

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 22/02/2017.

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
<i>Capítulo 2 (Artigos e manuscritos relacionados a este trabalho)</i>	<i>92</i>

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).

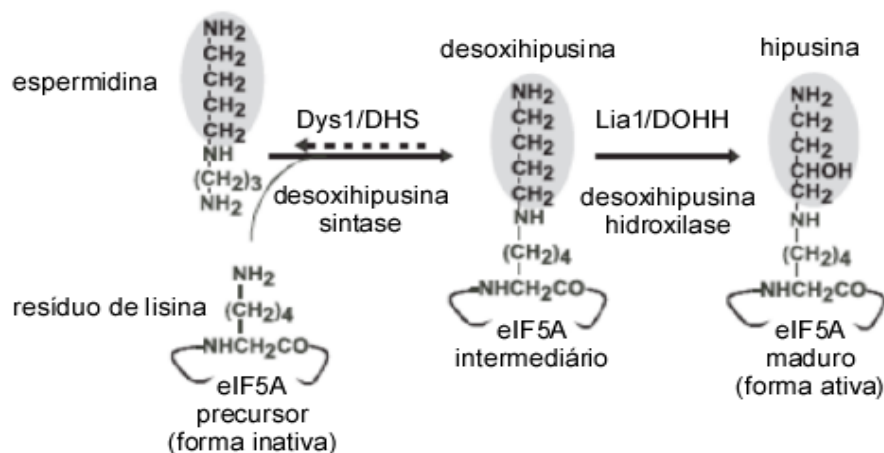


Figura 1. Via de biossíntese do resíduo de aminoácido hipusina no precursor de eIF5A. Esquema simplificado da modificação pós-traducional de eIF5A. A porção 4-aminobutil proveniente da poliamina espermidina está sombreada e é transferida ao resíduo de lisina do precursor inativo de eIF5A por meio da 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).

