

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**Análise Estrutural e Funcional da Interação
Física entre eIF5A e suas Enzimas
Modificadoras em *Saccharomyces cerevisiae***

VERIDIANA SOARES PEREIRA CANO

Orientador: Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, como parte dos requisitos
para a obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia



2008

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida: meus pais, que sempre acreditaram que a educação era o instrumento para que eu atingisse todos os meus objetivos; minha filha, que no meio dessa caminhada me ensinou o sentido da vida; meu irmão, companheiro para toda a vida; meu esposo, que dividiu o tempo e as dificuldades para que eu finalizasse com sucesso os meus estudos; e minha avó, cujo sorriso e amor abençoaram minha vida.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Vera, por cada palavra sábia, por cada gesto de amor, pela dedicação incondicional e pelo companheirismo descompromissado.

Ao meu pai Cláudio, pelo amor, carinho, serenidade, compreensão e apoio incondicional.

Aos meus pais, por juntos terem abdicado de muitos sonhos para que eu realizasse os meus.

À minha filha Amanda, pela força com que seu amor me moveu ao longo desta jornada.

Ao meu esposo Paulo, pelo amor e confiança em meus passos, pela importante participação nesta etapa da minha vida e pelo desprendimento em prol de minha alegria e realização pessoal.

Ao meu irmão Daniel, cujo sorriso, alegria e força de viver sempre serviram de modelo para a minha vida.

À minha cunhada Bianca, que se tornou amiga e companheira para a vida.

Aos meus avós e padrinhos Aldina e Henrique, pelo amor intenso e recíproco que sempre acompanhou e abençoou a minha vida.

À Zilda, pelos anos de dedicação, amor e carinho que a transformaram em uma das pessoas mais essenciais da nossa família.

À minha sogra Gilda, pelo apoio e carinho incondicionais.

Ao Prof. Dr. Sandro R. Valentini, pela orientação e por todas as oportunidades que me fizeram amadurecer como cientista e pessoa.

À Dra. Myung Hee Park, grande cientista, mentora e amiga.

À Dra. Glória M. Thompson, a quem serei eternamente grata pelos primeiros passos em ciência.

Ao Dr. Francisco Javier Medrano, cujos ensinamentos e intensa participação contribuíram significativamente para o avanço deste trabalho.

Aos companheiros de laboratório, José Rodrigo, Rogério, Carlos Alberto, Wagner, Ana Letícia, Ana Paula, Suzana, Alan, Mariana, Cleslei, Marcus, Aline, Marcelo, Daniella, Carlos Eduardo, Cláudia, Kátia, Maicon e Daniel, pela experiência diária de convívio social saudável e democrático.

Aos amigos Luciano, Camila e Ana Beatriz pelo companheirismo constante em todos os momentos de minha vida, compartilhando verdadeiramente cada detalhe dos meus passos.

Aos amigos de Bethesda Edith, Dra. Kim, Franziska, Jorn, Cristiane e Rogério pela receptividade, amizade e essencial ajuda na adaptação a outro laboratório e outra cultura.

Ao Dr. Silvio Gutkind, por me aceitar no seu instituto e acreditar no meu trabalho; e à todos os membros do seu laboratório, pelo companheirismo durante os seis meses de convívio.

À Paul, Andrea e Liliana, pelo convívio diário no exterior e pelo entusiasmo de viver que me fez acreditar no impossível.

À FCF-UNESP, IQ-UNESP, FAPESP, CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro e institucional para a realização desse trabalho.

À Deus, pela incessante fé na vitória.

*“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas
que já têm a forma do nosso corpo e esquecer os caminhos
que nos levam sempre aos mesmos lugares.*

*É o tempo da travessia e se não ousarmos fazê-la,
teremos ficado para sempre à margem de nós mesmos.”*

(Fernando Pessoa)

*“Nada mais difícil, quando se procura um caminho, que
descobrir se a força que nos impulsiona vem do desejo de fugir
ou do desejo de verdadeiramente buscar. Talvez, nem haja
diferença entre esses desejos.”*

(autor desconhecido)

