zanelli, C. F. (2013) The Deoxyhypusine Synthase Mutant dys1-1 Reveals the Association of eIF5A and Asc1 with Cell Wall Integrity. *PLoS One* **8**, e60140
40. Sutherland, B. W., Toews, J., and Kast, J. (2008) Utility of formaldehyde cross-linking and mass spectrometry in the study of protein-protein interactions. *J Mass Spectrom* **43**, 699-715
41. Hershey, J. W., Smit-McBride, Z., and Schnier, J. (1990) The role of mammalian initiation factor eIF-4D and its hypusine modification in translation. *Biochim Biophys Acta* **1050**, 160-162
42. Acker, M. G., Kolitz, S. E., Mitchell, S. F., Nanda, J. S., and Lorsch, J. R. (2007) Reconstitution of yeast translation initiation. *Methods Enzymol* **430**, 111-145
43. Kaul, G., Pattan, G., and Rafeequi, T. (2011) Eukaryotic elongation factor-2 (eEF2): its regulation and peptide chain elongation. *Cell Biochem Funct* **29**, 227-234
44. Spahn, C. M., Gomez-Lorenzo, M. G., Grassucci, R. A., Jørgensen, R., Andersen, G. R., Beckmann, R., Penczek, P. A., Ballesta, J. P., and Frank, J. (2004) Domain movements of elongation factor eEF2 and the eukaryotic 80S ribosome facilitate tRNA translocation. *EMBO J* **23**, 1008-1019

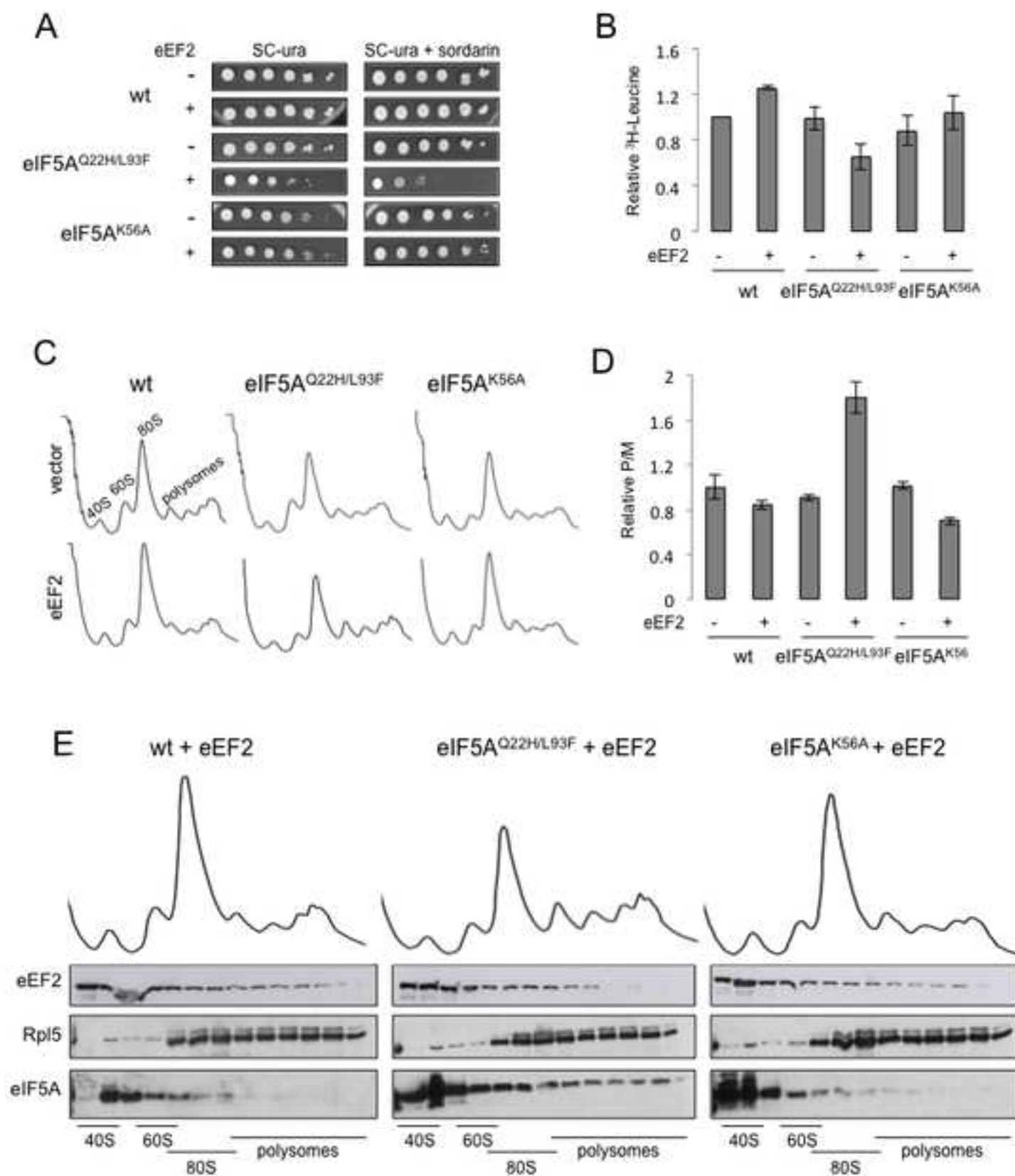
45. Graifer, D., and Karpova, G. (2015) Interaction of tRNA with Eukaryotic Ribosome. *Int J Mol Sci* **16**, 7173-7194
46. Graifer, D., and Karpova, G. (2013) General approach for introduction of various chemical labels in specific RNA locations based on insertion of amino linkers. *Molecules* **18**, 14455-14469
47. Firczuk, H., Kannambath, S., Pahle, J., Claydon, A., Beynon, R., Duncan, J., Westerhoff, H., Mendes, P., and McCarthy, J. E. (2013) An in vivo control map for the eukaryotic mRNA translation machinery. *Mol Syst Biol* **9**, 635
48. Sulima, S. O., Gülay, S. P., Anjos, M., Patchett, S., Meskauskas, A., Johnson, A. W., and Dinman, J. D. (2014) Eukaryotic rpL10 drives ribosomal rotation. *Nucleic Acids Res* **42**, 2049-2063





A**B**





ANEXO 2

[Click here to view linked References](#)

**Mapping surface residues of eIF5A that are important for binding to the ribosome
using alanine scanning mutagenesis**

Natália M. Barbosa¹; Paulo E. G. Boldrin¹; Danuza Rossi¹; Priscila A. Yamamoto¹; Tatiana F. Watanabe¹; Vitor
H. Serrão²; John W. B. Hershey³; Christopher S. Fraser³; Sandro R. Valentini¹; Cleslei F. Zanelli¹

¹ Department of Biological Sciences, School of Pharmaceutical Sciences, UNESP - Univ. Estadual Paulista,
Araraquara, SP, Brazil, 14800-903

²Physics and Interdisciplinary Science Department, Physics Institute of Sao Carlos, University of Sao Paulo-USP,
Sao Carlos, SP, Brazil, 13563-120

³ Molecular and Cellular Biology Department, University of California, Davis, CA, USA, 95616

To whom correspondence should be addressed: Cleslei F. Zanelli, Department of Biological Sciences, School of
Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University-UNESP, Rod Araraquara-Jaú Km01, Araraquara, SP, Brazil,
Tel.: (+55) 16 3301-6996; Fax: (+55) 16 33016938; Email: cleslei@fcar.unesp.br

ABSTRACT

The translation elongation factor eIF5A is conserved through evolution and is necessary to rescue the ribosome during translation elongation of polyproline-containing proteins. Although the site of eIF5A binding to the ribosome is known, no systematic analysis has been performed so far to determine the important residues on the surface of eIF5A required for ribosome binding. In this study, we used clustered charged-to-alanine mutagenesis and structural modeling to address this question. We generated four new mutants of yeast eIF5A: *tif51A-4*, *tif51A-6*, *tif51A-7* and *tif51A-11*, and complementation analysis revealed that *tif51A-4* and *tif51A-7* could not sustain cell growth in a strain lacking wild-type eIF5A. Moreover, the allele *tif51A-4* also displayed negative dominance over wild-type eIF5A. Both *in vivo* GST-pull-downs and *in vitro* fluorescence anisotropy demonstrated that eIF5A from mutant *tif51A-7* exhibited an importantly reduced affinity for the ribosome, implicating the charged residues in cluster 7 as determinant features on the eIF5A surface for contacting the ribosome. Notably, modified eIF5A from mutant *tif51A-4*, despite exhibiting the most severe growth phenotype, did not abolish ribosome interactions as with mutant *tif51A-7*. Taking into account the modeling eIF5A+80S+P-tRNA complex, our data suggest that interactions of eIF5A with ribosomal protein L1 are more important to stabilize the interaction with the ribosome as a whole than the contacts with P-tRNA. Finally, the ability of eIF5A from *tif51A-4* to bind to the ribosome while potentially blocking physical interaction with P-tRNA could explain its dominant negative phenotype.

KEYWORDS: translation elongation, hypusine, eIF5A, ribosome binding

ABBREVIATIONS: eIF5A, Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A; *TIF51A*, gene encoding eIF5A in yeast; EF-P, Elongation Factor P.

INTRODUCTION

The main aspects of protein synthesis are highly conserved throughout evolution, and many steps and factors involved in translation are very similar across all kingdoms of life. Concerning the translation factors, the elongation step of translation is most conserved (RODNINA and WINTERMEYER 2009 ; DEVER and GREEN 2012), and the homologous factors bacterial EF-P and archaeal/eukaryotic eIF5A are examples of such conservation (ROSSI et al. 2014).

The former eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) is an essential translation factor that was originally purified from ribosomal salt wash of rabbit reticulocytes and initially classified as an initiation factor because of its ability to stimulate methionyl-puromycin synthesis . Notably, elongation factor P (EF-P) is not essential in some bacteria, such as *Escherichia coli*, but was also initially identified as a stimulatory factor for methionyl-puromycin synthesis in an *in vitro* reconstituted translation assay . Although both eIF5A and EF-P have been previously related to different aspects of protein synthesis and other cellular functions, both have been demonstrated to be necessary to rescue the ribosome during the translation elongation of polyproline-containing proteins .

eIF5A is an approximately 15-17 kDa protein (depending on the species) composed of two predominantly β -barrel domains. The N-terminal domain is an SH3-like domain, predominantly positively charged and more conserved than the rest of the protein. The C-terminal domain consists of an OB fold found in nucleic acid-binding proteins and is much more negatively charged . Notably, EF-P contains three domains, instead of two, which gives it a molecular mass of approximately 21 kDa. Domains I and II of EF-P contain the same folds as the N-terminal and C-terminal domains of eIF5A, and domain III of EF-P appears to be a duplication of domain II.

An interesting structural aspect of both eIF5A and EF-P is their unique posttranslational modifications they undergo that are necessary for their functions during the elongation of polyproline proteins. These modifications occur on a specific lysine (in all eIF5A and in EF-P of some species) or arginine (in EF-P of other species) that reside at the tip of the N-terminal long loop (LASSAK et al. 2015b). The site of the modification in eIF5A, called hypusination, is shown in Fig 1.

In eIF5A, this essential modification comprises the conversion of a lysine to a hypusine and is essential for all archaea and eukaryotes tested so far. Hypusine formation occurs in two steps: first, the enzyme deoxyhypusine synthase (Dys1 in *S. cerevisiae*) transfers a 4-aminobutyl moiety from the polyamine spermidine to the ϵ -amino group of the specific lysine side chain to form deoxyhypusine; then, the second carbon of the deoxyhypusine residue is hydroxylated by deoxyhypusine hydroxylase (Lia1 in *S. cerevisiae*).

Although all archaea and eukaryotes undergo hypusination of eIF5A, modifications on EF-P vary depending on the species. Co-occurrence of EF-P containing lysine or arginine and the corresponding modification pathways (described below) are present only in approximately 35% of the known bacterial genomes,

1
2
3
4 suggesting that either modification of EF-P in other species is not necessary, or there are other types of EF-P
5 modifications yet to be discovered (LASSAK et al. 2015b). So far, two different posttranslational modifications
6 have been described for EF-P: β -lysinylation of EF-P containing a lysine at the tip of its N-terminal long loop, and
7 rhamnosylation of EF-P harboring an arginine at the same position. β -lysinylation of EF-P occurs in three steps:
8 first, the enzyme YjeK (EpmB) converts a free S- α -Lys to R- β -Lys; then, this R- β -Lys is transferred by YjeA
9 (EpmA/PoxA/GenX) to the ϵ -amino group of the specific lysine (K34 in *Escherichia coli* EF-P) in an ATP-
10 dependent manner; finally, YfcM (EpmC) hydroxylates the lysyl-lysine residue (ROSSI et al. 2014). The other
11 modification identified so far, the rhamnosylation of EF-P containing an arginine at the corresponding position,
12 consists of just one step: the attachment of one rhamnosyl moiety, from dTDP-rhamnose, to the specific arginine
13 (R32 in *Shewanella oneidensis* EF-P), mediated by the enzyme EarP (LASSAK et al. 2015a).
14
15

16 The crystal structure of unmodified *Thermus thermophilus* EF-P bound to the 70S ribosome and initiator
17 formyl-methionyl-tRNA_i has been determined, revealing a binding site between the P and E sites of the ribosome,
18 contacting ribosomal protein L1, rRNA close to the peptidyl transferase center (PTC) and the peptidyl site tRNA
19 (P-tRNA) (BLAHA et al. 2009). More recently, the structure of *Saccharomyces cerevisiae* modified eIF5A in
20 complex with the ribosome and P-tRNA was determined by cryo-electron microscopy (SCHMIDT et al. 2015). In
21 addition to this eukaryotic complex exhibiting similar aspects as the EF-P+ribosome+P-tRNA, the hypusine
22 directly interacts with the CCA-end of the P-tRNA. These data suggest that the essential role of hypusine in
23 eIF5A is to stabilize the correct positioning of the CCA-end of the P-tRNA to assist peptide bond formation by
24 the PTC.
25
26

27 Nonetheless, no systematic analysis has been performed so far to determine the important residues on the
28 surface of eIF5A that are required for the binding to ribosomal complexes. In this study, we used clustered
29 charged-to-alanine mutagenesis and modeling of the eIF5A+ribosome+P-tRNA complex to better understand the
30 structural requirements of eIF5A for ribosome binding.
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

MATERIALS AND METHODS

Generation of plasmids encoding eIF5A site-directed mutants from alanine scanning

To generate the new eIF5A mutants described herein, the plasmid pYGEX-*TIF51A* was used as the template for mutagenesis by the QuickChange Site-direct Mutagenesis Kit (Stratagene), according to the manufacturer's instructions. The complete open reading frame was sequenced to validate the intended mutations.

