Hermano Martins Bellato

<u>Análise do envolvimento do Fator de Início de Tradução de Eucariotos 5A (eIF5A) na</u> <u>translocação de proteínas para o Retículo Endoplasmático em *Saccharomyces cerevisiae*.</u>

Araraquara 2013

Hermano Martins Bellato

<u>Análise do envolvimento do Fator de Início de Tradução de Eucariotos 5A (eIF5A) na</u> translocação de proteínas para o Retículo Endoplasmático em *Saccharomyces cerevisiae*.

> Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", para obtenção do grau de Farmacêutico -Bioquímico.

Orientador: Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini

Araraquara 2013 Dizem que amamos verdadeiramente alguém pela tormenta que essa pessoa nos causa ou pela tranquilidade e segurança que gera em nossos corações... Dedico esse trabalho a única pessoa que amo pelos dois caminhos: minha mãe!

AGRADECIMENTOS

Sem Deus jamais teria o equilíbrio necessário para nunca ter desistido...

Aos meus pais, pelo apoio financeiro... A minha mãe, por termos aprendido tanto nos últimos anos.

Aos professores Dr. Sandro Roberto Valentini e Dr. Cleslei Fernando Zanelli pela oportunidade singular, fundamental para o meu desenvolvimento acadêmico.

A Danuza Rossi, que ao longo dos anos se tornou uma irmã para a vida toda.

Aos amigos:

Larissa Loyolla e Priscila Malaguti... O apoio de vocês foi essencial antes de entrar na faculdade e durante toda essa jornada.

Laura e Diana... tornaram o caminho mais suave e mais seguro e nos tornamos um grupo. Alice Haddad e Amanda Saraiva... me proporcionaram o conforto de serem sempre constantes e sempre lembraram de mim.

Camila e Polyanna... foram uma surpresa no final da minha graduação. Alexandre... por me ajudar prontamente sempre que necessário, não somente profissional, como também pessoalmente.

Carol Viana... por grandes conselhos.

Julia, Isabel e Amanda... por sempre me mostrarem que boas risadas tornam a pesquisa mais gostosa.

A todo o grupo BiomolVZ, por terem me recebido por tanto tempo e contribuído de forma significativa com o meu amadurecimento como pessoa e como futuro pesquisador.

A FCFAr, ao CNPq e a FAPESP, pelo apoio institucional e financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

Nada é mais belo em uma vida toda do que ter conhecido um grande amor, mesmo que não seja para sempre...

"Quando encontrar alguém e esse alguém fizer seu coração parar de funcionar por alguns segundos, preste atenção. Pode ser a pessoa mais importante da sua vida. Se os olhares se cruzarem e neste momento houver o mesmo brilho intenso entre eles, fique alerta: pode ser a pessoa que você está esperando desde o dia em que nasceu. Se o toque dos lábios for intenso, se o beijo for apaixonante e os olhos encherem d'água neste momento, perceba: existe algo mágico entre vocês. Se o primeiro e o último pensamento do dia for essa pessoa, se a vontade de ficar juntos chegar a apertar o coração, agradeça: Deus te mandou um presente divino: o amor. Se um dia tiver que pedir perdão um ao outro por algum motivo e em troca receber um abraço, um sorriso, um afago nos cabelos e os gestos valerem mais que mil palavras, entregue-se: vocês foram feitos um pro outro. Se por algum motivo você estiver triste, se a vida te deu uma rasteira e a outra pessoa sofrer o seu sofrimento, chorar as suas lágrimas e enxugá-las com ternura, que coisa maravilhosa: você poderá contar com ela em qualquer momento de sua vida. Se você conseguir em pensamento sentir o cheiro da pessoa como se ela estivesse ali do seu lado... se você achar a pessoa maravilhosamente linda, mesmo ela estando de pijamas velhos, chinelos de dedo e cabelos emaranhados... Se você não consegue trabalhar direito o dia todo, ansioso pelo encontro que está marcado para a noite... se você não consegue imaginar, de maneira nenhuma, um futuro sem a pessoa ao seu lado...Se você tiver a certeza que vai ver a pessoa envelhecendo e, mesmo assim, tiver a convicção que vai continuar sendo louco por ela... se você preferir morrer antes de ver a outra partindo: é o amor que chegou na sua vida. É uma dádiva. Muitas pessoas apaixonam-se muitas vezes na vida, mas poucas amam ou encontram um amor verdadeiro. Ou às vezes encontram e por não prestarem atenção nesses sinais, deixam o amor passar, sem deixá-lo acontecer verdadeiramente. É o livre-arbítrio. Por isso preste atenção nos sinais, não deixe que as loucuras do dia a dia o deixem cego para a melhor coisa da vida: o amor." – É, eu encontrei o amor...

- Carlos Drummond de Andrade

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	OBJETIVO	22
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	23
	3.1. Transformação bacteriana pelo método físico	24
	3.1.1. Preparo de <i>E. coli</i> competente	24
	3.1.2. Transformação	25
	3.2. Transformação bacteriana por corrente elétrica	25
	3.2.1.Preparo de <i>E. coli</i> eletrocompetente	25
	3.2.2. Eletroporação	25
	3.3. Preparo de plasmídeos a partir de E. coli em pequena escala – Miniprep (lise	
	alcalina)	26
	3.4. Transformação de leveduras	26
	3.5. Cruzamento e esporulação de leveduras	27
	3.5.1. Cruzamento	27
	3.5.2. Esporulação	27
	3.5.3. Dissecção de tétrades e caracterização de haplóides	28
	3.6. Teste de sensibilidade a temperatura	28
	3.7. Extração de DNA genômico de levedura	29
	3.8. Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)	30
	3.9. Western Blot	

30

4. **RESULTADOS**

4.1. Interações genéticas entre TIF51A e genes que codificam diferentes proteínas da via		
secretória.	31	
4.2. Avaliação de possíveis defeitos na translocação de proteínas pela via p	ós-traducional	
em mutantes de eIF5A.	39	
4.3. Avaliação do impacto de mutantes de eIF5A na via co-traducional.	44	
4.4. Análise genética entre o mutante srp102 ^{K511} e TIF51A.	48	
4.5. Análises genéticas entre o mutante tif51A-3 e fatores do translocon de v	via co-	
traducional	51	
5. CONCLUSÕES	57	
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58	
7. ANEXO I	60	

RESUMO

O fator de início de tradução 5A (eIF5A) é altamente conservado em argueas e em eucariotos e sofre uma modificação pós-traducional única e essencial chamada hipusinação. Este fator já foi relacionado com início de tradução, transporte nucleocitoplasmático, decaimento de mRNA e proliferação celular. Entretanto, resultados recentes colocam essa proteína novamente no cenário da síntese proteica, mais especificamente na etapa de elongação da tradução. Estudos que relacionam eIF5A com proliferação celular e transição G1/S do ciclo celular sugerem seu envolvimento com tradução específica de proteínas que atuam na progressão do ciclo celular. Interessantemente, resultados em nosso laboratório demonstram, por letalidade sintética, uma interação entre eIF5A e Ypt1 (Yeast Protein Transport 1). Isso sugere uma possível atividade na secreção, mais precisamente na translocação de proteínas para o Retículo Endoplasmático (RE), que representa a etapa em que tradução e via secretória se conectam. No intuito de avaliar a hipótese da participação de eIF5A na tradução de um subgrupo específico de mRNAs, envolvidos na via secretória e proliferação celular, este trabalho estudou o envolvimento deste fator na translocação de proteínas para o RE, usando a levedura Saccharomyces cerevisiae como organismo modelo. Os resultados revelam que eIF5A interage, de uma forma inespecífica, em diferentes etapas da via secretória. Também que eIF5A não atua na via pós- traducional, porém sugere que desempenhe um papel na translocação pela via co-traducional. Com esse estudo será possível um melhor entendimento sobre o papel de eIF5A e os processos proliferativos da célula.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da biossíntese do resíduo de hipusina no precursor de eIF5A.	18
Figura 2. Representação esquemática da translocação de proteínas para o retículo	
endoplasmático (RE) pela via pós-traducional.	19
Figura 3. Esquema representativo do complexo Signal Recognition Particle (SRP) de S	5.
Cerevisiae.	20
Figura 4. Representação esquemática da translocação de proteínas para o retículo	
endoplasmático (RE) pela via co-traducional.	21
Figura 5. Interações genéticas entre eIF5A e proteínas de diversas etapas da via-	
secretória.	35
Figura 6. Análise da interação genética entre o mutante <i>tif51A-3</i> e o <i>Asnc2</i> na presença	ł
de SSD1.	36
Figura 7. Supressão do fenótipo de defeito de crescimento do mutante sec2-41.	37
Figura 8. Supressão do fenótipo de defeito de crescimento do mutante <i>tif51A-3</i> por	
superexpressão de <i>MSB3</i> e <i>MSB4</i> .	38
Figura 9. Avaliação de defeitos na via pós-traducional através do acúmulo da forma	
precursora de CPY.	41
Figura 10. Esquema de funcionamento do repórter SS-ura3.	42
Figura 11. Ensaio evidenciando o não envolvimento de eIF5A na via pós-traducional.	43
Figura 12. Esquema do funcionamento do repórter DAP2.	46
Figura 13. Ensaio de translocação de DPAP B em mutantes de eIF5A.	47
Figura 14. Análise da interação genética entre o mutante tif51A-3 e o mutante	
<i>srp102^{K511}.</i>	49
Figura 15. Alinhamento das sequências primárias de Sec61 e Ssh1.	53