RESUMO

Em um rastreamento por duplo-híbrido, dois parceiros físicos de eIF5A foram identificados: Dys1 e Lia1 (Ligante de eIF5A). Lia1 foi identificada mais tarde como desoxihipusina hidroxilase. As interações físicas evidenciadas por duplo-híbrido foram confirmadas por copurificação. Mapeamento do sítios de ligação de eIF5A revelou que ambos os domínios N- e C-terminal podem ligar-se a Dys1, enquanto que o domínio C-terminal é suficiente para a ligação com Lia1. Pela primeira vez foi demonstrado *in vivo* que a estrutura secundária em α -hélice, presente na extremidade N-terminal da proteína Dys1, pode modular a atividade da enzima através do impedimento estérico da entrada do substrato eIF5A no sítio ativo. Experimentos de inativação gênica mostraram que, em contraste com eIF5A e Dys1, Lia1 não é essencial para a viabilidade celular. Superexpressão do gene *LIA1* não suprime o fenótipo temperatura-sensível de mutantes condicionais de eIF5A. Além disso, os alelos de *TIF51A* não são sinteticamente letais com a deleção de *LIA1*.

Assim como previamente demonstrado para a enzima humana DOHH, o ferro também é essencial para a atividade hidroxilásica de Lia1. O sítio ativo de Lia1 é compreendido pelos resíduos de aminoácidos H79, E80, H112, E113, E116, H237, E238, H270 e E271. A proteína recombinante é uma mistura de formas ligada e não ligada ao metal, as quais foram separadas por gel nativo ou gel filtração, sugerindo um raio hidrodinâmico maior para a apoenzima. A forma mais alongada adotada por Lia1 na ausência do metal foi confirmada por ensaios de “quenching” da fluorescência do triptofano por acrilamida e SAXS. Além da alteração conformacional e inativação da enzima, a perda do metal levou à maior instabilidade de Lia1 na desnaturação térmica ou química. Os resultados obtidos em conjunto mostram que, além de manter a estabilidade da proteína, a reatividade do substrato no sítio ativo é determinada pela arquitetura da proteína, ou seja, uma estrutura globular compacta formada como resultado da quelatação do metal.

Finalmente, com o intuito de investigar as características de eIF5A requeridas para sua atividade, mutações pontuais ou deleções no gene que codifica a proteína humana eIF5A-1 foram testadas quanto à habilidade em complementar a linhagem de *S. cerevisiae* nocaute para ambos os genes *TIF51A* e *TIF51B*. Mutantes com substituições no sítio de hipusinação ou ao redor dele (K47D, G49A, K50A, K50D, K50I, K50R, G52A and K55A), ou com deleção de 21 aminoácidos em cada domínio, não foram capazes de complementar a linhagem nocaute para eIF5A. Através do uso de uma linhagem que produz eIF5A instável e/ou formas truncadas desta proteína, novas evidências são apresentadas para uma função primária de eIF5A na síntese protéica.

ABSTRACT

In a two-hybrid screen, two eIF5A binding partners were identified: Dys1 and Lia1 (Ligand of eIF5A). Lia1 was further identified as deoxyhypusine hydroxylase. The two-hybrid interactions were confirmed by GST pulldown. Mapping binding sites for these proteins revealed that both eIF5A domains can bind to Dys1, whereas the C-terminal domain is sufficient to bind Lia1. We demonstrate for the first time *in vivo* that the N-terminal α -helix of Dys1 can modulate enzyme activity by impairing eIF5A interaction. Gene disruption studies showed that, in contrast to the essential nature of eIF5A and Dys1, Lia1 is not essential for cell viability. Overexpression of *LIA1* gene does not suppress temperature-sensitivity of eIF5A mutants. Moreover, these *TIF51A* alleles are not synthetically lethal with a knockout strain of *LIA1*. Recently, It was shown that *LIA1* encodes the enzyme responsible for the final step of hypusine formation, the metalloenzyme deoxyhypusine hydroxylase. As the hydroxylation step in hypusine synthesis is not required for eIF5A activity, lack of genetic interactions between these two genes is expected.