Molecular modeling and complex structural analysis

The eIF5A structure was previously obtained by crystallography and deposited on Protein Data Bank PDB 3ER0. This structure presents a monomer chain at 3.35-Å resolution but missing some N-terminal, C-terminal and hypusination loop residues. Because of these missing residues, molecular modeling was performed to obtain a complete model of eIF5A. The sequence GI: 215794766 was submitted to I-TASSER (YANG et al. 2015) using itself as a template (PDB ID 3ER0:A).

S. cerevisiae ribosome structure PDB 4V7R (BEN-SHEM et al. 2010) was used for eIF5A-ribosome complex analysis performed by structural alignment using Pymol, Version 1.3 (Schrodinger, LLC) based on crystallographic and cryo-EM structures of the ribosome in complex with tRNAs at the Peptidyl and Exit sites (abbreviated as P and E, respectively).

Initially, the cryo-EM structure from the *Plasmodium falciparum* 80S ribosome bound to P/E-tRNA, PDB 3JBO, (SUN et al. 2015) was used to coordinate references and align the 80S in complex with P-tRNA (PDB 3JBN).

Next, the structure of the 40S ribosome from *Thermus thermophilus* bound to EF-P, PDB 4V6A (BLAHA et al. 2009), was three-dimensionally aligned using the tRNA at the P-site as the coordinates reference.

Then, the 80S ribosome from yeast was aligned to the previously superposed structures to hide other structures and retain only EF-P and tRNA at the P-site (PDB 4V6A) for subsequent analyses.

Finally, the eIF5A model was aligned to the EF-P structure resulting in the 80S *S. cerevisiae* ribosome in complex with tRNA at the P-site and eIF5A. The analysis of cleavage sites was performed using a 25S RNA sequence (PDB 3O58) based on regions previously described (GUTIERREZ et al. 2013), and the human eIF5A crystallographic structure, PDB 3CPF (TONG et al. 2009), was aligned to eIF5A to corroborate the structure analyses.

Cell growth assay and complementation analyses in yeast

The eIF5A mutants were generated in pYGEX-*TIF51A* under the *GAL1* promoter (galactose inducible). The strain VZL1074 (*MATa ura3 leu2 his3 kanMX4-tetOpr-TIF51A ura3::CMV-tTA*), with endogenous eIF5A expression controlled by a tetracycline repressible promoter, was transformed with plasmids containing the new eIF5A mutants (pSV1373, pSV1476, pSV1479 and pSV1482) and used for the growth analyses. Briefly, liquid cultures

1
2
3
4 were grown in 5 mL of medium SC-ura containing raffinose to suppress the plasmid expression until the
5 exponential phase ($DO_{600nm} = 0.6 - 0.8$). A sample of the culture was centrifuged at $600 \times g$ for 7 min, and the
6 pellet was suspended in 50% glycerol to a final concentration of 2.5×10^8 cells/mL. Ten-fold serial dilutions were
7 plated onto media SC-ura containing tetracycline and glucose (in the absence of eIF5A) or galactose (expressing
8 heterologous eIF5A). The plates were incubated at 25 °C for 3-4 days.
9
10
11
12
13

14 **Detection of hypusine-containing eIF5A**

15
16 To analyze the presence of hypusine-containing eIF5A, cultures of the yeast strain VZL1074 transformed with
17 plasmids containing the new eIF5A mutants were grown overnight at 25 °C in 5 mL of SC-ura media with
18 raffinose, and then the cells were transferred into SC-ura media containing tetracycline and galactose to express
19 the eIF5A mutants. After 6 hours of induction, samples were lysed in protein lysis buffer A (50 mM Tris-HCl pH
20 7.5; 50 mM dithiothreitol; 5 mM EDTA; 5% SDS; 5% glycerol; 2x Protease Inhibitor Cocktail), and 15 µg of
21 whole cell extracts (WCE) were resolved by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. We
22 proceeded to perform immunoblot analysis using a rabbit polyclonal anti-eIF5A (yeast) antibody at a 1:15000
23 dilution (VALENTINI et al. 2002) and rabbit polyclonal anti-hypusine antibody (Millipore) at a 1:2000 dilution
24 (MANDAL et al. 2015) with an enhanced chemiluminescence detection system on a Li-Cor C-Digit Blot Scanner.
25
26
27
28
29
30
31
32

33 **Glutathione-S-transferase (GST) pull-down assay**

34 The yeast strains VZL1074 expressing GST (pSV20), GST-wild-type eIF5A (pSV36) or GST-eIF5A mutants
35 (pVZ1476, pVZ1479, pVZ1482) were grown in SC-ura + 2% galactose until $DO_{600nm} = 0.8$. Then, cells were
36 disrupted in lysis buffer B (20 mM Tris-HCl pH 7.5; KOAc 50 mM; $MgCl_2$ 10 mM; DTT 1 mM and 1 mM
37 Protease Inhibitor Cocktail) by agitation in Fast Prep equipment (three 25 second agitations) with glass beads. The
38 cells were clarified by centrifugation at $20000 \times g$ for 15 min at 4 °C, and the lysates subjected to GST-pull-down
39 as previously published (ZANELLI et al. 2006). Immunoblot analysis of WCE and bound fractions from GST-
40 eIF5A and GST was performed using the rabbit polyclonal antibodies anti-eIF5A (1:10000), which also
41 recognizes GST-eIF5A, anti-L5 (1:15000) and an enhanced chemiluminescence detection system.
42
43
44
45
46
47
48
49
50

51 **Expression and purification of eIF5A protein versions**

52 The yeast hypusine-containing eIF5A (eIF5A-Hyp) and non hypusine-containing eIF5A (eIF5A-Lys) were
53 expressed and purified according to a modified protocol (PARK et al. 2011). Briefly, 2 L of BL21(DE3)groES
54 (Takara Bio) cells containing a polycistronic vector co-expressing the yeast genes of the hypusination modifying
55 enzymes (*DYS1* and *LIA1*) and pET28a-eIF5A versions (which yields 6xHis-eIF5A) were harvested after 16 h of
56 induction at 18 °C. Cells were then lysed by sonication in ice-cold Buffer C (50 mM Tris-Cl pH 7.0; 0.1 mM
57
58
59
60
61
62
63
64
65

EDTA; 300 mM KCl; 1 mM DTT; 20 mM imidazole). The lysate was mixed with 5 mL of equilibrated NiNTA resin (Qiagen), and proteins were eluted in Buffer D (Buffer C containing 250 mM imidazole). The eluate was dialyzed against Buffer E (50 mM Tris-Cl pH 7.0; 0.1 mM EDTA; 1 mM DTT), and cationic chromatography in SP column was performed onto equilibrated 5 mL HiTrap-SP column (GE Healthcare) to separate eIF5A-Hyp and eIF5A-Lys (PARK et al. 2011). Proteins were eluted from the HiTrap-SP column in a gradient of 0-60% of Buffer F (50 mM Tris-Cl pH 7.0; 0.1 mM EDTA; 10% glycerol; 1 M KCl; 1 mM DTT), and the fractions containing eIF5A-Lys (pI lower and first peak) and eIF5A-Hyp (pI higher and second peak) were collected and analyzed by SDS-PAGE. Purified proteins were then concentrated using Amicon Ultra 3 kDa (Merck Millipore), immediately frozen in liquid nitrogen and maintained at -80 °C.

Yeast ribosomes were prepared based on previous protocols (FRASER *et al.* 2007; BEN-SHEM *et al.* 2010) with some modifications. Approximately 30-40 g of cells from early saturated culture of 1-2 OD were immediately frozen in liquid nitrogen and lysed in 40 mL of lysis Buffer F (20 mM Hepes pH 7.5; 100 mM KCl, 5 mM Mg(OAc)₂, 1 mM DTT, Protease Inhibitors). Cells were split into 3-4 round-bottom tubes containing 20 g of glass beads and vortexed for 6 cycles of 1 min ON - 1 min OFF at 4 °C. Twenty-five mL of clarified lysate were loaded on the top of a 20% sucrose cushion (20 mM Hepes pH 7.5; 100 mM KCl; 5 mM Mg(OAc)₂; 1 mM DTT) in a Beckman Ti45 tube. The purification of ribosomes and the separation of 40S and 60S subunits were performed as previously described (FRASER *et al.* 2007).

Protein labeling with fluorescein

The purified single-cysteine version of human eIF5A, eIF5A^{C22A,C38A,C73A,C129A,T142C} (eIF5A^{T142C}), was labeled with fluorescein-5-maleimide (Thermo Scientific), following published protocols (SOKABE and FRASER 2014). After labeling, eIF5A-fluorescein was purified from the free dye by spinning in a 2 mL size exclusion column of 6 kDa (BioRad). The amounts of dye and protein were evaluated by 495 nM absorbance and quantitative dot blots using wild-type eIF5A as a standard. Only the preparation with more than 95% of labeling was used for fluorescence anisotropy assays.

Fluorescence Anisotropy

Competition assays with fluorescein-labeled eIF5A (eIF5A-fluorescein) were conducted using a VICTOR X5 Multilabel Plate Reader (Perkin Elmer) and a modified version of a previously published protocol (FRASER et al. 2007). Inhibition constants (*K_i*) of non-labeled eIF5A wild-type and mutants were determined using a preformed ribosomal complex with eIF5A-fluorescein, in which the concentration of the ribosome and eIF5A-fluorescein was held constant at 30 nM and 5 nM, respectively, and the starting concentration of the eIF5A competitors was 5 μM. The addition of higher concentrations of the competitor did not change the equilibrium inhibition constant values, indicating that the reaction was prepared in saturating conditions. Anisotropy binding reactions were set

up in 22 μ L final volume in reaction buffer (20 mM Hepes pH 7.5; 100 mM KOAc; 2.5 mM Mg(OAc)₂; 1 mM DTT; 15 μ M BSA), and increasing concentrations of competitors were added, as indicated in the legend of Fig 6. Twenty μ L of each reaction was transferred to a 384-well plate and incubated at 30 °C for 30 min to reach equilibrium. Fluorescence Polarized (FP) light and total fluorescence were measured, and the anisotropy change (r) was converted into the fraction of eIF5A-fluorescein bound to the ribosome and fitted to the solution of a quadratic equation describing an equilibrium reaction (SOKABE and FRASER 2014). The values presented in Table 1 were obtained from the average of three independent replicates, and the errors provided are standard deviations of the mean.

RESULTS AND DISCUSSION

eIF5A contains four clusters of charged residues potentially important for interaction with ribosomal components

To search for residues on the surface of eIF5A that are important for binding to the ribosome, we combined the clustered-charged to alanine scanning mutagenesis strategy and molecular modeling of the eIF5A-ribosome complex. The cluster-charged to alanine scanning mutagenesis is based on the replacement of clustered-charged amino acid residues (E, D, K, R and H), which are possible sites of protein-protein or protein-RNA interactions, by alanine across all protein sequence .

In this work, we searched for clusters of five amino acid residues present in the eIF5A primary sequence containing at least two charged residues and substituted the charged residues with alanine (Fig 1a). We excluded from our analysis only the charged clusters inside the hypusine loop of eIF5A (from residues 45 to 60) because they are already known to be necessary for hypusine formation, which in turn is necessary for ribosome binding . We also excluded the N-terminus (from residues 1 to 16) and C-terminus (from residues 151 to 157) because they are not present in the crystal structure of eIF5A (PDB 3ER0). In this way, we designed 11 new eIF5A mutants, localized in different regions of the surface of eIF5A (Fig 1b).

The eIF5A location on 80S was modeled similarly as reported previously using data from tRNA and rRNA hydroxyl radical cleavage (GUTIERREZ et al. 2013). We performed the molecular modeling and complex structural analysis to investigate the distances of eIF5A residues from the ribosome and tRNA. The left panel of Fig 2a shows the binding region of eIF5A (yellow) in the large subunit of the ribosome (gray), located between the P and E sites and the modification loop (orange) near the peptidyl transferase center of the ribosome. The right panel of Fig 2b is a magnified view of the crystal structure of eIF5A bound to Ribosomal 60S subunit protein L1 (L1) (green) and the P site tRNA (blue). The location of eIF5A on 80S corroborates with the location of its structural homologue in bacteria, EF-P on the 70S ribosome (BLAHA et al. 2009), and our model is consistent with the previously obtained model (GUTIERREZ et al. 2013). We then used this model to analyze the 11 charged clusters of the eIF5A surface, and clusters 4, 6, 7 and 11 were selected for further analysis because they not only harbor residues predicted to physically contact the rRNA to some extent but also show more evidence for binding to the L1 protein (clusters 6, 7 and 11) or the P-site tRNA (cluster 4) (Fig 2c and data not shown). Although the structure of eIF5A in complex with the ribosome was published while we prepared this manuscript, the structural coordinates have not been released so far.

Clustered-charged to alanine mutants *tif51A-4* and *tif51A-7* of eIF5A exhibit important growth defects not related to decreased eIF5A protein or hypusine levels

To assess the functional effects of changing the charged residues present in clusters 4, 6, 7 and 11, we tested their abilities to complement a yeast strain depleted of eIF5A. The mutations to substitute charged residues for alanine were constructed in the plasmid pYGEX-*TIF51A*, which is under the control of galactose for expression, and introduced in the strain VZL1074 (*tetOpr-TIF51A*), which has eIF5A production turned off in the presence of tetracycline. These new alleles of eIF5A, containing charge-clustered to alanine mutations, were named after their cluster names: *tif51A-4*, *tif51A-6*, *tif51A-7* and *tif51A-11*. Fig 3 illustrates the results of complementation of these eIF5A mutants, with negative (empty vector pYGEX), positive (pYGEX-*TIF51A*) and the non-hypuslatable mutant eIF5A^{K51R} (pYGEX-*tif51A*^{K51R}) as controls (SCHNIER *et al.* 1991). As observed in Fig 3, the mutants *tif51A-6* and *tif51A-11* could complement the absence of wild-type eIF5A, whereas the mutants *tif51A-4* and *tif51A-7* exhibited an important reduction in their abilities to promote growth in these conditions. Although the mutants *tif51A-4* and *tif51A-7* could maintain some growth in the absence of wild-type eIF5A compared with the empty vector and *tif51A*^{K51R} mutant, their growth phenotypes clearly demonstrated that the substitutions of the clustered-charged residues to alanine in these mutants impaired eIF5A function. In addition to complementation, this assay could also evaluate the negative dominance of these mutants when there was simultaneous expression of wild-type and mutant eIF5A (tetracycline-free medium containing galactose). Curiously, the mutant *tif51A-4* showed a dominant negative phenotype, since a growth defect was observed even in the presence of the wild-type gene (SC-ura + galactose). The finding of a dominant negative mutant of eIF5A is quite interesting because there is no eIF5A dominant negative mutant described so far. This dominant negative can be useful in future genetic screenings in the presence of endogenous eIF5A.