Figura 16. Análise da interação genética entre o mutante <i>tif51A-3</i> e <i>Assh1</i> .	54
Figura 17. Análise da interação genética entre o mutante <i>tif51A-3</i> e <i>Asbh1</i>.	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Linhagens utilizadas nos experimentos deste trabalho.	23
Tabela 2. Plasmídeos utilizados nos experimentos deste trabalho.	23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

micrograma
miligrama
grama
microlitro
mililitro
nanômetro
milimolar
molar
unidade de atividade enzimática
ácido desoxirribonucléico
ácido ribonucléico
RNA mensageiro
desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP)
densidade óptica a 600nm
ácido etilenodiaminotetracético
quilodalton
meio Luria-Bertani
"yeast extract, peptone, dextrose" (meio rico para levedura)
meio sintético completo para levedura
polietilenoglicol
potencial hidrogeniônico

SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
SDS	dodecil sulfato de sódio
S-SPO	"super-sporulation media" (meio para esporulação de levedura)
TE	tampão Tris-EDTA
Tris	tris-hidroximetilaminometano
Triton X-100	polietilenoglicol-terc-octilfenil eter
Tween 20	monolaurato de polietilenoglicol-sorbitana
xg	aceleração gravitacional
kb	kilobase
pb	pares de base
h	hora
min	minuto
UV	ultravioleta
PBS	"phosfate buffered saline" (solução salina tamponada com fosfato)
PBST	PBS com Tween 20
V	volt
\mathbf{V}/\mathbf{V}	relação volume/volume
rpm	rotações por minuto
kV	quilovolt
Ω	ohm
μF	microfaraday

1. INTRODUÇÃO

O fator de início de tradução de eucariotos 5A (eIF5A) é uma proteína pequena, de aproximadamente 17 kDa, e presente tanto em eucariotos quanto em arqueas, mas não em bactérias (PARK et al. 1993a; PARK et al. 1997; KLIER et al. 1993). É uma proteína essencial em todos os organismos testados e altamente conservada evolutivamente (PARK et al. 1993a; PARK et al. 1997). Em Saccharomyces cerevisiae, eIF5A é codificado por dois genes homólogos TIF51A (HYP2) e TIF51B (ANB1), gerando proteínas com 90% de identidade. Estes genes são regulados transcricionalmente pelos níveis de oxigênio, sendo expressos em condições aeróbicas e anaeróbicas, respectivamente (SCHNIER et al. 1991; WOHL et al. 1993; VALENTINI et al. 2002). eIF5A sofre uma modificação pós-traducional única chamada de hipusinação em um resíduo de lisina (Chen e Liu, 1997; Park et al., 1997). A formação do aminoácido hipusina ocorre através da transferência, catalisada pela enzima desoxi-hipusina sintase (Dys1), do grupo aminobutil de uma molécula de espermidina para o amino grupo livre de uma lisina específica no precursor de eIF5A (K51 em S. cerevisiae), seguido por hidroxilação do mesmo pela enzima desoxi-hipusina hidroxilase (Lia1) (Park et al., 1993; Park et al., 1998), porém essa última etapa não é essencial no organismo modelo utilizado neste trabalho. A reação pode ser melhor visualizada na Figura 1. O alto grau de conservação, nas diferentes espécies, dos resíduos flanqueadores do sítio de hipusinação revela a grande importância deste aminoácido único (Chen e Liu, 1997; Magdolen et al., 1994).

eIF5A foi originalmente purificado a partir de ribossomos extraídos de lisados de reticulócitos de coelho e envolvido com o início da tradução devido à sua capacidade de estimular a síntese in vitro de metionil-puromicina, um ensaio clássico da formação da primeira ligação peptídica (Benne e Hershey, 1978). Entretanto, o seu papel como um possível fator de início de tradução foi repensado, pois a depleção deste fator em leveduras

causou uma redução de apenas 30% nos níveis de síntese proteica total (Kang e Hershey, 1994).

Porém, num cenário mais recente, foi observado, por nosso laboratório e outros grupos, que mutantes de eIF5A sensíveis a temperatura, quando cultivados na temperatura não permissiva apresentam defeitos que sugerem um papel na elongação da tradução por mostrarem uma síntese proteica prejudicada não somente em termos quantitativos (DIAS *et al.* 2008) como também um aumento nas frações polissomais em relação às frações de 80S (GREGIO *et al.* 2009; SAINI *et al.* 2009), semelhante ao que ocorre para um mutante dominante negativo do eElongation Factor 2 (eEF2) (GREGIO *et al.* 2009). Ainda, foi verificado que os mesmos mutantes apresentam um atraso significativo no tempo de trânsito ribossomal (GREGIO *et al.* 2009; SAINI *et al.* 2009). Adicionalmente, mutantes de eIF5A não apresentaram formação de *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 de novos ciclos da elongação da tradução. Além desses resultados, um mutante condicional de eIF5A (*tif51A*^{K564}) tem seus defeitos de crescimento, síntese proteica e perfil polissomal suprimidos pela super expressão de eEF2, revelando uma relação funcional próxima entre esses dois fatores (DIAS *et al.* 2012).

Concomitantemente, foi visto que após a depleção de eIF5A ocorreu um aumento no número de células paradas na fase G1 do ciclo celular (Kang e Hershey, 1994). A correlação entre formação de hipusina e proliferação celular também foi evidenciada por outros estudos (Chen et al., 1996; Hanauske- Abel et al., 1994; Park et al., 1994; Shi et al., 1996) e ainda, a expressão de eIF5A é aumentada em linfócitos T ativados (Bevec et al., 1994). Tendo por base esses dados, foi proposto que eIF5A poderia ser um fator envolvido na tradução de um grupo específico de mensageiros, como mRNAs envolvidos na transição G1/S do ciclo celular.

Ainda, reforçando os dados de correlação funcional de eIF5A com a proliferação celular, foi descoberto, em nosso laboratório, o envolvimento de eIF5A com via secretória (FRIGIERI *et al.* 2007). Em um rastreamento de letalidade sintética com um mutante de eIF5A (tif51A-3), foi isolado um mutante do gene *YPT1*, cujo produto Ypt1 (yeast protein transport 1) é essencial para a fusão de vesículas do retículo endoplasmático (RE) no Complexo de Golgi (SEGEV 2001), sendo conhecida como "Ras-Like GTPase", devido à sua homologia com proteínas Ras de mamífero (Segev 2001; Segev and Botstein 1987). A identificação da letalidade sintética entre *TIF51A* e *YPT1* revela uma conexão entre tradução e crescimento polarizado, sugerindo que o trabalho em conjunto dessas proteínas garanta a síntese e secreção proteica para a correta formação do broto durante o ciclo celular (FRIGIERI *et al.* 2008).

Muitas proteínas que sofrem modificações pós-traducionais, como as que residem em organelas, outros compartimentos celulares (RE, Golgi, vacúolo, vesículas, etc), membranas e as endereçadas para o broto, precisam ser direcionadas ao RE para diversas finalidades, como aquisição de uma correta conformação tridimensional que confira atividade, modificações pós-traducionais ou remoção de peptídeos. O direcionamento, por sua vez, pode ocorrer após o término da síntese da cadeia polipeptídica (via pós-traducional) ou concomitantemente à tradução (via co-traducional) (RAPOPORT *et al.* 1999; KEENAN *et al.* 2001). Na via pós-traducional, mais proeminente em eucariotos inferiores (MATHEUS et al 2007), o direcionamento de proteínas para o RE ocorre sem o auxílio de SRP (Signal Recognition Particle) (DESHAIES and SCHEKMAN 1989; ROTHBLATT *et al.* 1989; RAPOPORT *et al.* 1999). Neste caso, chaperonas são requeridas para manter o peptídeo nascente em estado desnaturado no citoplasma, para que este possa passar através do translocon, formado pelos complexos multiproteicos Sec61 e Sec62/Sec63, para atingir o lúmen do RE (CHIRICO *et al.* 1988; CAPLAN *et al.* 1992). Um esquema do funcionamento desta via é ilustrado pela Figura 2.

Por outro lado, a translocação da proteína para o RE mediado pelo complexo SRP, cujo receptor está localizado na membrana do RE (NG *et al.* 1996), ocorre assim que o peptídeo nascente emerge do ribossomo. Assim, SRP liga-se a uma sequência específica de aminoácidos no próprio peptídeo nascente, conhecida como sequência sinal. O complexo ribonucleoproteico de *S. cerevisiae* pode ser visto esquematicamente na Figura 3. Essa sequência sinal é caracterizada por um conjunto de aminoácidos hidrofóbicos. A ligação através de um domínio rico em metionina de uma das subunidades de SRP (Srp54) e a sequência sinal promove uma parada na elongação até que o complexo de SRP ligado ao ribossomo/mRNA/peptídeo nascente (RNC – Ribosome-Nascent Chain Complex) seja direcionado ao RE e ocorra ligação ao translocon, conhecido como complexo Sec61/Sec63 (NG *et al.* 1996). Essa parada ocorre devido a ligação do domínio Alu de SRP, de forma competitiva, com a região onde eEF2 se liga no ribossomo e o fenômeno é chamado de "elongation arrest". A via co-traducional está retratada de forma esquemática na Figura 4.

Levando em consideração o envolvimento de eIF5A na tradução e o reflexo de seu papel na correlação com via secretória e ciclo celular, é possível que eIF5A tenha uma atuação essencial no encontro entre síntese proteica e via secretória, no RE, isto é, reforça a hipótese de um possível papel na tradução específica, envolvendo proteínas que necessitam da via secretória, como os componentes de membrana e parede e, principalmente, as que são direcionadas ao broto, o que poderia justificar a associação entre eIF5A e crescimento polarizado.

Com o objetivo de elucidar estas questões e colaborar com a hipótese de tradução específica, este trabalho buscou melhorar a compreensão do papel de eIF5A na translocação de proteínas para o RE.