As previously demonstrated for the human enzyme DOHH, iron is also essential for Lia1 hydroxylase activity. Lia1 active site is formed by amino acid residues H79, E80, H112, E113, E116, H237, E238, H270 and E271. The recombinant protein is a mixture of iron-bound and iron-free forms, which were separated by native gel or gel filtration, suggesting a bigger hydrodynamic radius for the apoenzyme. The elongated shape adopted by Lia1 in the absence of the metal was confirmed by acrylamide quenching of tryptophan intrinsic fluorescence and SAXS. In addition to the conformational change and enzyme inactivation, loss of iron led to higher instability of Lia1 during thermal or chemical unfolding. Taken together, the results show that, besides the ability of iron to keep the stability of the protein, substrate reactivity in the active site of the enzyme is determined by protein architecture, a globular compact structure formed by virtue of metal chelation.

Finally, to investigate the features of eIF5A required for its activity, point mutations or deletions in the gene encoding human eIF5A-1 were tested for the ability to support growth of a *S. cerevisiae* eIF5A null strain. Growth supporting activity was abolished in mutants with substitutions at or near the hypusine modification site (K47D, G49A, K50A, K50D, K50I, K50R, G52A and K55A) or with truncation of 21 amino acids from either N- or C-terminus. By using a strain which produces highly unstable eIF5A and/or mutated forms of this protein, we present new evidences for a primary function of eIF5A in protein synthesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Via de biossíntese do resíduo de aminoácido hipusina no precursor de eIF5A	20
Figura 2. Análise do grau de conservação da sequência de aminoácidos de eIF5A e suas duas enzimas modificadoras, desoxihipusina sintase e desoxihipusina hidroxilase	21
Figura 3. Esquema representativo da evolução de eIF5A e suas enzimas modificadoras	23
Figura 4. Modelo estrutural da proteína eIF5A	25
Figura 5. Estruturas tridimensionais das enzimas modificadoras de eIF5A	27
Figura 6. Rastreamento por duplo-híbrido utilizando eIF5A como isca	69
Figura 7. Análise das etapas da produção e purificação da proteína de fusão GST-Lia1 e avaliação do anticorpo policlonal anti-Lia1 produzido em coelho	72
Figura 8. Confirmação das interações físicas reveladas no rastreamento por duplo-híbrido de eIF5A por copurificação	74
Figura 9. Identificação do sítio de ligação da proteína eIF5A às proteínas Dys1 e Lia1	76
Figura 10. Efeito inibitório da α -hélice localizada na extremidade N-terminal de Dys1 na interação com eIF5A	78
Figura 11. Nocauteamento do gene <i>LIA1</i> em <i>S. cerevisiae</i>	81
Figura 12. Análise de interação genética entre <i>TIF51A</i> e <i>LIA1</i>	82
Figura 13. Localização subcelular de Lia1	84
Figura 14. Produção e purificação de Lia1	89
Figura 15. Análise da purificação da proteína Lia1 recombinante por gel filtração	92
Figura 16. Alinhamento entre as sequências primárias das proteínas Lia1 e DOHH	96
Figura 17. Análise mutacional da proteína Lia1	97
Figura 18. Avaliação da ligação dos mutantes de Lia1 ao substrato eIF5A por duplo-híbrido	98

Figura 19.	Propriedades espectroscópicas da proteína Lia1 recombinante	103
Figura 20.	Ensaio de “quenching” da fluorescência intrínseca do triptofano da proteína Lia1	104
Figura 21.	Efeitos do pH na atividade catalítica e na estrutura terciária de Lia1	106
Figura 22.	Avaliação da estabilidade da estrutura secundária da proteína Lia1 por dicroísmo circular mediante estresse térmico	109
Figura 23.	Curvas de titulação com GdnHCl para avaliar o processo de desnaturação química da proteína Lia1	111
Figura 24.	Análise da estabilidade térmica de Lia1 monitorada por dicroísmo circular na região de UV distante (190-250nm)	114
Figura 25.	Alterações conformacionais na proteína Lia1 induzidas por agentes quelantes e pH	116
Figura 26.	Curvas experimentais processadas a partir dos dados coletados nos experimentos de espalhamento de raios-X em baixo ângulo – SAXS	119
Figura 27.	Determinação da estrutura de Lia1 por SAXS	120
Figura 28.	Avaliação da produção da proteína de fusão LexA-Dys1 e teste de auto-ativação dos genes repórteres <i>HIS3</i> e <i>lacZ</i> pela proteína de fusão	124
Figura 29.	Confirmação da ligação do plasmídeo <i>LEU2</i> com os marcadores do sistema de duplo-híbrido His ⁺ e β-gal ⁺ dos clones verdadeiros revelados no rastreamento de Dys1 (“plasmid linkage”)	125
Figura 30.	Avaliação da produção da proteína de fusão LexA-Lia1 e teste de auto-ativação dos genes repórteres <i>HIS3</i> e <i>lacZ</i> pela proteína de fusão	129
Figura 31.	Confirmação da ligação do plasmídeo <i>LEU2</i> com os marcadores do sistema de duplo-híbrido His ⁺ e β-gal ⁺ dos clones verdadeiros revelados no rastreamento de Lia1 (“plasmid linkage”)	130
Figura 32.	Análise do crescimento de linhagens de <i>S. cerevisiae</i> produzindo as proteínas eIF5A humanas selvagem e mutadas e da estabilidade das proteínas	134