Because the impairment of growth in mutants *tif51A-4* and *tif51A-7* may be a result of a decrease in total eIF5A protein levels, we tested mutant eIF5A levels compared to the wild-type eIF5A levels. As observed in the lower panel of Fig 4 (total eIF5A) and the WCE lanes of Fig 5, both mutants *tif51A-4* and *tif51A-7* produced levels of modified eIF5A protein similar to the wild-type, indicating that their inability to complement is caused by the lack of eIF5A function, rather than by the loss of the mutant protein.

Additionally, because hypusine modification is essential for eIF5A activity (PARK 2006), we examined whether the growth defects of the eIF5A mutants could be related to decreased hypusination levels. To determine if the eIF5A mutants were hypusinated *in vivo*, we performed an immunoblot assay using an antibody that specifically recognizes hypusinated eIF5A and compared these results with total eIF5A. Wild-type eIF5A and the non-hypuslatable eIF5A^{K51R} mutant (SCHNIER *et al.* 1991) were used as controls. The hypusination levels of eIF5A and the mutants were similar in this assay, and this information further support the idea that the defective growth phenotype of the *tif51A-4* and *tif51A-7* mutants is not related to their hypusination levels.

eIF5A from mutant *tif51A-7* exhibits an importantly reduced affinity for the ribosome *in vivo* and *in vitro*

To evaluate the *in vivo* physical interactions between the eIF5A mutants and ribosomal complexes, we first performed *in vivo* GST-pull-downs. For this analysis, we chose the eIF5A mutants *tif51A-4* and *tif51A-7* because of their growth phenotypes along with one of the mutants that exhibited no growth phenotype, *tif51A-6*, as a control. Notably, the mutants *tif51A-4* and *tif51A-6* could co-purify the ribosome (detected by L5) in a manner similar to the wild-type, whereas the mutant *tif51A-7* exhibited an important reduction of ribosome pulled down. These results suggest that the decrease in ribosome binding by mutated eIF5A may be the cause of the *tif51A-7* growth phenotype and, therefore, that the charged residues of cluster 7 are necessary for this physical interaction.

Although the pull-down results for the *tif51A-6* allele were consistent with its ability to substitute for wild-type eIF5A, the mutant *tif51A-4* exhibited the most severe growth phenotypes among the mutants studied herein, yet it co-purified with the ribosome. Notably, according to the modeled eIF5A-ribosome complex, the charged residues in cluster 4 (modified to alanine in *tif51A-4*) contact the P-site tRNA. Accordingly, our results suggest that interfering with residues on the surface of eIF5A binding to the P-site tRNA does not abolish its binding to the ribosome. Moreover, the ability of eIF5A from *tif51A-4* to bind to the ribosome while potentially blocking physical interaction with P-site tRNA could explain its dominant negative growth phenotype.

Then, we performed fluorescence anisotropy, a more quantitative, *in vitro* assay, to compare the affinities between eIF5A isoforms and the ribosome. Fluorescence anisotropy is based on the fact that when a protein conjugated to a fluorophore is excited in solution with polarized light, it emits fluorescence as polarized light dependent on its mobility (LAKOWICZ 2006). Therefore, free proteins have much higher mobility compared with proteins in a larger complex. The affinities of eIF5A-Hyp ($K_i \approx 8$ nM) to the 80S revealed that these proteins could bind directly and tightly to the 80S. As expected (JAO and CHEN 2006; ZANELLI et al. 2006), hypusine was required for a stable eIF5A-ribosome binding because the K_i for eIF5A-Lys ($K_i \approx 238$ nM) was approximately 30 times lower than eIF5A-Hyp. Table 1 provides the experimental values and standard deviations (SD) obtained from triplicates for minimum anisotropy ($r_{\min}$), maximum anisotropy (r_{bound}), maximum anisotropy variation ($\Delta r_{\max}$) and binding constant (K_i). Likewise, all non-modified (non-hypusine) mutant proteins (Lys) exhibited K_i values considerably lower than hypusine-containing proteins (Hyp) (Table 1). The affinities of eIF5A-Lys from mutants *tif51A-6* and *tif51A-7* to the ribosome were too low to calculate their K_i values. Finally, hypusine-containing eIF5A from mutants *tif51A-4*, *tif51A-6* and *tif51A-7* were evaluated in the same fluorescence anisotropy assay (Fig 6b). All alanine-scanning mutants tested showed a significant decrease in affinity to the ribosome, indicating that all charged clusters tested herein somehow affected the interaction with the ribosome, although not all of them exhibited growth phenotypes or revealed this decrease in affinity in the GST-pull-down. Comparing the mutants among themselves, *tif51A-4* ($K_i = 170$ nM) and *tif51A-6* ($K_i = 167$ nM) exhibited similar

1
2
3
4 binding affinities to the ribosome, whereas *tif51A-7* exhibited the weakest ribosome binding ($K_i > 1 \mu\text{M}$),
5 revealing a dramatic defect in ribosome binding by eIF5A from this mutant.
6

7
8 Notably, although the decrease in binding capacity of eIF5A from mutants *tif51A-4* and *tif51A-6* was not
9 apparent in the GST-pull-down assay, it is possible that this less quantitative assay cannot clearly distinguish them
10 from wild-type. Additionally, the mutant *tif51A-6* exhibiting no discernible growth phenotype suggests that an
11 ~10-fold decrease in affinity binding of the eIF5A-ribosome complex does not compromise cell growth.
12 Conversely, it is also possible that other factors *in vivo* can contribute to alleviate this decrease in affinity of
13 eIF5A to the ribosome in mutants *tif51A-4* and *tif51A-6*. Nevertheless, the observation that eIF5A from mutants
14 *tif51A-4* and *tif51A-6* showed similar results in the anisotropy fluorescence assay further supports the idea that it
15 is not decreased binding to the ribosome that generates the growth phenotypes in mutant *tif51A-4*.
16
17
18
19
20
21
22
23
24

25 **ACKNOWLEDGEMENTS**

26
27 We are grateful to Dr. Otavio H. Thiemann (Physics Institute of Sao Carlos, University of Sao Paulo-
28 USP) for the use of computational laboratory infrastructure. This work was supported by grants to S. R. V. and C.
29 F. Z. from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), the Conselho Nacional de
30 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and PADC from the Faculdade de Ciências Farmacêuticas,
31 UNESP. We also thank the FAPESP for fellowships awarded to most of the authors.
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

FIGURE LEGENDS

Fig. 1 Residues substituted in charge-clustered to alanine mutations (a) Primary sequence of eIF5A highlighting the mutated clusters. In gray are the residues not present in the eIF5A crystal structure. The red boxes indicate the clusters of five amino acid residues with at least two charged amino acids chosen as targets for the alanine scanning strategy. **(b)** eIF5A structure (PDB 3ER0) showing the amino acid residues mutated highlighted in red and the hypusination site highlighted in orange (GENTZ et al. 2009).

Fig. 2 Model of eIF5A binding to 60S-tRNA ribosome complex (a) Interaction model of surface representation of *S. cerevisiae* eIF5A (yellow) with hypusination site in orange (PDB 3ER0) and ribbon representation of Met-tRNA_i^{Met} (blue; PDB 3JBN) on the ribbon structure of yeast 60S ribosome (grey; PDB 4V7R). The position of L1 is indicated in green. **(b)** Magnified views of docked eIF5A, P site Met-tRNA_i^{Met} and L1 protein, with the putative interaction residues highlighted in red. **(c)** Magnified views of docked eIF5A, P site Met-tRNA_i^{Met} and L1 protein.

Fig. 3 Growth analysis of *S. cerevisiae* expressing eIF5A mutants from alanine scanning Serial dilutions of VZL1074 strain (*tetOpr-TIF51A*) containing pSV20 (vector pYGEX – negative control), pSV36 (pYGEX-*TIF51A* – positive control), pSV41 (pYGEX-*tif51*^{K51R} – non-hypuslatable control) or mutants *tif51A-4*, *tif51A-6*, *tif51A-7* and *tif51A-11* were inoculated in SC-ura supplemented with or without 20 µg/ml tetracycline, containing 2% glucose or galactose, and incubated at 25 °C for 3 days.

Fig. 4 Charged-clustered to alanine *tif51A-4* and *tif51A-7* mutants exhibited no decrease in total eIF5A or hypusination levels. The levels of total eIF5A and hypusine-containing eIF5A was tested for the eIF5A produced by mutants *tif51A-4* and *tif51A-7* using an eIF5A antibody that recognizes all eIF5A forms or the hypusine-specific eIF5A antibody. It is indicated on the top of each lane the allele producing the eIF5A analyzed. The *tif51A-K51R* allele generates a non-hypuslatable eIF5A (SCHNIER et al. 1991)

Fig. 5 GST-pull-down of clustered-charged to alanine mutants of eIF5A. Yeast whole cell extracts (WCE) derived from cells expressing either GST alone or GST-eIF5A (from wild-type *TIF51A*, or from mutants *tif51A-4*, *tif51A-6* and *tif51A-7*) were incubated with glutathione–Sepharose beads, washed, and proteins bound to the beads (bound) were denatured and fractionated by SDS–PAGE. Western blot analysis from fractions of whole cell extract (WCE) and bound was performed using specific polyclonal antibodies against ribosomal protein L5 (anti-L5) and anti-eIF5A.

Fig. 6 Binding assays of eIF5A mutants with yeast 80S ribosome The curves in the graphs indicate the fraction of wild-type eIF5A-fluorescein bound to the yeast 80S in competition with: **(a)** wild-type eIF5A both containing

hypusine (eIF5A-Hyp) or not (unmodified - eIF5A-Lys) or **(b)** hypusine-containing eIF5A from wild-type (*TIF51A*) or mutants *tif51A-4*, *tif51A-6* and *tif51A-7*. The values of equilibrium binding constants and anisotropy changes are provided in Table 1. All data were obtained in independent experimental triplicates.

Table 1 Values of mean and standard deviation of the anisotropy change and equilibrium binding constants K_i

Protein-FI + 80S	K_i^a (nM)	r_{free} or r_{min}^b	r_{bound}^c	Δr_{max}^d
TIF51A - Hyp	9±1.1	0.177±0.01	0.245±0.005	0.068±0.006
tif51A-4 - Hyp	171±14	0.191±0.003	0.261±0.010	0.070±0.013
tif51A-6 - Hyp	167±54	0.211±0.007	0.252±0.011	0.0413±0.008
tif51A-7 - Hyp	1148±508	0.175±0.015	0.255±0.004	0.080±0.018
TIF51A - Lys	238±43	0.201±0.005	0.244±0.001	0.043±0.004
tif51A-4 - Lys	388±71	0.201±0.020	0.256±0.006	0.054±0.004
tif51A-6 - Lys	nd	0.206±0.026	0.243±0.009	0.037±0.035
tif51A-7 - Lys	nd	0.229±0.004	0.236±0.004	0.007±0.001

^a Equilibrium binding constant obtained by titrating eIF5A as a competitor into fixed amount of ribosome+eIF5A-fluorescein;

^b Anisotropy values for the free eIF5A-fluorescein or the minimum anisotropy detected for the competition assays;

^c Anisotropy of the eIF5A-fluorescein bound to the ribosomal complex in the absence of competitors;

^d Maximum anisotropy change obtained by the difference between r_{free} or r_{min} and r_{bound} ;

nd = not determined measurements;

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

We declare that we have no conflicts of interest.

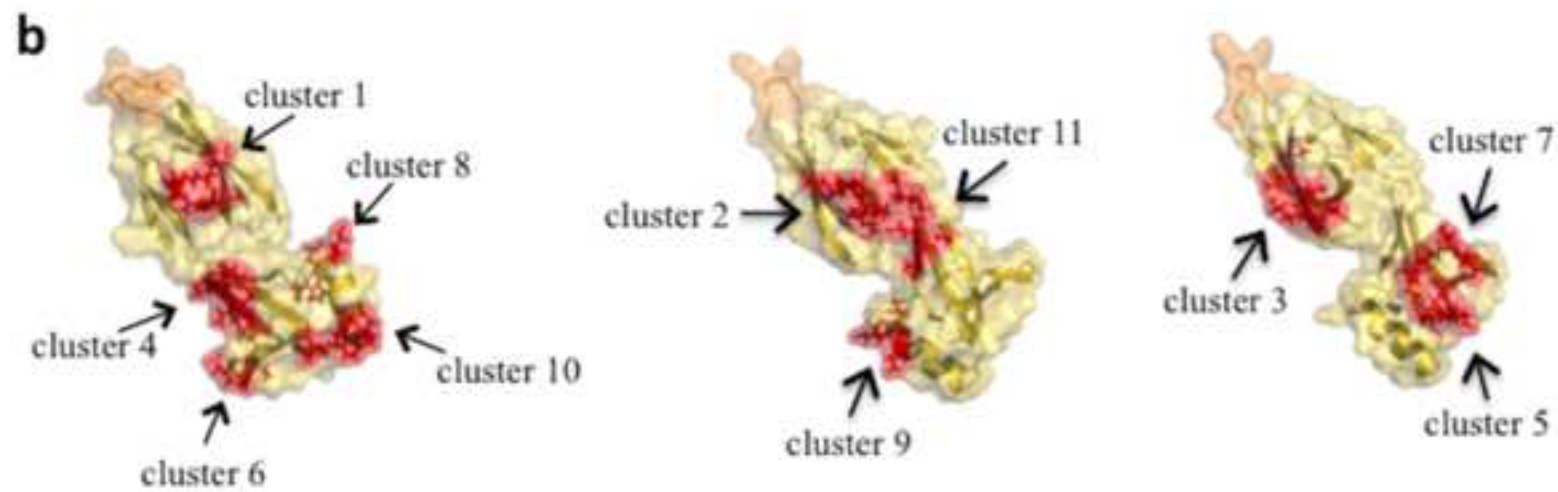
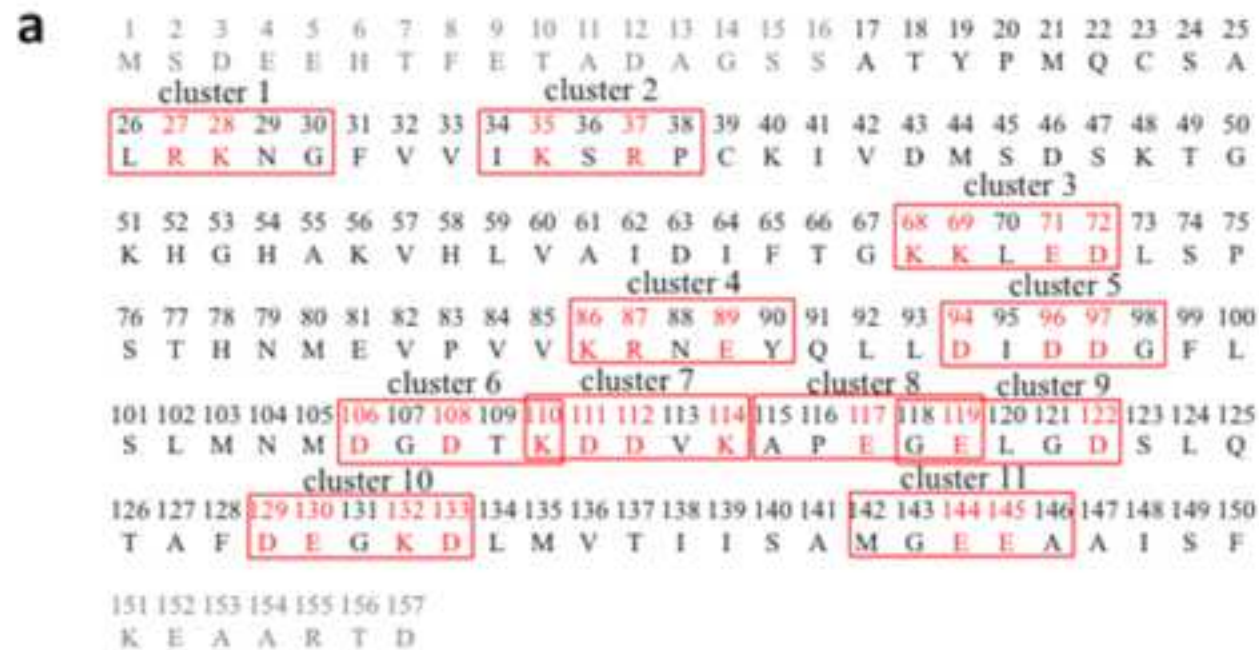
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