Adaptado de Park, 2006

Figura 1. Esquema da biossíntese do resíduo de hipusina no precursor 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 desoxi-hipusina sintase (Dys1). O intermediário resultante, agora contendo desoxi-hipusina, é posteriormente hidroxilado pela enzima desoxi-hipusina hidroxilase (Lia1) o que resulta na ativação de eIF5A. As cadeias laterais da lisina, desoxi- hipusina e hipusina são apresentados (Modificado de Park, 2006).



KEENAN et al. 2001

Figura 2. Representação esquemática da translocação de proteínas para o Retículo Endoplasmático (RE) pela via pós-traducional. Chaperonas ligam-se à cadeia polipeptídica enquanto está sendo sintetizada. Após o término da tradução, o polipeptídeo é direcionado para o RE e, através do translocon (complexo Sec61 associado ao complexo Sec62/63), a proteína passa para o lúmem do RE onde é corretamente enovelada, com gasto energético.

Fungi



Yvonne Nyathi et al. 2013 (adaptado)





Yvonne Nyathi et al. 2013 (adaptado)

Figura 4. Representação esquemática da translocação de proteínas para o Retículo Endoplasmático (RE) pela via co-traducional. Sequência sinal sintetizada sinaliza para ligação com o complexo SRP, que executa uma parada temporária na elongação da tradução até que o complexo RNC (ribosome-nascent-chain) seja direcionado ao RE. SRP promove a interação ribossomo-translocon, composto por complexo Sec61, por interagir com seu receptor, adjacente ao translocon. Uma vez ligado ao translocon, o ribossomo reinicia a elongação da tradução e a proteína recém sintetizada é direcionada ao lúmen do RE.

2. OBJETIVO

• Objetivo geral:

O presente trabalho teve como objetivo o estudo do papel de eIF5A na translocação de proteínas para o Retículo Endoplasmático, a fim de compreender o melhor funcionamento da conexão entre via secretória e um possível fenômeno de tradução específica.

• Objetivos específicos:

 a) Identificar interações genéticas entre eIF5A e proteínas de diferentes etapas da viasecretória;

b) Avaliar possíveis defeitos na translocação de proteínas pela via pós-traducional em mutantes de eIF5A;

c) Avaliar o impacto de mutantes de eIF5A na translocação de proteínas pela via cotraducional;

d) Análise genética entre o mutante *srp102^{K511}* e *tif51A-3;*

e) Identificar interações genéticas entre o mutante *tif51A-3* e fatores do translocon de via co-traducional.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

As leveduras e plasmídeos utilizados neste trabalho estão descritos nas tabelas 1 e 2 respectivamente.

Linhagem	Descrição	Origem
SVL14	MAT <u>a</u> , ade2, his3, leu2,	Coleção do laboratório
	ura3, trp1, tif51A-1	
SVL32	MAT <u>a</u> , ade2, his3, leu2,	Coleção do laboratório
	ura3, trp1, tif51A-3	
SVL82	MAT <u>a</u> , ade2, his3, leu2,	Coleção do laboratório
	ura3, trp1, TIF51A	
SVL102	$MAT \alpha$, $ade2$, $his3$, $leu2$,	Coleção do laboratório
	ura3, trp1, tif51A-3	
SVL447	$MAT \alpha$, $ade2$, $his3$, $leu2$,	Coleção do laboratório
	lys2, ura3, trp1, tif51A-	
	3::URA3, ∆ssd1::LEU2	
VZL825	MAT <u>a</u> , ura3, sec2-41	Finger & Novick, 2000
VZL838	$MAT \alpha$, $leu2$, $ura3$,	Coleção do laboratório
	TIF51A	
VZL1019	$MAT \alpha$, $ura3$, $leu2$, $trp1$,	Coleção do laboratório
	ade2, sec63-201	
VZL1021	$MAT \alpha$, $ura3$, $leu2$, $trp1$,	Coleção do laboratório
	ade2, sec61-201	
VZL1181	$MAT \underline{a}, ade2, leu2,$	Mutka & Walter, 2001
	$srp102^{K511}$	
VZL1233	MAT <u>a</u> , his3, leu2, ura3,	Coleção do laboratório
	∆snc2::KanMX4	
VZL1235	MAT <u>a</u> , his3, leu2, ura3,	Coleção do laboratório
	∆ssh1::KanMX4	
VZL1236	MAT <u>a</u> , his3, leu2, ura3,	Coleção do laboratório
	∆sbh1::KanMX4	

Tabela 1. Linhagens utilizadas nos experimentos deste trabalho.

Plasmídeo	Descrição	Origem
pSV65 (pRS426)	2µ, URA3	Coleção do laboratório
pSV107	$TIF51A$, 2μ , $URA3$	Coleção do laboratório
pSV369	$MSB3, 2\mu, URA3$	Coleção do laboratório
pSV370	$MSB4, 2\mu, URA3$	Coleção do laboratório
pVZ1064 (pDN106)	¹ SSCPY-URA3, HIS3,CEN	Davis Ng
pVZ1110 (BG1805-ura3-	GAL1p-DAP2-6xHis-HA-	Open Biosystem
DAP2)	Protease C site-ProtA, 2μ ,	
	URA3	

Tabela 2. Plasmídeos utilizados nos experimentos deste trabalho.

1 SSCPY - sequência sinal de CPY (gene PRC1) em fase com URA3.

Os procedimentos básicos de preparação de soluções e meios de cultivo, preparação de *Escherichia coli* competente, transformação de *E. coli*, preparação de plasmídeos a partir de *E. coli* em pequena escala, bem como outras metodologias utilizadas neste trabalho foram baseadas nos seguintes manuais de laboratório: (GUTHRIE; FINK, 1991;SAMBROOK; RUSSELL, 2001; AUSUBEL et al., 2004).

3.1. Transformação bacteriana pelo método físico

3.1.1. Preparo de E. coli competente

Crescer uma colônia da cepa de *E. coli* desejada em 25 mL de meio LB a 37°C, durante a noite e sob agitação. No outro dia, diluir (1:100) a cultura em 200 mL de meio fresco e crescer a 37°C até D.O._{600nm} = 0.375, sob agitação. Manter as células em gelo por 10 minutos e centrifugar a 3.000 rpm, a 4°C, por 7 minutos; suspendê-las em 40 mL de solução de cloreto cálcio (CaCl₂ 60 mM; PIPES 10 mM pH 7,0; glicerol 15%) gelado e centrifugar por 5 minutos a 2.500 rpm, a 4°C. Suspender as células novamente em 40 mL de solução de cloreto de cálcio e manter em gelo por 30 minutos. Centrifugar novamente (5 minutos, 2.500 rpm, 4°C), suspender em 8 mL da mesma solução e manter em gelo por 1 hora e 30 minutos. Aliquotar 125 μL em microtubos gelados e congelar imediatamente em nitrogênio líquido. Manter congelado a -80°C.

3.1.2. Transformação

Uma alíquota de *E. coli* competente foi descongelada em gelo. O DNA plasmidial de interesse (50 a 200 ng) foi adicionado ao tubo, que foi mantido em gelo por 30 minutos e depois foi colocado a 42°C por 2 minutos. A seguir, as células foram suspensas em 1 mL de meio LB e incubadas a 37°C por 1 hora, sob agitação. Após esse período, as células foram plaqueadas em meio LB sólido contendo antibiótico adequado à seleção plasmidial e incubadas a 37°C por no máximo 16 horas.

3.2. Transformação bacteriana por corrente elétrica

3.2.1. Preparo de *E. coli* eletrocompetente

Crescer uma colônia da cepa de *E. coli* desejada em 50 mL de meio LB a 37°C, durante uma noite e sob agitação. A seguir, diluir a pré-cultura em 100 mL de meio fresco ($DO_{600nm} =$ 0,3) e incubar novamente a 37°C até atingir uma $DO_{600nm} =$ 1,0–1,2. Centrifugar a cultura a 6.000 xg por 20 minutos a 4°C. Lavar as células três vezes com 250-500 mL de água gelada e uma vez com 30 mL de glicerol 20% gelado. Após a lavagem, suspender as células em 3 mL de glicerol 20% e congelá-las em alíquotas de 40 µL a -80°C.

3.2.2. Eletroporação

Uma alíquota da linhagem eletrocompetente foi descongelada em gelo e o DNA plasmidial de interesse foi adicionado às células (5 μ L). Estas foram transferidas para cubeta de eletroporação (0,1 cm) e submetidas a um pulso elétrico com as seguintes constantes elétricas: voltagem 1,7 kV, resistência 200 Ω e capacitância 25 μ F. Em seguida, as células foram removidas da cubeta com 1 mL de meio LB e incubadas a 37°C por 1 hora, sob

agitação. Finalmente, as células foram plaqueadas em meio seletivo e incubadas a 37°C por no máximo 16 horas.

3.3. Preparo de plasmídeos a partir de *E. coli* em pequena escala – Miniprep (lise alcalina)

Linhagens de *E. coli* contendo os plasmídeos de interesse foram inoculadas em 3 mL de meio LB contendo antibiótico adequado à seleção plasmidial e incubadas a 37°C por aproximadamente 16 horas, sob agitação constante. A cultura foi centrifugada por 1 minuto a 12.000 xg. As células foram suspensas em 200 μ L de TE (Tris 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0) e então adicionadas de 200 μ L de solução II (NaOH 0,2 M; SDS1%) e 150 μ L de solução acetato de sódio 3 M pH 4,8. O tubo foi invertido delicadamente por várias vezes e centrifugado por 6 minutos a 12.000 xg. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e 1 mL de isopropanol foi adicionado. Após centrifugação a 12.000 xg por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado duas vezes com 1 mL de etanol 75% gelado. Depois de seco, o DNA foi ressuspendido em 50 μ L de água.