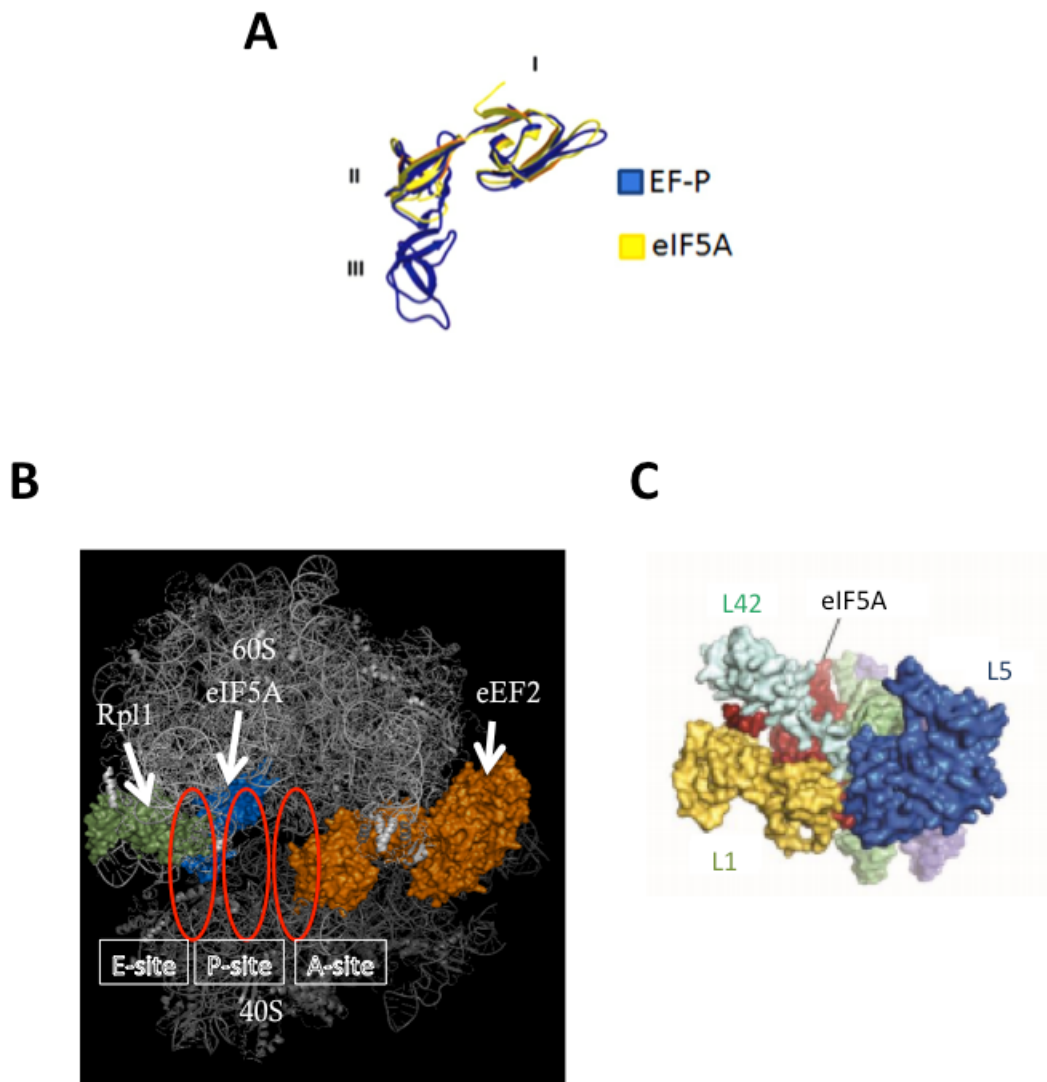


Figura 2. Estrutura da proteína eIF5A e sua localização no ribossomo 80S de levedura. **(A)** Estrutura de eIF5A (amarelo) mostrando os domínios N-terminal (domínio I) e C-terminal (domínio II) em sobreposição com os domínios I e II da estrutura de EF-P (azul) (Hanawa-Suetsugu *et al.* 2004). **(B)** 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 *halfmers* (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)

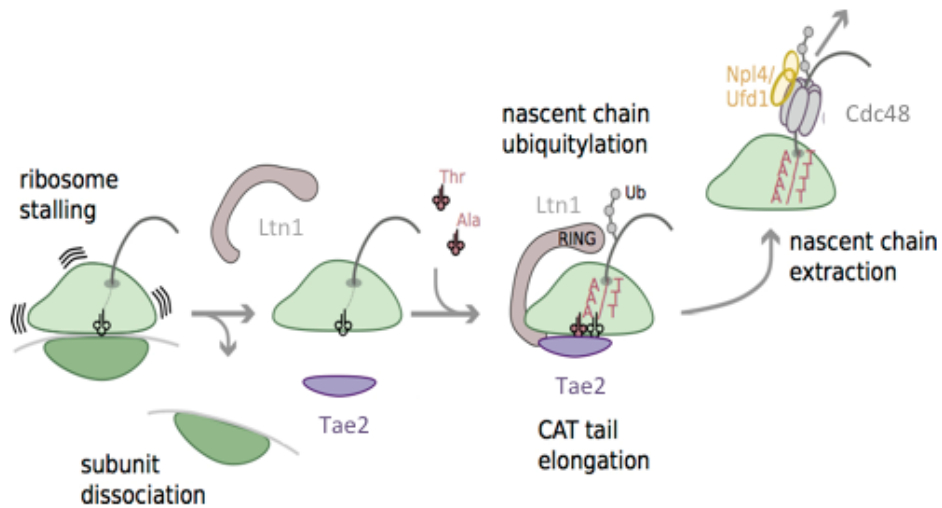


Figura 3- Modelo de funcionamento do complexo RQC. Após ocorrer a parada na tradução do 80S, a subunidade 40S se dissocia. Ltn1 e Tae2 reconhecem uma sinalização do complexo peptídeo nascente - tRNA - 60S e ligam-se na subunidade 60S com a função de ubiquitinar (Ub) o peptídeo nascente que emerge no 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).

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.