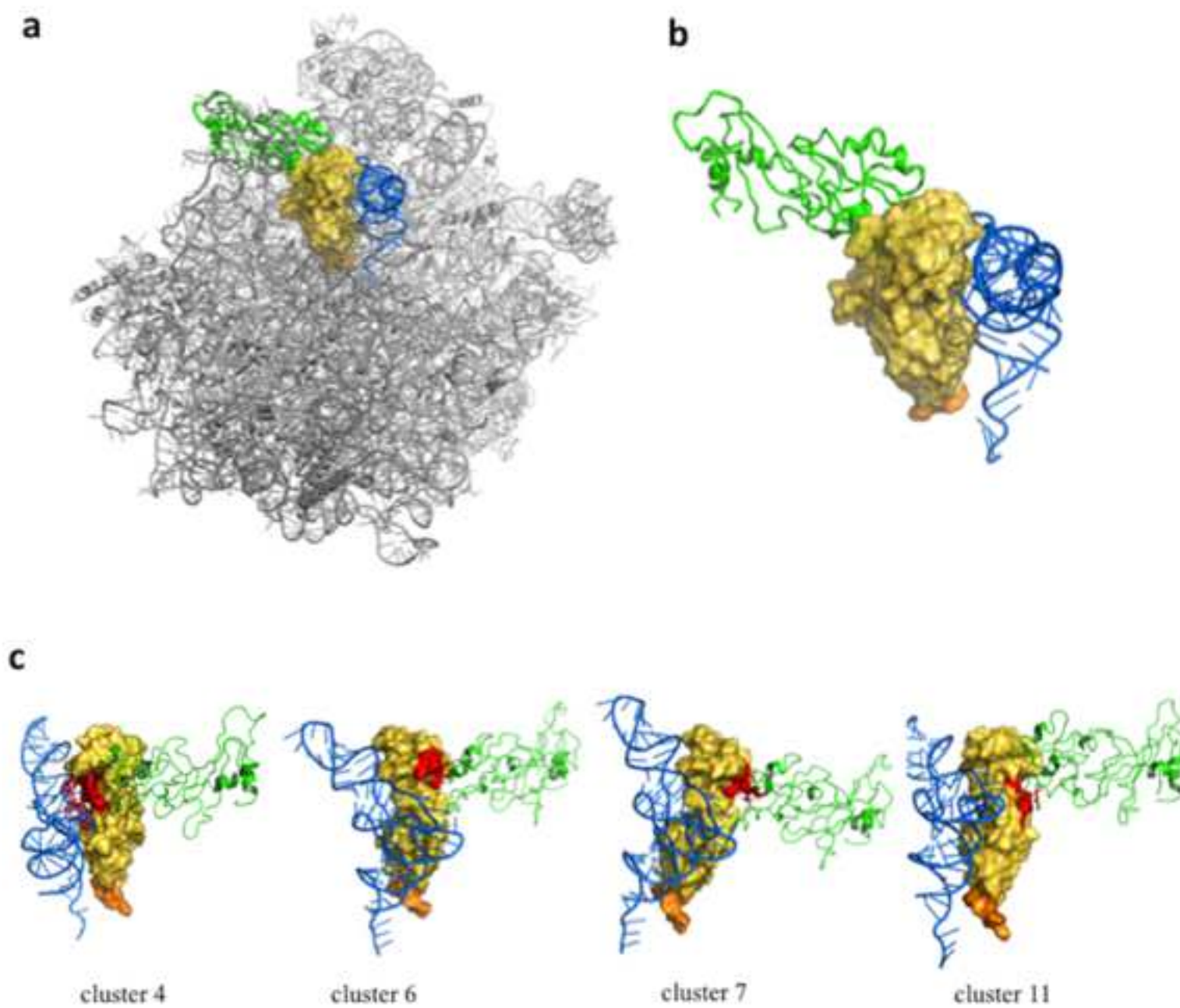
This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

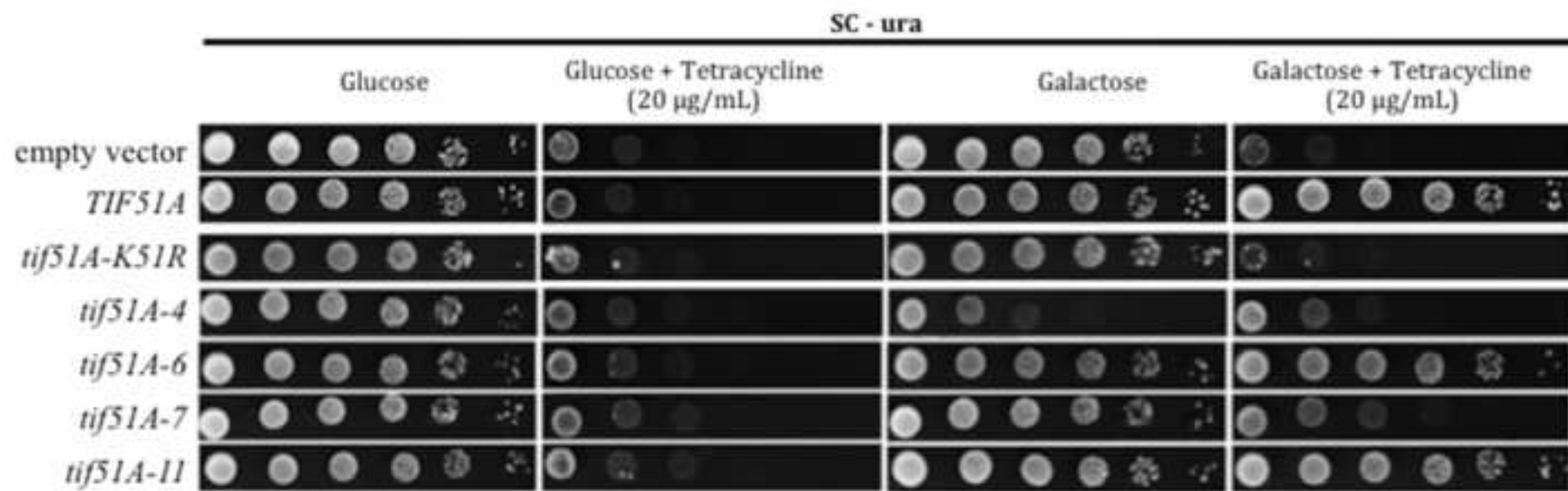
REFERENCES

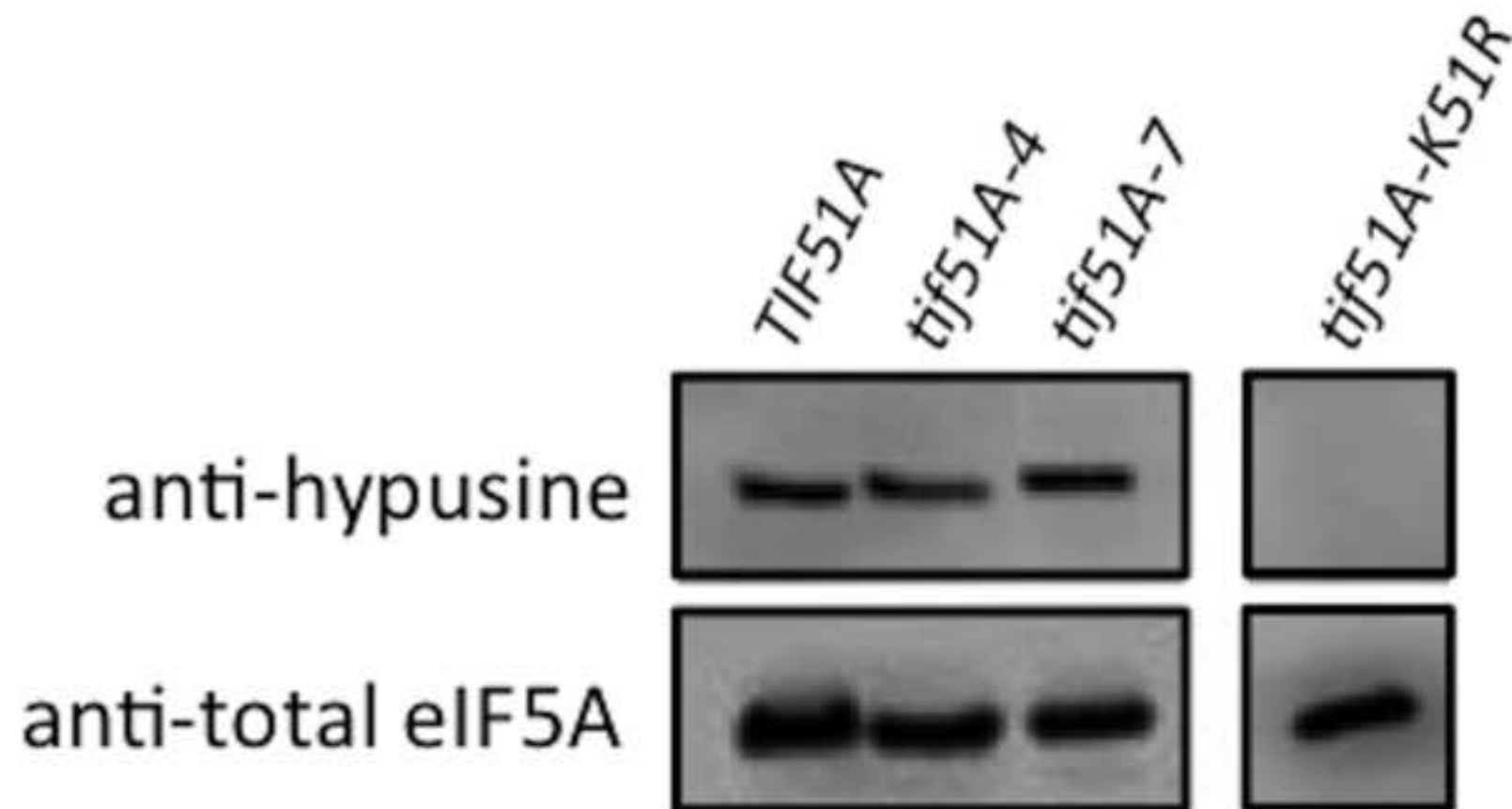
- Ben-Shem, A., L. Jenner, G. Yusupova and M. Yusupov (2010) Crystal structure of the eukaryotic ribosome. *Science* 330: 1203-1209
- Blaha, G., R. E. Stanley and T. A. Steitz (2009) Formation of the first peptide bond: the structure of EF-P bound to the 70S ribosome. *Science* 325: 966-970
- Dever, T. E., and R. Green (2012) The elongation, termination, and recycling phases of translation in eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4
- Fraser, C. S., K. E. Berry, J. W. Hershey and J. A. Doudna (2007) eIF3j is located in the decoding center of the human 40S ribosomal subunit. *Mol Cell* 26: 811-819
- Gentz, P. M., G. L. Blatch and R. A. Dorrington (2009) Dimerization of the yeast eukaryotic translation initiation factor 5A requires hypusine and is RNA dependent. *FEBS J* 276: 695-706
- Gutierrez, E., B. S. Shin, C. J. Woolstenhulme, J. R. Kim, P. Saini *et al.* (2013) eIF5A Promotes Translation of Polyproline Motifs. *Mol Cell*
- Jao, D. L. E., and K. Y. Chen (2006) Tandem affinity purification revealed the hypusine-dependent binding of eukaryotic initiation factor 5A to the translating 80S ribosomal complex. *Journal of Cellular Biochemistry* 97: 583-598
- Lakowicz, J. R. (2006) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer, US
- Lassak, J., E. C. Keilhauer, M. Fürst, K. Wuichet, J. Gödeke *et al.* (2015a) Arginine-rhamnosylation as new strategy to activate translation elongation factor P. *Nat Chem Biol* 11: 266-270
- Lassak, J., D. N. Wilson and K. Jung (2015b) Stall no more at polyproline stretches with the translation elongation factors EF-P and IF-5A. *Mol Microbiol*
- Mandal, S., A. Mandal and M. H. Park (2015) Depletion of the polyamines spermidine and spermine by overexpression of spermidine/spermine N¹-acetyltransferase 1 (SAT1) leads to mitochondria-mediated apoptosis in mammalian cells. *Biochem J* 468: 435-447
- Park, J. H., C. A. Dias, S. B. Lee, S. R. Valentini, M. Sokabe *et al.* (2011) Production of active recombinant eIF5A: reconstitution in E.coli of eukaryotic hypusine modification of eIF5A by its coexpression with modifying enzymes. *Protein Eng Des Sel* 24: 301-309
- Park, M. H. (2006) The Post-Translational Synthesis of a Polyamine-Derived Amino Acid, Hypusine, in the Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A (eIF5A). *J Biochem (Tokyo)* 139: 161-169
- Rodnina, M. V., and W. Wintermeyer (2009) Recent mechanistic insights into eukaryotic ribosomes. *Curr Opin Cell Biol* 21: 435-443
- Rossi, D., R. Kuroshu, C. F. Zanelli and S. R. Valentini (2014) eIF5A and EF-P: two unique translation factors are now traveling the same road. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 5: 209-222
- Schmidt, C., T. Becker, A. Heuer, K. Braunger, V. Shanmuganathan *et al.* (2015) Structure of the hypusinylated eukaryotic translation factor eIF-5A bound to the ribosome. *Nucleic Acids Res*
- Schnier, J., H. G. Schwelberger, Z. Smit-McBride, H. A. Kang and J. W. Hershey (1991) Translation initiation factor 5A and its hypusine modification are essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 11: 3105-3114
- Sokabe, M., and C. S. Fraser (2014) Human eukaryotic initiation factor 2 (eIF2)-GTP-Met-tRNA_i ternary complex and eIF3 stabilize the 43 S preinitiation complex. *J Biol Chem* 289: 31827-31836
- Sun, M., W. Li, K. Blomqvist, S. Das, Y. Hashem *et al.* (2015) Dynamical features of the *Plasmodium falciparum* ribosome during translation. *Nucleic Acids Res* 43: 10515-10524
- Tong, Y., I. Park, B. S. Hong, L. Nedyalkova, W. Tempel *et al.* (2009) Crystal structure of human eIF5A1: insight into functional similarity of human eIF5A1 and eIF5A2. *Proteins* 75: 1040-1045
- Valentini, S. R., J. M. Casolari, C. C. Oliveira, P. A. Silver and A. E. McBride (2002) 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
- Yang, J., R. Yan, A. Roy, D. Xu, J. Poisson *et al.* (2015) The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat Methods* 12: 7-8