3.4. Transformação de leveduras

Inicialmente, a linhagem de interesse foi inoculada em 10 mL de meio adequado e incubada a 30°C sob agitação por toda a noite. Após centrifugação, as células foram suspensas em 1 mL de solução de acetato de lítio (LiAc) 100 mM e incubadas por 15 minutos a 30°C. Após nova centrifugação e remoção do sobrenadante, os seguintes reagentes foram adicionados, na ordem: 240 µL de PEG 50% (m/v), 36 µL de LiAc 1 M, 50 µL de DNA de esperma de salmão (10 mg/mL), 5 µL do plasmídeo desejado e 20 µL de água. O tubo contendo a mistura de transformação foi vigorosamente agitado (vortex) por 1 minuto e incubado a 30°C por 20 minutos. O choque térmico foi dado incubando-se o tubo a 42°C por

20 minutos. As células foram então centrifugadas (12.000 xg, 30 segundos), suspensas em 100 μ L de água, plaqueadas em meio seletivo e incubadas a 25°C até o aparecimento de colônias.

3.5. Cruzamento e esporulação de leveduras

3.5.1. Cruzamento

As linhagnes haplóides de *S. cerevisiae* de interesse foram cruzadas na superfície de ágar YPD e incubadas por uma noite a 25°C. A seleção dos diplóides foi realizada pela transferência, com veludo estéril, do crescimento obtido na placa de YPD para uma placa de meio seletivo duplo, de acordo com as marcas auxotróficas dos haplóides de partida. As placas foram incubadas a 25°C. Após o crescimento, os diplóides foram isolados em meio seletivo.

3.5.2. Esporulação

Os diplóides foram crescidos em meio S-SPO líquido (2,5 g de extrato de levedura; 15 g acetato de potássio; 40 mg de adenina, uracil 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) a 25°C, sob agitação até a formação de ascos.

Como alternativa aos diplóides que não cresciam em meio S-SPO líquido, foram utilizados os meios PSP2 (YNB 0,67%, extrato de levedura 0,1%, acetato de potássio 1%, ftalato de potássio pH 5,0 50 mM) e SPO (acetato de potássio 0,3%, rafinose 0,02%). Os diplóides foram crescidos em meio PSP2 líquido suplementado com aminoácidos (adenina, uracila, triptofano, histidina, leucina) sob agitação e temperatura adequada até atingir 0,8-1,2x10⁷ células/mL. O inóculo foi centrifugado por 5 minutos a 1.300xg e as células foram lavadas com água estéril. O sobrenadante foi desprezado e as células suspendidas em meio SPO líquido. Incubou-se à 25°C até a formação de ascos.

3.5.3. Dissecção de tétrades e caracterização de haplóides

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

3.6. Teste de sensibilidade a temperatura

As linhagens de interesse foram inoculadas em 10 mL de meio apropriado e crescidas até atingir a concentração de $1-2\times10^7$ células/mL (DO_{600 nm} = 0,6 a 0,9). Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação (600 xg por 7 minutos) e suspendidas para uma concentração final de 2,5x10⁸ células/mL para todas as amostras testadas. Transferiu-se 200 μ L da suspensão de células para o primeiro poço da microplaca (de 96 poços). Colocou-se 180 μ L de meio de cultura líquido nos 5 poços seguintes. Fez-se 5 diluições seriadas utilizando um micropipetador multicanal para pipetar 20 μ L da cultura do primeiro poço, transferir para o segundo poço, homogeneizou-se bem e repetiu-se o procedimento para os próximos poços. Aplicou-se 3 μ L de cada diluição nas placas com os meios a serem testados e incubou-as por 1 a 3 dias na(s) temperatura(s) adequada(s).

3.7. Extração de DNA genômico de levedura

As linhagens foram crescidas até a saturação em 10 mL de meio YPD líquido a 30°C, sob agitação. O volume total de cultura foi submetido à centrifugação a 3.000 xg por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células suspensas em 500 µL de água Milli-Q e transferidas para um tubo de microcentrífuga. O tubo foi submetido à centrifugação a 13.000 xg por 1 minuto, o sobrenadante foi descartado e as células suspensas no líquido residual. A esse tubo foram adicionados 200 µL de tampão de lise (Triton X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl pH 8,0 10 mM, EDTA 1 mM), 200 µL de PCI (Fenol:Clorofórmio:Álcool isoamílico-25:24:1) e aproximadamente 300 mg de contas de vidro. A mistura foi agitada em vórtex por 3 minutos. Posteriormente, foram adicionados 200 µL de TE pH 8,0. O tubo foi agitado em vórtex e submetido à centrifugação a 13.000 xg por 5 minutos. Após esse procedimento, a fase aquosa foi transferida para um tubo de microcentrífuga ao qual foram adicionados 200 µL de PCI. A mistura foi agitada novamente e submetida à centrifugação 13.000 xg por 5 minutos e a fase aquosa transferida para um novo tubo de microcentrífuga. Esse procedimento de extração foi repetido duas vezes. A seguir, foi adicionado ao tubo 1 mL de etanol absoluto gelado e o conteúdo homogeneizado por inversão. O tubo foi centrifugado a 13.000 xg por 2 minutos a 4ºC e o sobrenadante descartado. O precipitado foi suspenso em 400 µL de TE pH 8,0 e foram adicionados 3 µL de RNase 10mg/mL. A suspensão foi incubada por 30 minutos a 37°C. Em seguida, foram adicionados 200 µL de PCI e o tubo foi agitado brevemente em vórtex. A mistura foi submetida à centrifugação a 13.000 xg por 5 minutos a 4°C e a fase aquosa foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga. Ao tubo foram adicionados 10 µL de acetato de amônio 4 M e 1 mL de etanol absoluto gelado. O conteúdo dos tubos foi misturado por inversão e os tubos foram centrifugados a 13.000 xg por 2 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o

precipitado lavado com 400 μ L de etanol 75% gelado. Após a secagem, o precipitado foi suspenso em 50 μ L de TE pH 8,0. O DNA genômico foi armazenado em freezer a -20°C.

3.8. Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)

As reações de PCR foram realizadas em microtubos com 1 mM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1 µL de DNA molde, 1 UI de enzima DNA polimerase e 200 mM de uma mistura de desoxi-ribonucleotídeos, num volume final de reação de 50 µL. As condições dos ciclos das reações foram estabelecidas de acordo com a temperatura de hibridização dos oligonucleotídeos utilizados e o tamanho do fragmento esperado. A última fase da PCR foi incubada a 72°C por 5 minutos, e em seguida mantida a 4°C. Os produtos da reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

3.9. Western Blot

As amostras proteicas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) e transferidas para membrana de nitrocelulose utilizando tampão de transferência (24,8 mM Tris-HCl, 192 mM glicina) e tensão de 100 V por uma hora.

A transferência foi avaliada por coloração com Ponceau-S. A membrana foi bloqueada sob agitação durante uma noite a 4°C em tampão PBST (PBS 1X, Tween-20 0,05%) contendo 5% de leite desnatado. A membrana foi então incubada por duas horas à temperatura ambiente com uma diluição adequada de soro imune em PBST. Posteriormente, a membrana foi lavada três vezes por cinco minutos com PBST. A seguir, a membrana foi incubada por uma hora com anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (Sigma) em PBST. Após três novas lavagens de cinco minutos com PBST, a membrana foi tratada com reagentes quimioluminescentes (ECL – Amershan Biosciences) e exposta a filme auto-radiográfico.

4. **RESULTADOS**

4.1. Interações genéticas entre *TIF51A* e genes que codificam diferentes proteínas da via secretória.

A via secretória é um processo fisiológico e essencial para a célula, visto que existem uma grande quantidade de proteínas e processos envolvidos no correto funcionamento deste evento. Esta via tem por finalidade a modificação pós-traducional e o endereçamento de proteínas para uma série de constituintes celulares.

Inicialmente a proteína é translocada para o Retículo Endoplasmático (RE), onde irá sofrer modificações pós-traducionais específicas relacionadas diretamente com sequências sinais presente em sua estrutura primária. Tais modificações são diversas como glicosilações, formação de pontes dissulfeto para uma nova conformação tridimensional, sulfatação ou metilações. Após esses processos, as proteínas são envesiculadas com a própria membrana do RE com ligantes, cujos receptores estão presentes no próximo destino: o Complexo de Golgi. Nesta outra organela novas modificações pós-traducionais ocorrem e, por fim, as proteínas são envesiculadas novamente e direcionadas para locais e funções específicos na célula, como formação do broto celular (no caso de *S. cerevisiae*), secreção polarizada, formação de vacúolos ou lisossomos, composição de membranas celulares ou exocitose e secreção proteica.

É importante a compreensão que todo esse processo é comandado por sequencias sinais presentes na estrutura primária da proteína. As enzimas residentes de cada organela envolvida reconhecem onde devem atuar por meio de sequencias que sinalizam não somente onde, como também o que deve ser feito naquele ponto.

Dessa forma foi dado início ao desenvolvimento de algumas análises genéticas entre *TIF51A* e genes que codificam proteínas que atuam em diferentes passos da via secretória na tentativa de rastrear um possível envolvimento de eIF5A nesta via. A localização destas proteínas pode ser melhor visualizado no esquema mostrado na Figura 5.

Inicialmente foi realizado ensaio de interação genética entre *TIF51A* e *SNC2*, gene que codifica para o receptor v-SNARE atuando no correto ancoramento das vesículas que saem do Golgi em direção à membrana citoplasmática (Grote E. 2000, Paumet F. 2004).