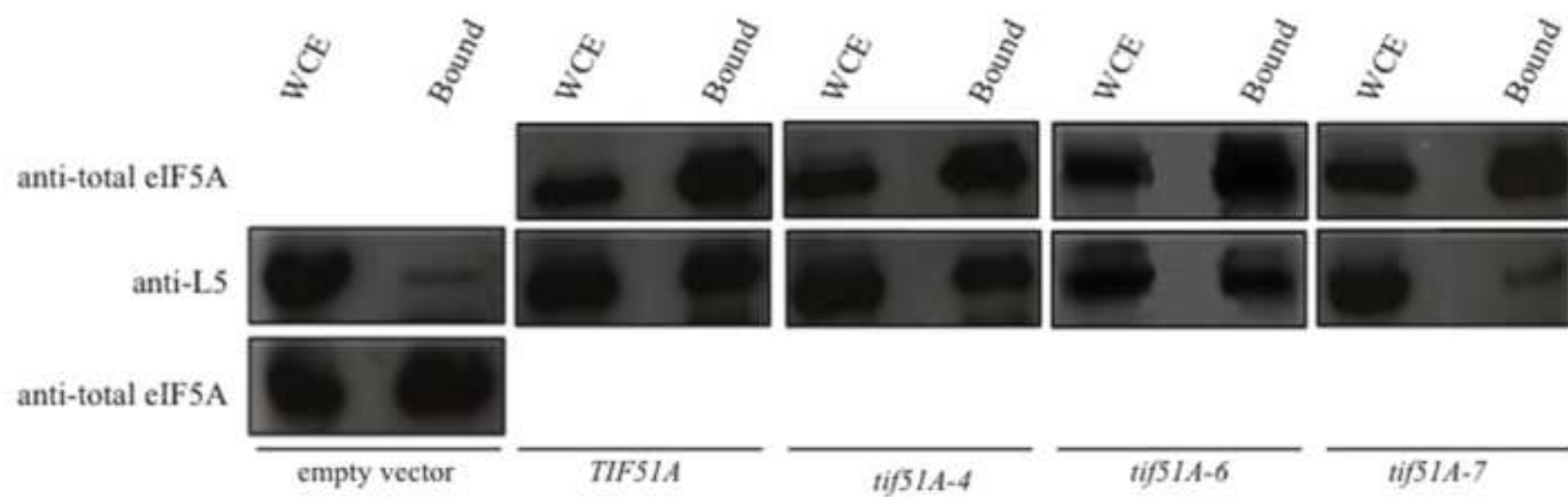
Zanelli, C. F., A. L. Maragno, A. P. Gregio, S. Komili, J. R. Pandolfi *et al.* (2006) eIF5A binds to translational machinery components and affects translation in yeast. *Biochem Biophys Res Commun* 348: 1358-1366

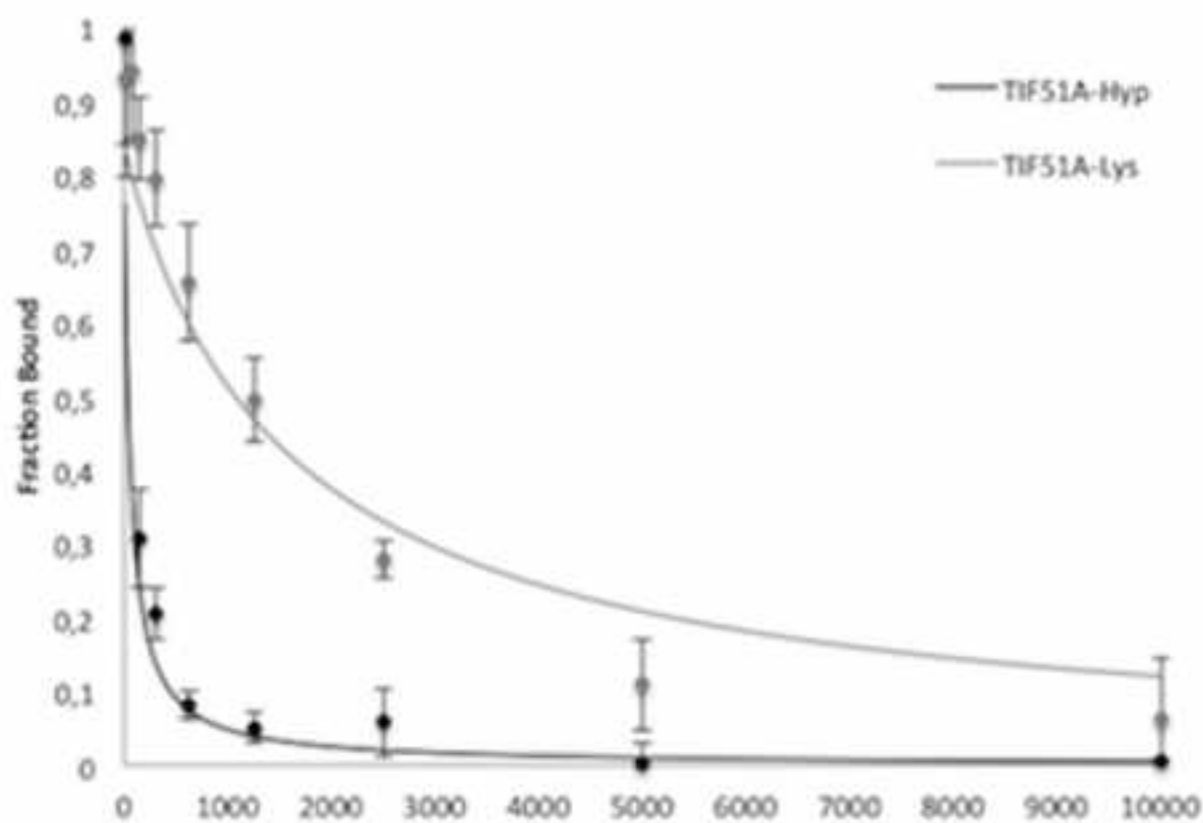
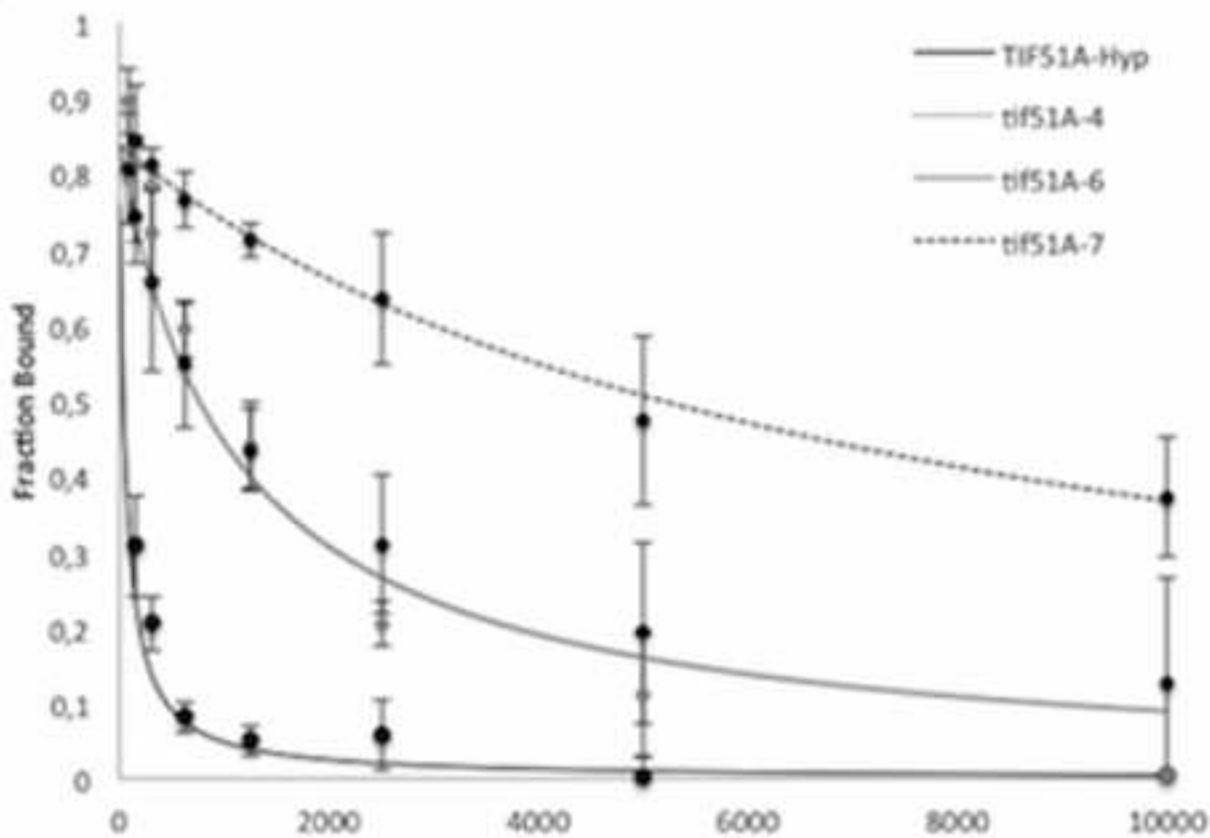










a**b**

ANEXO 3

eIF5A has a function in the cotranslational translocation of proteins into the ER

Danuza Rossi · Fabio Carrilho Galvão · Hermano Martins Bellato ·
Paulo E. G. Boldrin · Brenda J. Andrews · Sandro Roberto Valentini ·
Cleslei Fernando Zanelli

Received: 6 May 2013 / Accepted: 1 November 2013 / Published online: 5 December 2013
© Springer-Verlag Wien 2013

Abstract The putative eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) is a highly conserved and essential protein present in all organisms except bacteria. To be activated, eIF5A requires the conversion of a specific residue of lysine into hypusine. This hypusine modification occurs posttranslationally in two enzymatic steps, and the polyamine spermidine is the substrate. Despite having an essential function in translation elongation, the critical role played by eIF5A remains unclear. In addition to demonstrating genetic interactions with translation factors, eIF5A mutants genetically interact with mutations in *YPT1*, which encodes an essential protein involved in endoplasmic reticulum (ER)-to-Golgi vesicle transport. In this study, we investigated the correlation between the function of eIF5A in translation and secretion in yeast. The results of *in vivo* translocation assays and genetic interaction analyses suggest a specific role for eIF5A in the cotranslational translocation of proteins into the ER, but not in the posttranslational pathway. Additionally, we observed that a block in eIF5A activation up-regulates stress-induced chaperones, which also occurs when SRP function is lost. Finally, loss of eIF5A function affects binding of the ribosome-nascent chain complex to SRP. These results link eIF5A function in translation with a role of SRP in the cell

and may help explain the dual effects of eIF5A in differential and general translation.

Keywords Translation elongation · Hypusine · eIF5A · Cotranslational translocation · Endoplasmic reticulum

Abbreviations

eIF5A	Eukaryotic translation initiation factor 5A
<i>TIF51A</i>	Gene encoding eIF5A in yeast
eEF2	Eukaryotic translation elongation factor 2
<i>EFT2</i>	Gene encoding eEF2 in yeast
eEF1A	Eukaryotic translation elongation factor 1A
EF-P	Elongation factor P
SRP	Signal recognition particle
ER	Endoplasmic reticulum
RNC	Ribosome-nascent chain
CPY	Carboxypeptidase Y
DPAP B	Dipeptidyl aminopeptidase B

Introduction

The putative eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) is a highly conserved and essential protein that is present in archaea and eukaryotes but not in bacteria (Schnier et al. 1991; Chen and Liu 1997). It was initially purified from the ribosomes of reticulocyte lysates, and eIF5A was also shown to stimulate the synthesis of methionyl-puromycin *in vitro* (Benne and Hershey 1978). However, a controversy has existed for years about whether eIF5A plays a direct role in translation. Meanwhile, several other functions have been attributed to eIF5A,

D. Rossi · F. C. Galvão · H. M. Bellato ·
P. E. G. Boldrin · S. R. Valentini · C. F. Zanelli (✉)
Department of Biological Sciences, School of Pharmaceutical
Sciences, Univ Estadual Paulista, UNESP, Araraquara, SP,
Brazil
e-mail: zanellicf@fcar.unesp.br

F. C. Galvão · B. J. Andrews
Department of Molecular Genetics, Donnelly Center for
Cellular and Biomolecular Research, University of Toronto,
Toronto, Canada

including roles in cell cycle progression, nucleocytoplasmic transport, mRNA degradation and apoptosis (Zanelli and Valentini 2007; Park et al. 2010; Marra et al. 2007). Nevertheless, it was recently demonstrated that eIF5A physically interacts with the 80S ribosome, as well as with translation elongation factors eEF1A and eEF2. In addition, eIF5A co-fractionates with monosomes and polysomes in a translation-dependent manner (Jao and Chen 2006; Zanelli et al. 2006). Mutants of eIF5A show an accumulation of polysomes instead of polysome run-off, and they cause an increase in the average time required for ribosomes to transit along mRNAs (Gregio et al. 2009; Saini et al. 2009). Moreover, eIF5A interacts functionally with elongation factor eEF2 (Dias et al. 2012). These results not only support the notion that eIF5A plays a direct role in translation but also suggest that its role is specifically in translation elongation rather than translation initiation.

eIF5A is activated by a unique posttranslational modification, in which a specific lysine residue (K51 in yeast) is converted into hypusine over two steps: first, the enzyme deoxyhypusine synthase (Dys1 in yeast) transfers an aminobutyl moiety from the polyamine spermidine to the amino group of the specific lysine residue, forming deoxyhypusine; then, addition of a hydroxyl group is catalyzed by the deoxyhypusine hydroxylase (Lial in yeast) (Park et al. 2010).