Assim, foi feito o cruzamento da linhagem VZL447 (tif51A-3::URA3, ssd1::LEU2) com VZL1233 (snc2::KanMX4, SSD1) para obtenção do diplóide contendo o alelo mutante de TIF51A e deleção de SNC2. As sete tétrades informativas derivadas deste diplóide foram submetidas ao ensaio de sensibilidade a temperatura, e uma das seis que apresentaram o mesmo fenótipo de crescimento pode ser visto na Figura 6. As linhagens de partida foram utilizadas como controle de crescimento, isto é, mostrando o defeito de crescimento do alelo *tif51A-3* e o crescimento do $\Delta snc2$ à 36°C. A figura mostra piora de crescimento do mutante tif51A-3 na ausência do gene SNC2, já a 30°C, quando comparado como o haplóide carregando *tif51A-3* e cópia selvagem de *SNC2*. Os haplóides carregando *TIF51A* apresentam resistência as temperaturas testadas, como esperado. Esta análise foi realizada na presença de SSD1 selvagem, uma vez que o fenótipo dos alelos de TIF51A é mais pronunciado na ausência de SSD1 (Zanelli e cols., 2005). Com essa estratégia é possível afirmar que a interação genética entre TIF51A e SNC2 é do tipo sintética doente, independentemente da ausência de SSD1, uma vez que o acúmulo dos defeitos causados por TIF51A mutante na ausência de SNC2I acarreta em um fenótipo doente mais severo em relação à mutação e a deleção separadamente.

Posteriormente, foi avaliada a interação genética sintética entre *SEC2* e *TIF51A*. Sec2 é uma "guanyl-nucleotide exchange factor" (GEF) da proteína G Sec4 que, por sua vez, é uma proteína essencial para o transporte vesicular, também atuando na fusão das vesículas que saem do Golgi e são endereçadas para a membrana citoplasmática (Walch-Solimena C. 1997).

Sec2 é essencial para o transporte vesicular pós-Golgi, por essa razão foi utilizado o mutante condicional *sec2-41*, que apresenta sensibilidade a partir de 36°C. Para realização deste ensaio, foi testada a supressão do fenótipo ts (termo sensibilidade) do mutante *sec2-41* (VZL825) por *T1F51A*. O mutante foi então transformado com um plasmídeo de alto número de cópias contendo *T1F51A* (pSV107) ou o vetor vazio correspondente (pSV65). Dois transformantes com cada um dos plasmídeos foram então submetidos ao ensaio de sensibilidade a temperatura a 36°C e 38°C. Como mostrado na Figura 7, é possível ver uma supressão do defeito de crescimento do mutante *sec2-41*, nas temperaturas testadas, pela superexpressão de *T1F51A* na célula. O resultado revela novamente interação de eIF5A com transporte vesicular, ao mostrar que o defeito de crescimento causado pelo defeito no ancoramento de vesículas na membrana é recuperado quando na superexpressão de *T1F51A*.

Por fim, a última análise genética realizada com proteínas envolvidas no transporte vesicular, foi a verificação de supressão do fenótipo doente de *tif51A-3* quando na superexpressão de *MSB3* e *MSB4*. Msb3 e 4 são proteínas denominadas "<u>G</u>TPase-<u>a</u>ctivating protein" (GAP) que atuam preferencialmente no broto formado durante a divisão da levedura, sendo muito importantes para secreção polarizada, organização do citoesqueleto de actina e ativação de Sec4 (Bach S. 2000). Para tanto, o mutante *tif51A-3* (SVL32) e a linhagem selvagem (SVL82) foram transformados com os vetores contendo *MSB3* e *MSB4* em alto número de cópias (pSV369 e pSV370, respectivamente) e submetidos a teste de sensibilidade a temperatura. Foi possível observar que a superexpressão desses genes não apresentou nenhum fenômeno de toxicidade na linhagem selvagem, entretanto, foi capaz de suprimir o fenótipo ts do mutante de eIF5A a 36°C, em comparação com o vetor vazio, como pode ser visto na Figura 8.

Portanto, é possível concluir que eIF5A interage de uma maneira geral na via secretória, por mostrar interação genética com diferentes componentes de etapas do transporte vesicular, visto por diferentes técnicas de análises genéticas.



Figura 5. Interações genéticas entre eIF5A e proteínas de diversas etapas da via secretória. 1) eIF5A atuando na etapa de elongação da tradução; 2) eIF5A interagindo com a translocação de proteínas para o RE. Ypt1 (amarelo) é essencial para o tráfego vesicular e foi identificado como letal sintético com eIF5A (Frigieri *et al.*, 2008); Snc2 (verde) é uma v-SNARE envolvida na fusão de vesículas secretórias com a membrana plasmática e mutantes de eIF5A são sintéticos doentes com $\Delta snc2$ (Figura 6); Sec2 (azul) é uma GEF (guanyl-nucleotide exchange factor) para Sec4, que é essencial para a exocitose e *TIF51A* em alto número de cópias suprime o fenótipo de defeito de crescimento do mutante *sec2-41* (Figura 7); Msb3 e Msb4 (vermelho) são GTPase ativadoras para Sec4 e necessárias para a correta organização do citoesqueleto de actina e *MSB3* e *MSB4* em alto número de cópias suprime o de feito de crescimento de mutantes de eIF5A (Figura 8).

linhagens parentais



resultado da análise genética



Figura 6. Análise da interação genética entre o mutante *tif51A-3* e o *Asnc2* na presença de *SSD1*. Diluições seriadas de 4 haplóides de uma tétrade obtida do diplóide duplo mutante, foram aplicadas em meio YPD e incubadas por 2 dias nas temperaturas indicadas. As linhagens parentais SVL447 (*tif51A-3::URA3, ssd1::LEU2*) e VZL1233 (*snc2::KanMX4, SSD1*) foram usadas como controle de crescimento.





Figura 7. Supressão do fenótipo de defeito crescimento do mutante *sec2-41*. A linhagem VZL825 (*sec2-41*) foi transformada com o vetor vazio (pSV65 - 2μ , URA3) e o vetor contendo o gene *TIF51A* (pSV107 - *TIF51A*, 2μ , URA3). Diluições seriadas de 2 colônias de cada transformação foram aplicadas em SC-ura e incubadas nas temperaturas semi-permissiva (36°C) e não permissiva (38°C) para o mutante *sec2-41* por 2 dias.



Figura 8. Supressão do fenótipo de defeito de crescimento do mutante *tif51A-3* por superexpressão de *MSB3* e *MSB4*. O mutante *tif51A-3* foi transformado com o vetor vazio (pSV65 - 2μ , *URA3*), *MSB3* (pSV369 - *MSB3*, 2μ , *URA3*) e *MSB4* (pSV370 - *MSB4*, 2μ , *URA3*). Diluições seriadas de cada transformação foram aplicadas em SC-ura e incubadas na temperatura semi-permissiva para o mutante (36°C) por 2 dias.

4.2. Avaliação de possíveis defeitos na translocação de proteínas pela via póstraducional em mutantes de eIF5A.

É descrito que, em *S. cerevisiae*, muitas proteínas são translocadas por uma via preferencial (co ou pós-traducional), porém na presença de algum defeito que comprometa uma dessas vias, tais proteínas sofrem uma adaptação para a via íntegra, de modo a não comprometer o crescimento de forma letal até o restabelecimento da homeostase celular. Entretanto, algumas proteínas tem seu direcionamento de forma não adaptativa, ou seja, de forma exclusiva por uma das vias.

Esse fenômeno foi abordado na continuação dos estudos iniciais que correlacionaram eIF5A com via secretória (FRIGIERI *et al.* 2008), mostrando que essa proteína possivelmente não teria alguma função na translocação de proteínas pela via pós-traducional, uma vez que mutantes de eIF5A não apresentem defeitos de translocação da protease vacuolar carboxipeptidase (CPY), uma proteína translocada de forma não adaptativa pela via pós-traducional. O ensaio que confirma esse dado é mostrado na Figura 9.

No intuito de confirmar o não envolvimento de eIF5A com a via pós-traducional, foi utilizado uma nova metodologia, a fim de revelar se mutantes de eIF5A apresentavam algum defeito nesta via. Para isso, foi utilizado um gene repórter que codifica para uma forma modificada da enzima Ura3, que está fusionada a sequência sinal (SS) de CPY. (NG *et al.* 1996). A enzima Ura3 tem sua atividade catalítica no citoplasma da célula para a via de biossíntese da uracila, permitindo, assim, o crescimento celular em meio desprovido desta base nitrogenada (prototrofia). Entretanto, quando fusionada a uma sequência sinal que a direcione para ser internalizada no RE pela via pós-traducional, a enzima passa a não exercer mais sua função, inviabilizando o crescimento celular em meio sem uracila (auxotrofia). Portanto, essa metodologia permite avaliar se determinadas mutações acarretam em algum defeito na via pós-traducional pela presença ou ausência de crescimento em SC-Ura. A Figura

10 mostra, esquematicamente, o funcionamento do repórter.

Para avaliar a participação de eIF5A na via secretória através da translocação pela via pós-traducional, ensaios utilizando o repórter discutido acima foram realizados com dois mutantes condicionais de eIF5A, *tif51A-1* e *tif51A-3*, uma linhagem selvagem como controle negativo de crescimento e uma linhagem mutante (*sec61-201*) com defeito na translocação do repórter SS-Ura3 como controle positivo. As linhagens foram transformadas com o vetor vazio e o repórter SS-Ura3. Os transformantes foram cultivados em meio seletivo para o vetor e para o repórter (SC-his e SC-his,-ura, respectivamente), nas temperaturas permissiva e semi-permissivas para os alelos mutantes de *TIF51A*. Apesar das diferenças entre translocons das duas vias de translocação, como apresentado na Introdução, a proteína Sec61 é o componente majoritário de ambos (CORSI and SCHEKMAN 1996). Portanto, o mutante *sec61-201* apresenta defeito na translocação de proteínas ao RE pelas duas vias (NG *et al.* 1996). Assim, a Figura 11 mostra que o controle positivo apresenta crescimento em meio SC-his,-ura, nas temperaturas testadas, comprovando que o defeito na translocação pela via pós- traducional leva ao acúmulo de SS-Ura3 no citoplasma.

Ainda na Figura 11, as linhagens contendo os alelos *tif51A-1* e *tif51A-3*, transformadas com o repórter SS-Ura3, apresentaram crescimento no meio SC-his, como esperado, entretanto, não apresentaram crescimento em meio SC-his,-ura, semelhantemente ao comportamento da linhagem selvagem. Assim, pode-se concluir que a proteína SS-Ura3 é direcionada integralmente para o RE, não indicando defeito na translocação pela via pós-traducional nos mutantes de eIF5A.



Figura 9. Avaliação de defeitos na via pós-traducional através do acúmulo da forma precursora de CPY. Defeitos no processamento da proteína CPY podem ser revelados por meio da avaliação do acúmulo da forma precursora (67 kDa) e diminuição dos níveis da sua forma madura (61 kDa). Dessa forma, mutantes de eIF5A, assim como a linhagem selvagem, não apresentam esse acúmulo, o que acontece com o mutante *ypt1*^{A136D}, que tem descrito um defeito no processamento de CPY.



Figura 10. Esquema de funcionamento do repórter SS-Ura3. Defeitos na via póstraducional levam ao acúmulo citoplasmático de Ura3, local onde a enzima é ativa, conferindo prototrofía para uracila. A linhagem selvagem promove a completa translocação da proteína repórter e, assim, gera um fenótipo auxotrófico para uracila.



Figura 11. Ensaio evidenciando o não envolvimento de eIF5A na via póstraducional. Diluições seriadas das linhagens contendo os alelos *tif51A-1* (SVL14), *tif51A-3* (SVL32), *TIF51A* (SVL82) e *sec61-201* (VZL1021), transformadas com vetor vazio (pSV57) ou SS-Ura3 (pVZ1064), foram aplicadas nos meios seletivos SC-his e SC-his,-ura e incubadas nas temperaturas permissiva e semi-permissivas por 3 dias. A ausência de crescimento dos mutantes de eIF5A no meio desprovido de uracila não revela algum defeito na via pós-traducional.

4.3. Avaliação do impacto de mutantes de eIF5A na via co-traducional.

Com base nas suspeitas da participação de eIF5A na via co-traducional, mesmo que de forma dependente da maquinaria de tradução, foram realizados experimentos de análise de translocação pela via co-traducional utilizando como repórter a proteína DPAP B (dipeptidil aminopeptidase B). Esse objetivo foi realizado em colaboração com a pós-doc de nosso laboratório Dra. Danuza Rossi. DPAP B é uma protease vacuolar codificada pelo gene DAP2, que sofre direcionamento para o RE exclusivamente pela via co-traducional. Para o desenvolvimento deste ensaio, foi adquirido um plasmídeo contendo DAP2 clonado em fusão com a sequência de "tags" HA, 6xHis e ProtA (Open Biosystem), pVZ1110. Esse gene em fusão está sob controle transcricional do promotor de GAL1 (induzível por galactose), ou seja, sempre que cultivado na presença de galactose como única fonte de carbono, o repórter DAP2-"tag" será expresso. Com este reagente é possível desenvolver os ensaios específicos de translocação pela via co-traducional, visto que DPAP B fusionado a "tag" HA é igualmente funcional ao DPAP B selvagem (NG *et al.* 1996).

A Figura 12 mostra esquematicamente o mecanismo do repórter *DAP2-*"tag". Naturalmente, o mRNA de *DAP2* é direcionado para o RE dependente da ligação a SRP, ou seja, totalmente direcionado pela via co-traducional, portanto, não existe conteúdo de DPAP B livre no citoplasma. No RE a proteína DPAP B sofre sucessivas glicosilações, alterando drasticamente seu peso molecular de 93 kDa para 120 kDa. Pela técnica de western blot, utilizando anticorpo anti-"tag", é possível avaliar a forma predominante de DPAP B. Enquanto uma linhagem selvagem apresenta apenas a forma madura de DPAP B (120 kDa – mDPAB B), mutantes com defeitos específicos na via co-traducional acumulam seu precursor no citoplasma (93 kDa – pDPAP B) (NG *et al.* 1996; ROBERTS *et al.* 1989).

As linhagens SVL14 (*tif51A-1*), SVL32 (*tif51A-3*), SVL82 (*TIF51A* – controle negativo), VZL1019 (*sec63-201* – controle positivo) e VZL1021 (*sec61-201* – controle

positivo) foram transformadas com o plasmídeo pVZ1110 (repórter *DAP2-"tag"*), cultivados em meio SC-ura, seletivo para o vetor, e submetidas à indução da expressão de DPAP B com adição de galactose 2% durante 3 horas. Para os mutantes de *TIF51A* e a linhagem selvagem, a mesma indução foi também realizada na temperatura não permissiva para cada mutante (37°C), de forma a analisar o defeito na modificação de DPAP B concomitante ao defeito em eIF5A.

Para realização do ensaio os extratos proteicos foram gerados e submetidos a eletroforese em SDS-PAGE. A Figura 13 mostra o resultado do western blot utilizando anticorpo anti-poliHis (Sigma) para detecção de DPAP B, tanto da forma precursora (pDPAP B \approx 90 kDa) quanto da forma madura (mDPAP B \approx 120 kDa). A proteína Dys1 foi utilizada como controle de carregamento da amostra. Como pode ser visto, a linhagem selvagem apresenta predominantemente a forma madura de DPAP B, provando que linhagens sem defeito na via co-traducional modificam DPAP B normalmente. Diferentemente da linhagem selvagem, os mutantes de *TIF51A* quando cultivados na temperatura não permissiva, apresentam uma redução na forma mDPAP B e um aumento relativo da forma pDPAP B, semelhantemente ao que ocorre nas linhagens controle, que apresentam defeito na translocação de proteínas pela via co-traducional. A presença de pDPAP B no alelo *tif51A-3* mesmo na temperatura permissiva pode ser explicado pela maior severidade deste alelo em comparação com o mutante *tif51A-1* (DIAS *et al.* 2008).



Figura 12. Esquema do funcionamento do repórter *DAP2***.** Defeitos de translocação pela via co-traducional levam ao acúmulo no citoplasma da forma precursora da proteína DPAP B, codificada por *DAP2*, com tamanho de aproximadamente 93 kDa. Entretanto, em linhagens selvagens ou que não apresentem defeito na via co-traducional a proteína é corretamente direcionada para o RE, onde sofre uma série de glicosilações chegando a forma madura, aumentando seu tamanho para aproximadamente 120 kDa.



Experimento feito em colaboração com a Dra. Danuza Rossi

Figura 13. Ensaio de translocação de DPAP B em mutantes de eIF5A. Ensaio com as linhagens SVL14 (*tif51A-1*), SVL32 (*tif51A-3*), SVL82 (*TIF51A* – controle negativo), VZL1019 (*sec63-201* – controle positivo) e VZL1021 (*sec61-201* – controle positivo). Essas linhagens foram transformadas com pVZ1110 (pGAL1-DAP2-6xHis) e cultivadas em meio seletivo contendo galactose, tanto na temperatura permissiva (30°C), quanto na não permissiva aos alelos (37°C) durante 3 horas. Após lise celular, 15 μg de proteína total foram utilizadas em ensaio de western blot utilizando o anticorpo anti-poliHis (Sigma), para detecção de pDPAP B (93 kDa) e mDPAP B (120 kDa). A proteína Dys1 foi utilizada como controle de carregamento das amostras (45 kDa).

4.4. Análise genética entre o mutante *srp102^{K511}* e *tif51A-3*.

O direcionamento de proteínas pela via co-traducional é mediado pelo complexo SRP (<u>Signal Recognition Particle</u>), cujo receptor está localizado na membrana do RE (Ng *et al.* 1996). Assim que o peptídeo nascente emerge do ribossomo, SRP liga-se a uma sequência específica de aminoácidos no próprio peptídeo nascente, conhecida como sequência sinal ou peptídeo sinal, e induz a parada na elongação da tradução até que o complexo ribossomo/peptídeo nascente/mRNA/SRP seja direcionado ao RE e ocorra ligação ao translocon (Johhnson and Van Waves 1999).

Em *Saccharomyces cerevisiae*, o receptor de SRP (SRP Receptor – SR) é composto por um heterodímero formado por Srp101 (SR α) e Srp102 (SR β), codificadas respectivamente por *SRP101* e *SRP102* (Ogg SC, *et al.* 1992). SR β contém um domínio transmembrana e é responsável por se ligar em SR α e mantê-la próxima da membrana do RE, sendo uma proteína com papel exclusivo na via co-traducional. Por ser um gene essencial, foi obtido o mutante condicional *srp102^{K511}*, que apresenta defeito de crescimento a partir de 34°C, para a realização de uma análise de interação genética sintética com o mutante *tif51A-3*.