Although bacteria do not have an eIF5A orthologue, they have instead the elongation factor P (EF-P), which shares important structural features with eIF5A (Park et al. 2010; Dias et al. 2013). EF-P does not contain a hypusine residue; however, in a subset of bacterial species, EF-P does undergo a posttranslational modification which involves the addition of a β -lysine to a specific lysine residue, corresponding to the hypusine modification site in eIF5A (Navarre et al. 2010; Yanagisawa et al. 2010; Bailly and de Crécy-Lagard 2010; Roy et al. 2011; Park et al. 2012). This EF-P modification, called β -lysylation, is analogous to the hypusine modification of eIF5A and is important for the function of EF-P in the translation and cell growth of *E. coli* (Yanagisawa et al. 2010; Park et al. 2012).

The budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* has been used as a model system to study eIF5A, and several genetic interactions have already been identified (Valentini et al. 2002; Zanelli and Valentini 2005; Frigieri et al. 2007, 2008; Dias et al. 2012). One interesting genetic interaction is synthetic lethality caused by mutation of both eIF5A and Ypt1 (Frigieri et al. 2008), a protein essential for the fusion of endoplasmic reticulum (ER) vesicles to the Golgi (Segev 2001). Although we demonstrated that eIF5A does not work directly in the vesicle trafficking, this factor is associated to ribosomes bound to membranes, implying a

function for eIF5A in translation at the ER (Frigieri et al. 2008).

To better understand the link between eIF5A and the secretory pathway, in this study, we analyzed the involvement of eIF5A in the translocation of proteins into the ER. We demonstrate that eIF5A is important for the cotranslational translocation of proteins into the ER, but not for the posttranslational translocation pathway. Additionally, genetic analyses revealed that interactions only occur between eIF5A and factors essential for the cotranslational translocation pathway. Interestingly, when hypusine formation and eIF5A activation are blocked, we observed up-regulation of the expression of stress-induced chaperones, a phenotype also seen in mutants with loss of function of the cotranslational translocation pathway and the consequent accumulation of unfolded proteins in the cytosol. Finally, we show that eIF5A function is important for the ribosome-nascent chain (RNC) complex to bind the signal recognition particle (SRP). Collectively, these

Table 1 The yeast strains used in this study

Strain	Genotype	Source
SVL14	<i>MATa ade2 his3 leu2 trp1 ura3 can1 tif51A-1</i> (P83S)	Lab collection (Valentini et al. 2002)
SVL82	<i>MATa ade2 his3 leu2 trp1 ura3 can1</i>	Lab collection
SVL613	<i>MATa leu2 trp1 ura3 his3 dys1::HIS3 [DYS1/TRP1/CEN]</i> (pSV520)	Lab collection
SVL614	<i>MATa leu2 trp1 ura3 his3 dys1::HIS3 [dys1-1 (W75R, T118A, A147T)/TRP1/CEN]</i> (pSV730)	Lab collection (Galvão et al. 2013)
VZL1021	<i>MATa ura3 leu2 his3 trp1 ade2 sec61-101</i>	Davis Ng
VZL1246	<i>MATa ura3 leu2 his3 trp1 ade2 can1 rpl25::HIS3 [RPL25-GFP/LEU2/CEN]</i>	Martin Pool
VZL1248	<i>MATa ura3 ade2 trp1 leu2 his3 sec65-1</i>	Martin Pool
VZL1257	<i>MATa his3 leu2 ura3 tif51A-1::natMX4 can1 lyp1</i>	Lab collection
VZL1292	<i>MATa ade2 his3 leu2 trp1 ura3 can1 [eft2^{H699K}/2μ/TRP1]</i> (pVZ1370)	Lab collection
Y07842 ^a	<i>MATa his3 leu2 ura3 sec61-2::kanMX4</i>	Brenda Andrews
Y07900 ^a	<i>MATa his3 leu2 ura3 sec62-ts::kanMX4</i>	Brenda Andrews
Y11000 ^a	<i>MATa his3 leu2 ura3 sec65-1::kanMX4</i>	Brenda Andrews
1623 ^a	<i>MATa his3 leu2 ura3</i>	Brenda Andrews

^a Li et al. (2011)

Table 2 The plasmids used in this study

Plasmid	Description	Source
pSV59	<i>CEN, LEU2</i>	Lab collection
pSV60	<i>CEN, URA3</i>	Lab collection
pSV65	<i>2μ, URA3</i>	Lab collection
pSV107	<i>TIF51A, 2μ, URA3</i>	Lab collection
pSV138	<i>TIF51A, CEN, URA3</i>	Lab collection
pSV146	<i>TIF51A, CEN, LEU2</i>	Lab collection
pSV364	<i>2μ, URA3</i>	Lab collection
pSV374	<i>2μ, LEU2</i>	Lab collection
pVZ1064	<i>SSCPY-URA3, HIS3, CEN</i>	Davis Ng
pVZ1110	<i>GALI-DAP2-6xHis, 2μ, URA3</i>	Open biosystems/Lab collection
pVZ1359	<i>SEC65, SRP21, SRP72, 2μ, URA3</i>	Colin J. Stirling
pVZ1360	<i>SCR1, SRP14, SRP54, SRP68, 2μ, LEU2</i>	Colin J. Stirling
pVZ1370	<i>eft2^{H699K}, 2μ, TRP1</i>	Lab collection

results reveal a close connection and specific interaction between eIF5A and the translocation of proteins into the ER via the cotranslational pathway.

Materials and methods

Yeast strains, plasmids and standard procedures

The yeast strains and plasmids used in this study are listed in Tables 1 and 2, respectively. The procedures for cell growth and genetic manipulations were performed according to standard protocols (Guthrie and Fink 1991).

Western blot analysis

Yeast strains were grown to mid-log phase and were subsequently lysed in protein extraction buffer (20 mM Tris–HCl, at pH 7.5, 2 mM dithiothreitol, 2 mM EDTA and 5 μg/mL each of pepstatin, leupeptin, aprotinin and chymostatin). Total protein extracts were resolved by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The proteins of interest were detected through immunoblotting, using specific antibodies and the chemiluminescence detection system.

Growth analysis and temperature sensitivity assay

Yeast strains were grown under permissive conditions, and equal amounts of the cultures were subsequently harvested. Tenfold serial dilutions were plated onto specific media and grown at the indicated temperatures for 3 days.

Synthetic genetic interactions

Strains carrying double knockout alleles or mutations were generated by standard crossing and sporulation methods. Spores of interest were grown in the presence of nourseothricin (*tif51A-1::natMX4*) and geneticin to select for other mutant genes (*kanMX4* marker). The strains were then transformed with a plasmid encoding *TIF51A* or an empty vector. Briefly, the plasmid shuffle assay (Lorsch 2007) was used to select the strains that, due to natural plasmid loss, did not harbor the *TIF51A/URA3* plasmid after being grown in media containing uracil. This selection allows for an analysis of the gene interactions both with and without a copy of the wild-type gene in an isogenic background.

Subcellular fractionation

The subcellular fractionation of the lysed cells was based on previously described protocols (Frey et al. 2001; Dalley et al. 2008). The pellet of cells was prepared according to the western blot protocol, including a treatment with 0.1 mg/mL cycloheximide for 5 min just before lysis. The lysates were cleared of cellular debris by centrifugation at 1,200×g for 10 min, and the membranes were pelleted by centrifugation at 18,000×g for 20 min. The pellet was solubilized by the addition of 1.5 % (weight/volume) CHAPS in the presence of 500 mM KOAc. Insoluble materials were removed by high-speed centrifugation. The resulting supernatant was centrifuged for 1 h at 256,000×g to generate a ribosome-enriched pellet and a postribosomal supernatant. The total protein extract (T), postribosomal supernatant (S) and ribosomal-enriched pellet (P) were each analyzed by western blot. The western blot signals of the samples were quantified using ImageScanner III and IQ Tools (GE Healthcare Life Sciences). The values of the pellet fractions, normalized by their respective total fractions, were plotted in percentages relative to the wild type (assuming wild type = 1.0) using Microsoft Excel software (Microsoft, Redmond, Washington, USA).

Results and discussion

A mutant of eIF5A shows a cotranslational translocation defect, which is not due to impaired general translation elongation

Considering the involvement of eIF5A in elongation and its functional connection to the secretory pathway (Frigieri et al. 2008; Gregio et al. 2009), we hypothesized that eIF5A might act during ER-associated protein synthesis.

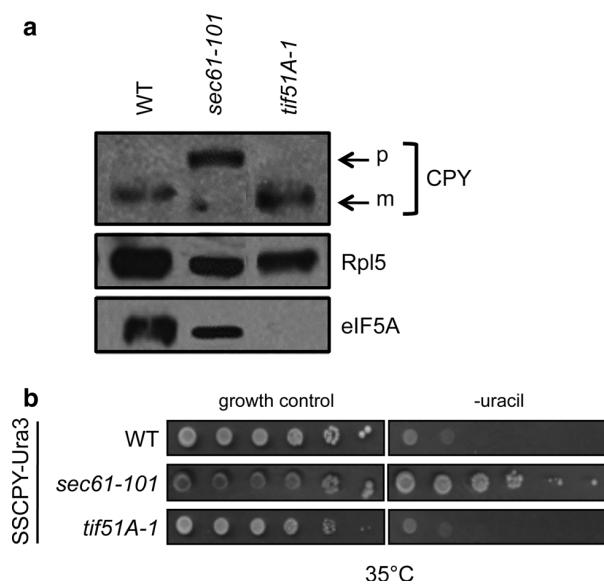


Fig. 1 eIF5A does not play a role in the posttranslational translocation of proteins into the ER. **a** The in vivo translocation of the endogenous CPY protein. The wild-type (SVL82), *sec61-101* (VZL1021) and *tif51A-1* (SVL14) strains were grown to mid-log phase at 25 °C and then shifted to the restrictive temperature (37 °C) during 3 h. Ten micrograms of total protein extract from each strain were immunoblotted with anti-CPY to detect the precursor (pCPY = 69 kDa) and the mature (mCPY = 61 kDa) forms of the protein. Anti-Rpl5 was used as a loading control. Anti-eIF5A was used to detect the protein mutant depletion under restrictive growth conditions. **b** Tenfold serial dilutions of the same strains harboring the reporter SSCPYP-Ura3 (pVZ1064) were plated onto SC-histidine (growth control) and SC-uracil to test the ability to grow due to the cytoplasmic accumulation of SSCPYP-Ura3. Both plates were incubated at semi-permissive temperature (35 °C) for 3 days

To test this possibility, we used a *tif51A-1* mutant strain, which has depleted eIF5A (Valentini et al. 2002), and reporters of protein translocation into the ER (Ng et al. 1996). Because the mechanisms governing the cotranslational and posttranslational pathways of protein translocation into the ER differ significantly, in particular the factors associated with the translational machinery, we tested reporters specific to both pathways (Ng et al. 1996).

We first investigated the posttranslational pathway using the vacuolar carboxypeptidase Y (CPY) as a reporter. The targeting of CPY to the ER occurs in a SRP-independent manner (Ng et al. 1996). CPY maturation occurs normally in wild-type cells but is abnormal in cells that exhibit a general translocation defect, such as *sec61* mutants (Stirling et al. 1992; Ng et al. 1996). As shown in Fig. 1a, the wild-type strain showed correct sorting of CPY, which undergoes proteolysis to yield its vacuolar mature form (61 kDa), consequently decreasing its molecular weight. As in the wild type, the *tif51A-1* mutant also exhibits only the mature form of CPY. On the other hand, the *sec61-101* mutant exhibits an accumulation of the precursor form of

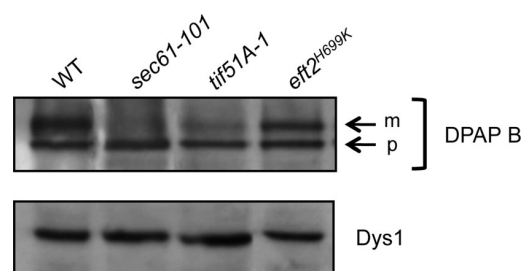


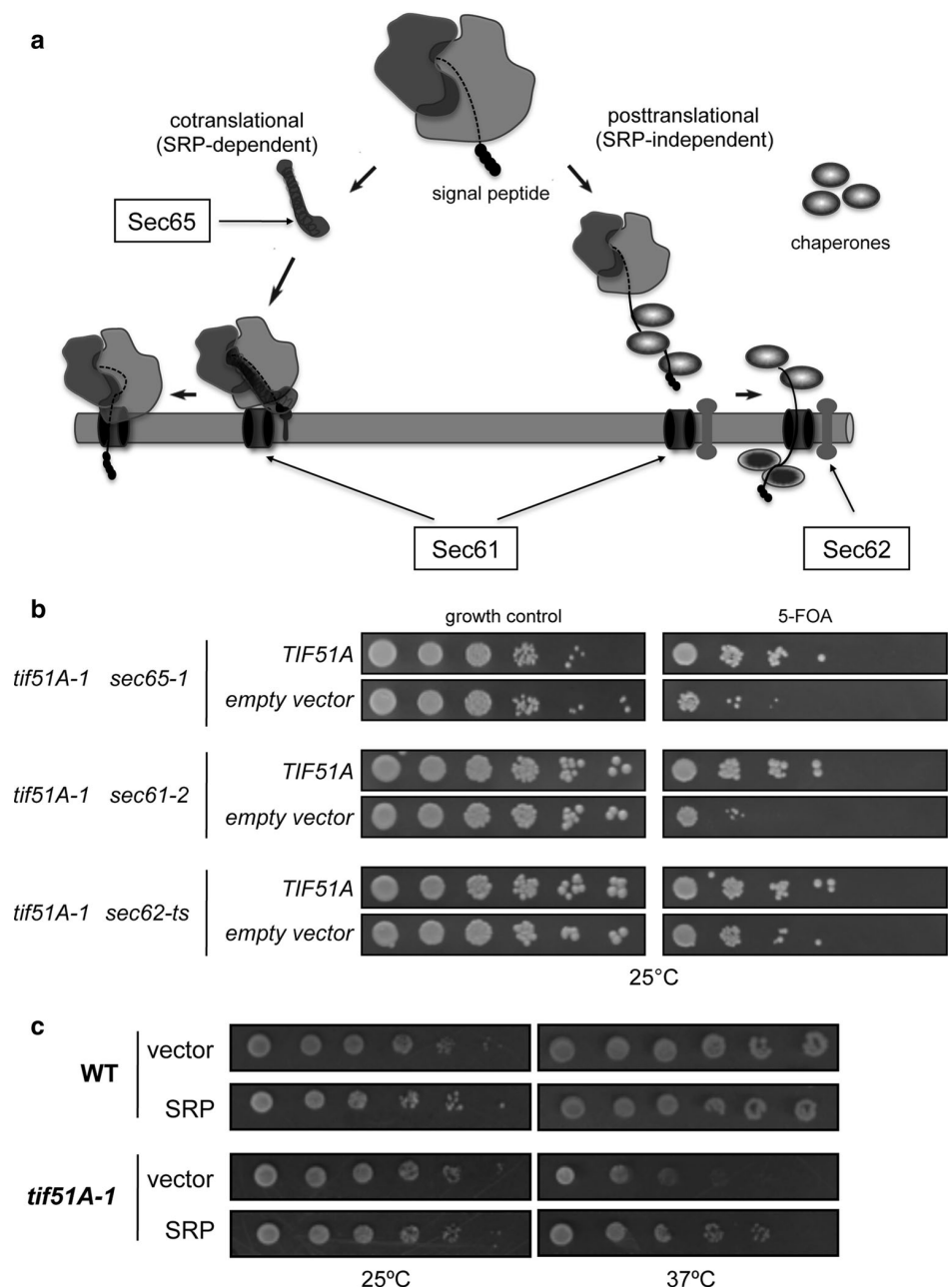
Fig. 2 eIF5A, but not eEF2, plays a role in the cotranslational translocation of proteins into the ER. The wild-type (SVL82), *sec61-101* (VZL1021), *tif51A-1* (SVL14) and *eft2^{H699K}* (SVL1292) strains, all carrying the reporter DPAP B plasmid (pVZ1110), were grown to mid-log phase at the permissive temperature (25 °C). The expression of the reporter DPAP B was induced by the addition of 2 % galactose for 3 h. For SVL14, SVL82 and VZL1021, DPAP B induction time was coincident to the shift time at the restrictive temperature, 3 h at 37 °C. The dominant-negative *eft2^{H699K}* was grown at 25 °C as translation elongation defect already occurs at this condition (Ortiz and Kinzy 2005). The total protein extract was immunoblotted using anti-6×His (DPAP B) to detect both the precursor (pDPAP B = 93 kDa) and the mature (mDPAP B = 120 kDa) forms of DPAP B. Dys1 was used as a loading control