Foi feito o cruzamento das linhagens SVL102 (tif51A-3) e VZL1181 ($srp102^{K51I}$) para obtenção de haplóides contendo ambos alelos mutantes e, em seguida, submetidos a teste de sensibilidade a temperatura. A Figura 14 mostra os controles das linhagens parentais, isto é, o controle de crescimento do mutante tif51A-3 e do mutante $srp102^{K51I}$ na temperatura de 33°C. Ainda, pode ser observada uma piora do fenótipo ts do mutante tif51A-3 quando na presença do mutante $srp102^{K51I}$, quando comparado com o haplóide carregando somente tif51A-3, indicando que os genes são sintético doentes. Esta análise genética foi realizada com seis tétrades tetratipos, ou seja, tétrades interessantes por apresentarem um haploide contendo as duas mutações, dois haploides que correspondem as células parentais e um haploide contendo as duas cópias selvagens dos genes de interesse. O resultado mostrado na Figura 14 foi revelado em cinco dessas tétrades.

linhagens parentais



resultado da análise genética



Figura 14. Análise da interação genética entre o mutante *tif51A-3* e o mutante *srp102^{K511}*. Diluições seriadas de 4 haplóides de 1 única tétrade obtida do mutante duplo foram aplicadas em meio YPD e incubadas por 2 dias nas temperaturas indicadas. As linhagens parentais SVL102 (*tif51A-3*) e VZL1181 (*srp102^{K511}*) foram usadas como controle de crescimento.

4.5. Análises genéticas entre o mutante *tif51A-3* e fatores do translocon da via cotraducional

O translocon é um complexo proteico necessário na membrana do RE para que as proteínas sejam internalizadas no lúmen desta organela e sejam corretamente modificadas e/ou direcionadas para a via secretória (Shao S. 2011). Atualmente, este complexo é bem caracterizado, sendo composto por vários componentes essenciais (Sec61, Sec63 e Sss1) e não essenciais (Sbh1, Sec71 e Sec72) (Falcone D. 2011).

A importância evolutiva da via co-traducional pode ser identificada pela sua complexidade e função em cada um dos domínios da natureza, isto é, praticamente ausente nos procariotos, menos importante nos eucariotos primitivos e majoritária nos eucariotos superiores (Connolly *et al.*, 1989, Crowley *et al.*, 1993). Em levedura, as proteínas Ssh1 (homólogo não essencial de Sec61), Sbh2 (homólogo não essencial de Sbh1) e Sss1 (subunidade essencial comum) forma um translocon alternativo, acessório ao translocon principal (Finke K, et al. 1996), composto principalmente por Sec61 (Robb A and Brown JD. 2001).

Sec61 possui 10 domínios transmembrana que são separados por "loops", alças não estruturadas, sendo denominados com números pares os que ficam voltando para fora do lúmen do RE (L2, L4, L6 e L8) (Cheng Z. *et al.*, 2005). Especialmente, as "loops" 6 e 8 são responsáveis pelas ligações eletrostáticas entre translocon e proteínas ribossomais da subunidade maior do ribossomo e, assim, estabilizar o ribossomo ativo no translocon, enquanto novos ciclos de elongação da tradução acontecem. Um alinhamento das sequências primárias de Sec61 e Ssh1 de *S. cerevisiae* revela que essas regiões essenciais para ligação no ribossomo são conservadas, como mostrado em destaque na Figura 15. Dada a importância do translocon acessório na translocação foram realizadas algumas análises de interação genética entre mutantes de *TIF51A* e componentes deste translocon.

Inicialmente, foi realizada a análise de interação genética sintética entre o mutante *tif51A-3* e *Assh1*. Para isso, foi feito o cruzamento da linhagem VZL447 (*tif51A-3::URA3*, *ssd1::LEU2*) com VZL1235 (*ssh1::KanMX4*, *SSD1*) para obtenção de diplóide duplo mutante. A análise foi realizada na presença de *SSD1*, pela razão explicada anteriormente. As tétrades obtidas deste diplóide foram submetidas a ensaio de sensibilidade a temperatura, juntamente com as linhagens de partida. A Figura 16 mostra uma das sete tétrades informativas analisadas que apresentaram o mesmo fenótipo, as quais revelam piora do defeito de crescimento do mutante *tif51A-3*, na ausência de *SSH1* já em 32°C, quando comparado com o haplóide carregando somente *tif51A-3* e alelo selvagem de *SSH1*. Ambos haplóides carregando cópia selvagem de *TIF51A* apresentam resistência na temperatura testada, como esperado. Portanto, o resultado revela que *TIF51A* e *SSH1* são sinteticamente doentes, também de maneira independente de *SSD1*.

Posteriormente, a análise de interação genética sintética entre o mutante *tif51A-3* e *Asbh1* foi realizada. Assim, foi feito o cruzamento da linhagem VZL447 (*tif51A-3::URA3*, *ssd1::LEU2*) com VZL1236 (*sbh1::KanMX4*, *SSD1*) para obtenção de diplóide duplo mutante. A análise também foi realizada na presença de *SSD1*. As tétrades com segregação gênica de interesse de tipo ditipo não parental, obtidas deste diplóide foram submetidas a ensaio de sensibilidade a temperatura, juntamente com as linhagens de partida. A Figura 17 mostra apenas uma das seis tétrades informativas analisadas com o mesmo fenótipo, a qual não evidencia qualquer alteração no crescimento do mutante *tif51A-3* quando na ausência de *SBH1*, em comparação com a linhagem de partida *tif51A-3*. Ambos haplóides carregando cópia selvagem de *TIF51A* apresentaram crescimento nas temperaturas testadas, como esperado. Dessa forma, o resultado mostra que não existe interação genética entre *TIF51A* e *SBH1*.

SEC61 SSH1	MSSNRVLDLFKPFESFLPEVIAPERKVPYNQKLIWTGVSLLIFLILGQIPLYGIVSSETS MSGFRLIDIVKPILPILPEVELPFEKLPFDDKIVYTIFAGLIYLFA-QFPLVGLPKATTP **. *::*:.**: .:**** * .*:*::*::* .: **:*: *:** *: .: *.	60 59
SEC61 SSH1	DPLYWLRAMLASNRGTLLELGVSPIITSSMIFQFLQGTQLLQIRPESKQDRELFQIA NVNDPIYFLRGVFGCEPRTLLEFGLFPNISSGLILQLLAGLKVIKVNFKIQSDRELFQSL **:*:**:.: ****:*: * *:*.:*:* * :::::: : :.******	117 119
SEC61 SSH1	QKVCAIILILGQALVVVMTGNYGAPSDLGLPICLLLIFQLMFASLIVMLLDELLSKGYGL TKVFAIVQYVILTNIFIFAGYFGDDLSVVQIGLINFQLVGAGIFTTLLAEVIDKGFGF ** **: : : :.:::* :* .**.: *: ***: *.::. ** *::.**:*:	177 177
SEC61 SSH1	GSGISLFTATNIAEQIFWRAFAPTTVNSGRGKEFEGAVIAFFH-LLAVRKDKKRALVE SSGAMIINTVVIATNLVADTFGVSQIKVGEDDQTEAQGALINLIQGLRSKHKTFIGGIIS .** ::.:. ** ::. :*. :: ** :**:* ::: * :: * ::.	234 237
SEC61 SSH1	AFYRTNLPNMFQVLMTVAIFLFVLYLQGFR ELPIRST (VRGQIGIYPIKLFYTSNTPIM AFNRDYLPNLTTTIIVLAIAIIVCYLQSVR ELPIRST (ARGTNNVYPIKLLYTGCLSVL ** * ***: .::.:** ::* **** **********	294 297
SEC61 SSH1	LQSALTSNIFLISQILFQKYPTNPLIRLIGVWGIRPGTQGPQMALSGLAYYIQPLMSL FSYTILFYIHIFAFVLIQLVAKNEPTHIICKIMGHYENANNLLAVPTFPLSLLAPPTSFF :. :: *.::::*:** ::* ::*:: *: *:	352 357
SEC61 SSH1	SEALLDPIKTIVYITFVLGSCAVFSKTWIEISGTSPRDIAK(FKDQGIVINGKRETSIYR KGVTQQPLTFITYSAFILVTGIWFADKWQAISGSSARDVALIFKDQGITLMGRREQNVAK :*:. *.* :*:* : *:* ***:*.**:* ****** .: *:***	412 417
SEC61 SSH1	ELKKIIPTAAAFGGATIGALSVGSDLLGTLGSGASILMATTTIYGYYEAAAKEGG ELNKVIPIAAVTGASVLSLITVIGESLGLKGKAAGIVVGIAGGFSLLEVITIEYQQSGGQ **:*:** **. *.:.: ::* :: ** **.*:: :: *. *. *	467 477
SEC61 SSH1	FTKNLVPGFSDLM 480 SALNQVLGVPGAM 490 : * * * *	

Figura 15. Alinhamento das sequências primárias de Sec61 e Ssh1. O alinhamento realizado com auxílio do programa ClustalW mostra com asterisco os aminoácidos conservados e quadrado os aminoácidos de mesmo grupo funcional. Os trechos de sequência referentes às "loops" 6 (azul) e 8 (verde) de Sec61 estão em destaque.

TIF51A/Δssh1
Image: Constraint of the second s

resultado da análise genética

linhagens parentais



Figura 16. Análise da interação genética entre o mutante *tif51A-3* **e** *Assh1***.** Diluições seriadas de 4 haplóides de 1 única tétrade a partir do diplóide mutante duplo, foram aplicadas em meio YPD e incubadas por 2 dias nas temperaturas indicadas. As linhagens parentais SVL447 (*tif51A-3::URA3, ssd1::LEU2*) e VZL1235 (*ssh1::KanMX4*) foram usadas como controle de crescimento.

linhagens parentais



resultado da análise genética



Figura 17. Análise da interação genética entre o mutante *tif51A-3* e Δsbh1. Diluições seriadas de 4 haplóides de 1 única tétrade a partir do diplóide mutante duplo, foram aplicadas em meio YPD e incubadas por 2 dias nas temperaturas indicadas. As linhagens parentais SVL447 (*tif51A-3::URA3, ssd1::LEU2*) e VZL1236 (*sbh1::KanMX4*) foram usadas como controle de crescimento.

5. CONCLUSÕES

 $\sqrt{\text{Através das interações genéticas com Snc2, Sec2, Msb3 e Msb4, é possível sugerir}}$ que eIF5A atue de forma indireta em diferentes etapas da via secretória;

 $\sqrt{\text{eIF5A}}$ tem um papel mais específico na translocação de proteínas para o RE;

 $\sqrt{}$ Mutantes de eIF5A não apresentam defeito na translocação de CPY, o que sugere que eIF5A não atue na via pós-traducional;

 $\sqrt{}$ Mutantes de eIF5A apresentam defeito na translocação de DPAP B, o que, juntamente com a interações genéticas entre eIF5A e componentes específicos da via co-traducional (Srp102 e Ssh1), sugerem um papel para eIF5A nesta via.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMBERG, D., 2005 Methods in yeast genetics, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp., edited by D. BURKE and S. JN.
- AUSUBEL, F. M., R. BRENT, R. E. KINGSTON, D. D. MOORE, J. G. SEIDMAN *et al.*, 2005 Current Protocols in Molecular Biology. Wiley Press, New York, NY.
- CLAGUE, M. J., 1998 Molecular aspects of the endocytic pathway. **Biochem J** 336 (Pt 2): 271-282.
- EGEA, P. F., R. M. STROUD and P. WALTER, 2005 Targeting proteins to membranes: structure of the signal recognition particle. **Curr Opin Struct Biol** 15: 213-220.
- FRIGIERI, M. C., M. V. JOAO LUIZ, L. H. APPONI, C. F. ZANELLI and S. R. VALENTINI, 2008 Synthetic lethality between eIF5A and Ypt1 reveals a connection between translation and the secretory pathway in yeast. Mol Genet Genomics 280: 211-221.
- FRIGIERI, M. C., G. M. THOMPSON, J. R. PANDOLFI, C. F. ZANELLI and S. R. VALENTINI, 2007 Use of a synthetic lethal screen to identify genes related to TIF51A in Saccharomyces cerevisiae. Genet Mol Res 6: 152-165.
- GUTHRIE, C., and G. R. E. FINK, 1991 Guide to Yeast Genetics. Academic Press, New York, NY.
- HALIC, M., and R. BECKMANN, 2005 The signal recognition particle and its interactions during protein targeting. Curr Opin Struct Biol 15: 116-125.
- JOHNSON, A. E., and M. A. VAN WAES, 1999 The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. Annu Rev Cell Dev Biol 15: 799-842.
- KEENAN, R. J., D. M. FREYMANN, R. M. STROUD and P. WALTER, 2001 The signal recognition particle. Annu Rev Biochem 70: 755-775.
- NG, D. T., J. D. BROWN and P. WALTER, 1996 Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. J Cell Biol 134: 269-278.
- PANZNER, S., L. DREIER, E. HARTMANN, S. KOSTKA and T. A. RAPOPORT, 1995 Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p. Cell 81: 561-570.
- RAPOPORT, T. A., K. E. MATLACK, K. PLATH, B. MISSELWITZ and O. STAECK, 1999 Posttranslational protein translocation across the membrane of the endoplasmic reticulum. Biol Chem 380: 1143-1150.
- ROBERTS, C. J., G. POHLIG, J. H. ROTHMAN and T. H. STEVENS, 1989 Structure, biosynthesis, and localization of dipeptidyl aminopeptidase B, an integral membrane glycoprotein of the yeast vacuole. **J Cell Biol** 108: 1363-1373.

- SEGEV, N., 2001 Ypt and Rab GTPases: insight into functions through novel interactions. Curr Opin Cell Biol 13: 500-511.
- SEGEV, N., and D. BOTSTEIN, 1987 The ras-like yeast YPT1 gene is itself essential for growth, sporulation, and starvation response. **Mol Cell Biol** 7: 2367-2377.
- TERZI, L., M. R. POOL, B. DOBBERSTEIN and K. STRUB, 2004 Signal recognition particle Alu domain occupies a defined site at the ribosomal subunit interface upon signal sequence recognition. Biochemistry 43: 107-117.
- WILLER, M., A. J. JERMY, G. J. STEEL, H. J. GARSIDE, S. CARTER *et al.*, 2003 An in vitro assay using overexpressed yeast SRP demonstrates that cotranslational translocation is dependent upon the J-domain of Sec63p. **Biochemistry** 42: 7171-7177.
- NYATHI, Y., WILKINSON, B. M., POOL, M. R., 2013 Co-translational targeting and translocation of proteins to the endoplasmic reticulum. **Biochim Biophys Acta** 11: 2392-402.

7. ANEXO I

O presente trabalho pode auxiliar, juntamente com a colaboração dos demais autores, na confecção do manuscrito apresentado a seguir, publicado na revista Amino Acids aceito em 01 de novembro de 2013. DOI 10.1007/s00726-013-1618-6.

ORIGINAL ARTICLE

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 © 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

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@fcfar.unesp.br

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

Published online: 05 December 2013

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
TIF51A	Gene encoding eIF5A in yeast
eEF2	Eukaryotic translation elongation factor 2
EFT2	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,

61

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 (Lia1 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	MAT <u>a</u> ade2 his3 leu2 trp1 ura3 can1 tif51A-1 (P83S)	Lab collection (Valentini et al. 2002)
SVL82	MAT <u>a</u> ade2 his3 leu2 trp1 ura3 can1	Lab collection
SVL613	MATa leu2 trp1 ura3 his3 dys1::HIS3 [DYS1/TRP1/CEN] (pSV520)	Lab collection
SVL614	MAT <u>a</u> leu2 trp1 ura3 his3 dys1::HIS3 [dys1-1 (W75R, T118A, A147T)/TRP1/CEN] (pSV730)	Lab collection (Galvão et al. 2013)
VZL1021	MATa ura3 leu2 his3 trp1 ade2 sec61-101	Davis Ng
VZL1246	MATa ura3 leu2 his3 trp1 ade2 can1 rpl25::HIS3 [RPL25-GFP/ LEU2/CEN]	Martin Pool
VZL1248	MAT <u>a</u> ura3 ade2 trp1 leu2 his3 sec65-1	Martin Pool
VZL1257	MATα his3 leu2 ura3 tif51A- 1::natMX4 can1 lyp1	Lab collection
VZL1292	MAT <u>a</u> ade2 his3 leu2 trp1 ura3 can1 [eft2 ^{H699K} /2µ/TRP1] (pVZ1370)	Lab collection
Y07842 ^a	MAT <u>a</u> his3 leu2 ura3 sec61- 2::kanMX4	Brenda Andrews
Y07900 ^a	MAT <u>a</u> his3 leu2 ura3 sec62- ts::kanMX4	Brenda Andrews
Y11000 ^a	MAT <u>a</u> his3 leu2 ura3 sec65- 1::kanMX4	Brenda Andrews
1623 ^a	MAT <u>a</u> his3 leu2 ura3	Brenda Andrews

^a Li et al. (2011)

Table 2 The plasmids used in this study		
Plasmid	Description	Source
pSV59	CEN, LEU2	Lab collection
pSV60	CEN, URA3	Lab collection
pSV65	2μ, URA3	Lab collection
pSV107	<i>TIF51A</i> , 2μ, URA3	Lab collection
pSV138	TIF51A, CEN, URA3	Lab collection
pSV146	TIF51A, CEN, LEU2	Lab collection
pSV364	2μ, URA3	Lab collection
pSV374	2μ, <i>LEU</i> 2	Lab collection
pVZ1064	SSCPY-URA3, HIS3, CEN	Davis Ng
pVZ1110	GAL1-DAP2-6xHis, 2μ, URA3	Open biosystems/Lab collection
pVZ1359	SEC65, SRP21, SRP72, 2μ, URA3	Colin J. Stirling
pVZ1360	SCR1, SRP14, SRP54, SRP68, 2µ, LEU2	Colin J. Stirling
pVZ1370	$eft2^{H699K}, 2\mu, TRP1$	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.

63

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 $1,200 \times g$ for 10 min, and the membranes were pelleted by centrifugation at $18,000 \times g$ 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 $256,000 \times g$ 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 SSCPY-Ura3 (pVZ1064) were plated onto SC-histidine (growth control) and SC-uracil to test the ability to grow due to the cytoplasmic accumulation of SSCPY-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 (SSCPY-Ura3), leading to the production of the fusion protein SSCPY-Ura3, which is artificially targeted to the ER exclusively via the posttranslational pathway (Ng et al. 1996). In a wild-type strain, SSCPY-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 SSCPY-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 SSCPY-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 (SRPindependent) 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 SCleu,-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 $eft2^{H699K}$. The protein eEF2 is a canonical translation elongation factor, and the $eft2^{H699K}$ 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,

D. Rossi et al.

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 over-expression 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



YEASTRACT Database (http://www.yeastract.com).

Fig. 4 Loss of eIF5A function causes the up-regulation of stressinduced chaperones. **a** Differentially expressed chaperones identified by mass spectrometry in 2D-DIGE proteomic maps of dysI-I 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 upregulated 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 ribosomenascent 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 $256,000 \times g$ centrifugation were immunoblotted against Hxk1, Rpl5, Sec65 and eIF5A using specific polyclonal antibodies. **b** The quantification of the Sec65 present in the ribosomeenriched fraction (P) normalized by the ribosomal protein Rpl5. The graph represents the relative values of Sec65/Rpl5 obtained from independent replicates, assuming the wildtype 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) 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 FACULAde 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

- 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

- 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
- 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
- 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

- 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
- 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
- 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
- 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

Aluno: Hermano Martins Bellato

Data: __/__/___

Assinatura

De acordo

Nome do orientador: Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini

Data: ___/__/___

Assinatura