CPY (69 kDa). These results agree with previous evidence, which indicated that different eIF5A mutants did not display defects in CPY maturation (Frigieri et al. 2008).

To extend our analysis of the potential link between eIF5A and ER-associated protein synthesis, we used a second reporter. The signal sequence of CPY was fused to the N-terminus of the entire *URA3* ORF (SSCPYP-Ura3), leading to the production of the fusion protein SSCPYP-Ura3, which is artificially targeted to the ER exclusively via the posttranslational pathway (Ng et al. 1996). In a wild-type strain, SSCPYP-Ura3 is efficiently targeted to the ER and this fusion protein cannot complement an *ura3* strain because it lacks access to its natural cytosolic substrate. In contrast, cells with a defect in the posttranslational pathway accumulate SSCPYP-Ura3 in the cytoplasm and can grow in medium without uracil. The results generated using this reporter are shown in Fig. 1b. In contrast to the *sec61-101* mutant, the eIF5A mutant *tif51A-1* expressing an SSCPYP-Ura3 reporter cannot grow in the absence of uracil, indicating that the posttranslational translocation pathway is intact in these cells. These results demonstrate that eIF5A does not play a role in the posttranslational translocation of proteins into the ER.

Next, we asked whether eIF5A is necessary for the cotranslational translocation pathway. We used the vacuolar dipeptidyl aminopeptidase B (DPAP B) as a reporter because this protein is exclusively translocated via the cotranslational SRP-dependent pathway (Ng et al. 1996). In the wild-type strain, DPAP B is targeted to the ER and undergoes several N-glycosylations, which increase its molecular weight from 93 to 120 kDa (Fig. 2). In contrast,

Fig. 3 Genetic interactions occur specifically between eIF5A and cotranslational translocation factors. **a** A simplified scheme for protein translocation into the ER via the cotranslational (SRP-dependent) and the posttranslational (SRP-independent) pathways. The proteins in the black boxes, Sec65, Sec61 and Sec62, were assayed. **b** The genetic interactions between *tif51A-1* and either *sec65-1*, *sec61-2* or *sec62-ts*. The indicated double mutant strains harboring *TIF51A* (pSV138 or pSV146) or the empty vector (pSV59 or pSV60) were plated onto SC-leu,ura (growth control) and SC+5-FOA media and grown at the permissive temperature (25 °C) for 3 days. **c** Rescue of the temperature-sensitive phenotype of the *tif51A-1* by overexpression of the SRP complex. Tenfold serial dilutions of the wild-type (SVL82) and *tif51A-1* (SVL14) strains, either harboring all of the SRP complex components (pVZ1359+pVZ1360) or harboring empty vectors (pSV364+pSV374), were plated onto SC-leu,ura and grown at both the permissive (25 °C) and the restrictive temperatures (37 °C) for 3 days



in the *sec61-101* mutant, the targeting of DPAP B to the ER is inefficient, and no mature form of the protein is observed (Fig. 2). The eIF5A mutant *tif51A-1* showed a defect in maturation of DPAP B, comparable to that seen in the *sec61-101* mutant (Fig. 2). Considering that the CPY targeting is correct in the *tif51A-1* mutant, these results suggest that eIF5A function is necessary specifically for the cotranslational translocation of proteins into the ER.

Since cotranslational translocation is coordinated with the elongation step of protein synthesis (Mason et al. 2000; Brodsky 1998) and because eIF5A mutants show a general

defect in translation elongation, we next tested whether another translation elongation mutant might also display a defect in the cotranslational translocation pathway. We used DPAP B to assess the translocation abilities of a strain harboring the elongation factor 2 (eEF2) dominant-negative mutant *efl2^{H699K}*. The protein eEF2 is a canonical translation elongation factor, and the *efl2^{H699K}* mutant strain exhibits impaired elongation of polypeptides during protein synthesis, a phenotype shared with eIF5A mutants (Dias et al. 2008, 2012; Gregio et al. 2009). As observed in the right-most lane of Fig. 2, similarly to wild-type cell,

DPAP B is correctly targeted to the ER in the *eft2^{H699K}* mutant. This result strongly suggests that the involvement of eIF5A in the cotranslational translocation pathway is specific and not merely a consequence of a general block in the elongation step of protein synthesis.

eIF5A interacts genetically only with factors in the cotranslational translocation pathway

To confirm the functional relevance of eIF5A for the cellular secretory pathway, we searched for genetic interactions between eIF5A and translocation factors. As depicted in Fig. 3a, we chose the genes of factors that are essential for the cotranslational translocation pathway (*SEC65*) or for the posttranslational pathway (*SEC62*) and the primary translocon component (*SEC61*), which is essential for both pathways.

We first tested the effect of combining mutants of the translocation factors described above and the eIF5A mutant *tif51A-1* in a single haploid strain. Interestingly, we observed a growth defect at the permissive temperature (25 °C) in the double mutant strains carrying *tif51A-1* and either *sec65-1* or *sec61-2* (empty vector), but no defect was noticed in the double mutant *tif51A-1 sec62-ts* (empty vector), when compared to the wild type (*TIF51A*). This genetic assay shows a synthetic sick genetic interaction only between *tif51A-1* and the mutants affecting the cotranslational pathway, *sec65-1* and *sec61-2* (Fig. 3b).

In cotranslational targeting, binding of SRP to the signal peptide is a limiting step. Because of this fact, and because of the greater quantity of ribosomes in a cell than SRPs (Ogg and Walter 1995), we next tested whether an overexpression of genes coding for all SRP components would rescue the growth defect of the *tif51A-1* mutant at the restrictive temperature. As shown in Fig. 3c, the overexpression of SRP does cause a partial rescue of the growth defect.

Together, these results further support the idea that the function of eIF5A is important for the cotranslational targeting of proteins to the ER.

Blocking eIF5A activation increases the levels of stress-induced chaperones

The functional correlations between eIF5A and the cotranslational pathway described herein are very similar to those reported for Rpl25-GFP. The ribosomal protein L25 (Rpl25) is an important mediator of the ribosome interaction with SRP (Halic et al. 2004, 2006), and a strain expressing an Rpl25-GFP fusion protein has defects in the cotranslational translocation but not in the posttranslational pathway (Dalley et al. 2008). In addition, some stress-induced chaperones are up-regulated in the Rpl25-GFP

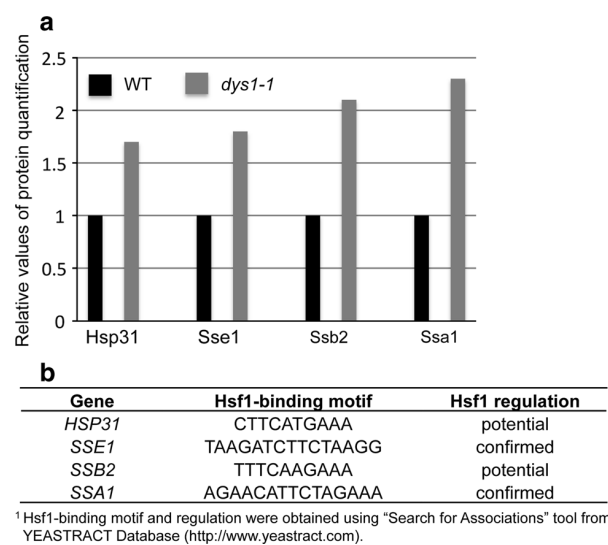


Fig. 4 Loss of eIF5A function causes the up-regulation of stress-induced chaperones. **a** Differentially expressed chaperones identified by mass spectrometry in 2D-DIGE proteomic maps of *dys1-1* mutant (SVL614) compared to its isogenic wild-type strain (SVL613) after growth at 25 °C. Each bar represents relative staining intensities of chaperones Hsp31, Sse1, Ssb2 and Ssa1 from 2D-gels of biological triplicates (data not shown). **b** The genes encoding the same up-regulated chaperones are transcriptionally regulated by the transcription factor Hsf1, according to the confirmed or potential motifs indicated (YEASTRACT Database)

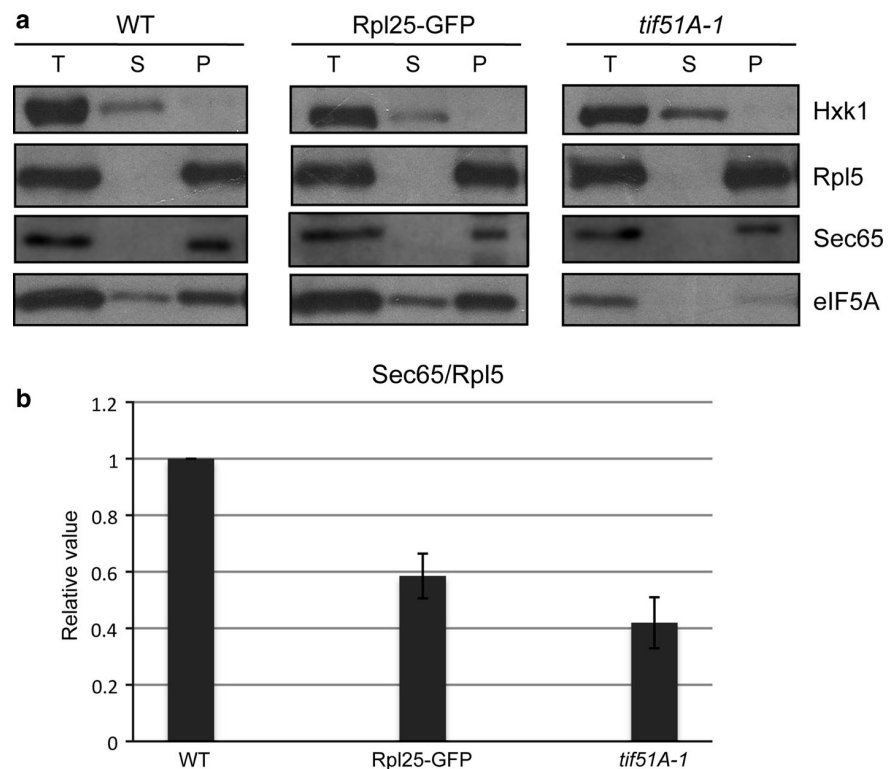
strain (Dalley et al. 2008), a phenotype reminiscent of SRP dysfunction in the cell (Arnold and Wittrup 1994; Mutka and Walter 2001). To verify if the loss of function of eIF5A also triggers an up-regulation of stress-induced chaperones, we looked for these proteins in 2D gel-based proteomic maps of eIF5A-defective mutants (data not shown). However, the eIF5A mutants described so far need a temperature shift to exhibit the defect in eIF5A function, which also induces heat-shock responses and alters the expression of chaperones, compromising this analysis. Instead, we used the deoxyhypusine synthase mutant *dys1-1*, which shows a 60 % reduction in hypusine-containing eIF5A at permissive temperature. Besides, even under permissive growth condition (25 °C), the *dys1-1* mutant shows defects of translation (total protein synthesis and polysome profile) that are identical to the eIF5A mutants at their restrictive temperature (Galvão et al. 2013).

Among the five chaperones identified in our 2D-DIGE experiments, we found that the stress-induced chaperones Hsp31, Sse1, Ssb2 and Ssa1 were up-regulated in the *dys1-1* mutant when compared to the wild type (Fig. 4a). Stress-induced chaperones become up-regulated in response to the accumulation of unfolded proteins in the cytosol, and the Hsf1 transcription factor is determinant for their induction (Sorger 1991; Albanèse et al. 2006). Figure 4b shows the information on Hsf1 regulation as well as the Hsf1-binding

Fig. 5 eIF5A is important to the binding of the ribosome-nascent chain complex to SRP.

a The wild-type (SVL82), Rpl25-GFP (VZL1246) and *tif51A-1* (SVL14) strains were grown to mid-log phase at the permissive temperature (25 °C) and then shifted to 37 °C for 3 h. The total extract (T), supernatant (S) and pellet (P) from a

256,000×g centrifugation were immunoblotted against Hxk1, Rpl5, Sec65 and eIF5A using specific polyclonal antibodies. **b** The quantification of the Sec65 present in the ribosome-enriched fraction (P) normalized by the ribosomal protein Rpl5. The graph represents the relative values of Sec65/Rpl5 obtained from independent replicates, assuming the wild-type strain to have a value of 1



motifs that are present in the promoters of the genes coding for Hsp31, Sse1, Ssb2 and Ssa1. Therefore, our results examining stress-induced chaperones in the eIF5A mutant are also very similar to those observed for the Rpl25-GFP strain (Dalley et al. 2008) and SRP mutants (Arnold and Wittrup 1994; Mutka and Walter 2001), and they again support the concept that eIF5A functions during the cotranslational targeting of proteins to the ER.

eIF5A is important for the binding of SRP to the ribosome-nascent chain complex

Because eIF5A binds to ribosomes and has an essential function during translation elongation (Zanelli et al. 2006; Jao and Chen 2006; Gregio et al. 2009; Saini et al. 2009), we also tested whether eIF5A depletion interferes with the binding of ribosome to SRP. We used a strategy of ultracentrifugation to purify the ribosomes, which allows for the co-purification of bound SRP (Frey et al. 2001; Dalley et al. 2008). For this experiment, we also included Rpl25-GFP, which has decreased association of ribosomes with SRPs (Dalley et al. 2008). Therefore, the total cell extracts (T) were separated into postribosomal supernatants (S) and ribosomal pellet fractions (P) by ultracentrifugation. The quantity of purified complexes was detected by blotting the ribosomal protein L5 (Rpl5) and the SRP subunit Sec65. Samples were also blotted for the cytosolic hexokinase

Hxk1 and eIF5A. As shown in Fig. 5a, all pellet fractions (P) contained ribosomes (Rpl5) and SRP (Sec65) complexes, which were absent in the supernatant fractions (S). On the other hand, Hxk1 was present only in the S fractions, as expected. The depletion of eIF5A in the *tif51A-1* mutant was also seen in all fractions, compared to the wild-type strain (Fig. 5a). Because the presence of Sec65 in the P fractions is dependent on ribosome precipitation, we quantified and normalized the amount of Sec65 relative to Rpl5 (Fig. 5b). In comparison to the wild-type strain, we observed the known defect in the Rpl25-GFP strain in the binding of RNCs to SRPs (Dalley et al. 2008). Similarly, the eIF5A mutant *tif51A-1* demonstrated a decreased association between ribosomes and SRPs.

These results are consistent with the defects observed in the cotranslational translocation pathway of eIF5A mutants and with the genetic interactions between eIF5A and cotranslational translocation factors. Furthermore, our data suggest that the primary function of eIF5A in the translocation of proteins during translation is the efficiency of binding of SRP to elongating ribosomes.

To our knowledge, this is the first study showing that a translation factor has been directly linked with the function of SRP in targeting the RNC to the ER. Additionally, this discovered link between the function of eIF5A in the ribosome and SRP binding to the RNC supports the hypothesis that eIF5A acts differentially in the translation

of a specific subset of mRNAs, although the loss of eIF5A function ultimately induces general defects in translation elongation (Zanelli and Valentini 2007; Park et al. 2010).

It is important to note that the eIF5A structural homolog EF-P has recently been shown to function preferentially in the translation of proteins containing poly-proline tracts and other amino acid motifs, such as YIRYIR (Ude et al. 2013; Doerfel et al. 2013; Hersch et al. 2013). However, not all of the proteins containing these motifs are decreased in a *Salmonella* strain deficient in EF-P, suggesting that the role EF-P plays in the translation of specific proteins is more complex than was initially determined by an analysis of poly-proline tracts (Hersch et al. 2013). Interestingly, several proteins identified as more dependent on EF-P for their translation are related to membrane integrity and motility (Bullwinkle et al. 2012; Hersch et al. 2013), which require a number of proteins that are translocated in an SRP-dependent manner (Zhang et al. 2012). It remains to be determined whether eIF5A also affects translation in an amino acid tract-dependent manner similarly to EF-P and whether this is correlated with SRP-dependent translation.

Acknowledgments We are grateful to Colin Stirling (University of Newcastle, Newcastle, United Kingdom), Martin Pool (Faculty of Life Sciences, University of Manchester, Manchester, United Kingdom) and Davis Ng (Biological Science, National University of Singapore, Singapore) for their generous gifts of strains, plasmids, and antibodies. This work was supported by grants to S R V and C F Z from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and PADC from the Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP. We also thank the FAPESP for fellowships awarded to most of the authors.

Conflict of interest We declare that we have no conflict of interest.

References

- Albanèse V, Yam AY, Baughman J, Parnot C, Frydman J (2006) Systems analyses reveal two chaperone networks with distinct functions in eukaryotic cells. *Cell* 124(1):75–88. doi:10.1016/j.cell.2005.11.039
- Arnold CE, Wittrup KD (1994) The stress response to loss of signal recognition particle function in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 269(48):30412–30418
- Bailly M, de Crécy-Lagard V (2010) Predicting the pathway involved in post-translational modification of elongation factor P in a subset of bacterial species. *Biol Direct* 5:3. doi:10.1186/1745-6150-5-3
- Benne R, Hershey JW (1978) The mechanism of action of protein synthesis initiation factors from rabbit reticulocytes. *J Biol Chem* 253(9):3078–3087
- Brodsky JL (1998) Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. *Int Rev Cytol* 178:277–328
- Bullwinkle TJ, Zou SB, Rajkovic A, Hersch SJ, Elgamal S, Robinson N, Smil D, Bolshan Y, Navarre WW, Ibba M (2012) (R)- β -lysine modified elongation factor P functions in translation elongation. *J Biol Chem*. doi:10.1074/jbc.M112.438879
- Chen KY, Liu AY (1997) Biochemistry and function of hypusine formation on eukaryotic initiation factor 5A. *Biol Signals* 6(3):105–109
- Dalley JA, Selkirk A, Pool MR (2008) Access to ribosomal protein Rpl25p by the signal recognition particle is required for efficient cotranslational translocation. *Mol Biol Cell* 19(7):2876–2884
- Dias CA, Cano VS, Rangel SM, Apponi LH, Frigieri MC, Muniz JR, Garcia W, Park MH, Garratt RC, Zanelli CF, Valentini SR (2008) 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(8):1874–1888
- Dias CA, Gregio AP, Rossi D, Galvão FC, Watanabe TF, Park MH, Valentini SR, Zanelli CF (2012) eIF5A interacts functionally with eEF2. *Amino Acids* 42(2–3):697–702. doi:10.1007/s00726-011-0985-0
- Dias CA, Garcia W, Zanelli CF, Valentini SR (2013) eIF5A dimerizes not only in vitro but also in vivo and its molecular envelope is similar to the EF-P monomer. *Amino Acids* 44(2):631–644. doi:10.1007/s00726-012-1387-7
- Doerfel LK, Wohlgemuth I, Kothe C, Peske F, Urlaub H, Rodnina MV (2013) EF-P is essential for rapid synthesis of proteins containing consecutive proline residues. *Science* 339(6115):85–88. doi:10.1126/science.1229017
- Frey S, Pool M, Seedorf M (2001) Scp160p, an RNA-binding, polysome-associated protein, localizes to the endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae* in a microtubule-dependent manner. *J Biol Chem* 276(19):15905–15912
- Frigieri MC, Thompson GM, Pandolfi JR, Zanelli CF, Valentini SR (2007) Use of a synthetic lethal screen to identify genes related to TIF51A in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genet Mol Res* 6(1):152–165
- Frigieri MC, Joao Luiz MV, Apponi LH, Zanelli CF, Valentini SR (2008) Synthetic lethality between eIF5A and Ypt1 reveals a connection between translation and the secretory pathway in yeast. *Mol Genet Genomics* 280(3):211–221
- Galvão FC, Rossi D, Silveira Wa S, Valentini SR, Zanelli CF (2013) The deoxyhypusine synthase mutant dys1-1 reveals the association of eIF5A and Asc1 with cell wall integrity. *PLoS One* 8(4):e60140. doi:10.1371/journal.pone.0060140
- Gregio AP, Cano VP, Avaca JS, Valentini SR, Zanelli CF (2009) eIF5A has a function in the elongation step of translation in yeast. *Biochem Biophys Res Commun* 380(4):785–790
- Guthrie C, Fink GR (1991) Guide to yeast genetics. Academic Press, New York
- Halic M, Becker T, Pool MR, Spahn CM, Grassucci RA, Frank J, Beckmann R (2004) Structure of the signal recognition particle interacting with the elongation-arrested ribosome. *Nature* 427(6977):808–814. doi:10.1038/nature02342
- Halic M, Gartmann M, Schlenker O, Mielke T, Pool MR, Sinning I, Beckmann R (2006) Signal recognition particle receptor exposes the ribosomal translocon binding site. *Science* 312(5774):745–747
- Hersch SJ, Wang M, Zou SB, Moon KM, Foster LJ, Ibba M, Navarre WW (2013) Divergent protein motifs direct elongation factor P-mediated translational regulation in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*. *MBio* 4(2):e00180–13. doi:10.1128/mBio.00180-13
- Jao DL, Chen KY (2006) Tandem affinity purification revealed the hypusine-dependent binding of eukaryotic initiation factor 5A to the translating 80S ribosomal complex. *J Cell Biochem* 97(3):583–598
- Li Z, Vizeacoumar FJ, Bahr S, Li J, Warringer J, Vizeacoumar FS, Min R, Vandersluis B, Bellay J, Devit M, Fleming JA, Stephens

- A, Haase J, Lin ZY, Baryshnikova A, Lu H, Yan Z, Jin K, Barker S, Datti A, Giaever G, Nislow C, Bulawa C, Myers CL, Costanzo M, Gingras AC, Zhang Z, Blomberg A, Bloom K, Andrews B, Boone C (2011) Systematic exploration of essential yeast gene function with temperature-sensitive mutants. *Nat Biotechnol* 29(4):361–367. doi:[10.1038/nbt.1832](https://doi.org/10.1038/nbt.1832)
- Lorsch J (ed) (2007) Translation Initiation: Extract systems and molecular genetics. In: *Methods in enzymology*, vol 429. Elsevier, San Diego, CA
- Marra M, Agostinelli E, Tempera G, Lombardi A, Meo G, Budillon A, Abbruzzese A, Giuberti G, Caraglia M (2007) Anticancer drugs and hyperthermia enhance cytotoxicity induced by polyamine enzymatic oxidation products. *Amino Acids* 33(2):273–281
- Mason N, Ciufo LF, Brown JD (2000) Elongation arrest is a physiologically important function of signal recognition particle. *EMBO J* 19(15):4164–4174
- Mutka SC, Walter P (2001) Multifaceted physiological response allows yeast to adapt to the loss of the signal recognition particle-dependent protein-targeting pathway. *Mol Biol Cell* 12(3):577–588
- Navarre WW, Zou SB, Roy H, Xie JL, Savchenko A, Singer A, Edvokimova E, Prost LR, Kumar R, Ibba M, Fang FC (2010) PoxA, yjeK, and elongation factor P coordinately modulate virulence and drug resistance in *Salmonella enterica*. *Mol Cell* 39(2):209–221. doi:[10.1016/j.molcel.2010.06.021](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.06.021)
- Ng DT, Brown JD, Walter P (1996) Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol* 134(2):269–278
- Ogg SC, Walter P (1995) SRP samples nascent chains for the presence of signal sequences by interacting with ribosomes at a discrete step during translation elongation. *Cell* 81(7):1075–1084
- Ortiz PA, Kinzy TG (2005) Dominant-negative mutant phenotypes and the regulation of translation elongation factor 2 levels in yeast. *Nucleic Acids Res* 33(18):5740–5748
- Park MH, Nishimura K, Zanelli CF, Valentini SR (2010) Functional significance of eIF5A and its hypusine modification in eukaryotes. *Amino Acids* 38(2):491–500. doi:[10.1007/s00726-009-0408-7](https://doi.org/10.1007/s00726-009-0408-7)
- Park JH, Johansson HE, Aoki H, Huang BX, Kim HY, Ganoza MC, Park MH (2012) Post-translational modification by β -lysylation is required for activity of *Escherichia coli* elongation factor P (EF-P). *J Biol Chem* 287(4):2579–2590. doi:[10.1074/jbc.M111.309633](https://doi.org/10.1074/jbc.M111.309633)
- Roy H, Zou SB, Bullwinkle TJ, Wolfe BS, Gilreath MS, Forsyth CJ, Navarre WW, Ibba M (2011) The tRNA synthetase paralog PoxA modifies elongation factor-P with (R)- β -lysine. *Nat Chem Biol* 7(10):667–669. doi:[10.1038/nchembio.632](https://doi.org/10.1038/nchembio.632)
- Saini P, Eyler DE, Green R, Dever TE (2009) Hypusine-containing protein eIF5A promotes translation elongation. *Nature* 459(7243):118–121
- Schnier J, Schwelberger HG, Smit-McBride Z, Kang HA, Hershey JW (1991) Translation initiation factor 5A and its hypusine modification are essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 11(6):3105–3114
- Segev N (2001) Ypt/rab gtpases: regulators of protein trafficking. *Sci STKE* 2001 (100):RE11
- Sorger PK (1991) Heat shock factor and the heat shock response. *Cell* 65(3):363–366
- Stirling CJ, Rothblatt J, Hosobuchi M, Deshaies R, Schekman R (1992) Protein translocation mutants defective in the insertion of integral membrane proteins into the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* 3(2):129–142
- Ude S, Lassak J, Starosta AL, Kraxenberger T, Wilson DN, Jung K (2013) Translation elongation factor EF-P alleviates ribosome stalling at polyproline stretches. *Science* 339(6115):82–85. doi:[10.1126/science.1228985](https://doi.org/10.1126/science.1228985)
- Valentini SR, Casolari JM, Oliveira CC, Silver PA, McBride AE (2002) Genetic interactions of yeast eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) reveal connections to poly (A)-binding protein and protein kinase C signaling. *Genetics* 160(2):393–405
- Yanagisawa T, Sumida T, Ishii R, Takemoto C, Yokoyama S (2010) A paralog of lysyl-tRNA synthetase aminoacylates a conserved lysine residue in translation elongation factor P. *Nat Struct Mol Biol* 17(9):1136–1143. doi:[10.1038/nsmb.1889](https://doi.org/10.1038/nsmb.1889)
- Zanelli CF, Valentini SR (2005) Pkc1 acts through Zds1 and Gic1 to suppress growth and cell polarity defects of a yeast eIF5A mutant. *Genetics* 171(4):1571–1581
- Zanelli CF, Valentini S (2007) Is there a role for eIF5A in translation? *Amino Acids* 33(2):351–358
- Zanelli CF, Maragno AL, Gregio AP, Komili S, Pandolfi JR, Mestriner CA, Lustri WR, Valentini SR (2006) eIF5A binds to translational machinery components and affects translation in yeast. *Biochem Biophys Res Commun* 348(4):1358–1366
- Zhang D, Sweredoski MJ, Graham RL, Hess S, Shan SO (2012) Novel proteomic tools reveal essential roles of SRP and importance of proper membrane protein biogenesis. *Mol Cell Proteomics* 11(2):M111.011585. doi:[10.1074/mcp.M111.011585](https://doi.org/10.1074/mcp.M111.011585)