Figura 33. Análise das proteínas humanas mutadas como substratos para as enzimas desoxihipusina sintase e desoxihipusina hidroxilase <i>in vitro</i>	138
Figura 34. Análise das proteínas heIF5A truncadas	139
Figura 35. Efeitos da depleção de eIF5A nas taxas de crescimento celular e síntese de macromoléculas (DNA, RNA e proteína) ..	143
Figura 36. Efeitos da depleção de eIF5A no crescimento e síntese de proteínas em <i>S. cerevisiae</i>	144

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Linhagens de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas neste estudo	62
Tabela 2. Plasmídeos utilizados nos experimentos deste estudo	63
Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos deste estudo	65
Tabela 4. Rastreamento por duplo-híbrido de eIF5A	68
Tabela 5. Constantes de Stern-Volmer para o “quenching” da fluorescência de Lia1 por acrilamida	102
Tabela 6. Rastreamento por duplo-híbrido de Dys1	123
Tabela 7. Rastreamento por duplo-híbrido de Lia1	128
Tabela 8. Resumos das características das proteínas eIF5A mutadas de humanos	137

ABREVIações UTILIZADAS

Å	ângstrom
°C	graus Celcius
λ	comprimento de onda
μ Ci	microCurie
μ g	micrograma
μ F	microFaraday
μ L	microlitro
μ M	micromolar
Ω	Ohm
Brij	polioxietilenoglicol dodecil éter
BSA	soroalbumina bovina
CD	“circular dichroism” (dicróismo circular)
cDNA	DNA complementar
cm	centímetro
C-terminal	carboxi-terminal
DAPI	4'-6-diamino-2-fenilindol
DIC	“differential interference contrast” (microscopia de contraste de fase)
DLS	“dynamic light scattering” (espalhamento dinâmico de luz)
DMSO	dimetilssulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTPs	mistura de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dATP, dCTP, dGTP e dTTP)
D.O.	densidade ótica
dpm	desintegrações por minuto
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
eIF5A-Lis	precursor inativo de eIF5A contendo o resíduo de lisina
eIF5A-Dhp	forma intermediária da proteína eIF5A contendo o resíduo de aminoácido desoxihipusina
eIF5A-Hpu	forma madura da proteína eIF5A contendo o resíduo de aminoácido

	hipusina
EMS	etilmetanossulfonato
FITC	isotiocianato de fluoresceína
5-FOA	ácido 5-flúor-orótico
FPLC	“fast performance liquid chromatography” (cromatografia líquida de rápida execução)
g	grama
GdnHCl	cloridrato de guanidina
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
kb	quilobase
kDa	quilodalton
kV	quilovolt
L	litro
LB	meio Luria-Bertani
M	molar
mAU	miliabsorbância
mg	miligrama
min	minutos
mL	mililitro
mM	milimolar
mRNA	RNA mensageiro
NAD	“nicotinamide adenine dinucleotide” (nicotinamida adenina dinucleotídeo)
NES	sequência de exportação nuclear
ng	nanograma
nm	nanômetro
NMD	“Non-sense mediated decay” (decaimento mediado por códon non-sense)
N-terminal	amino-terminal
ORF	“Open Reading Frame” (janela aberta de leitura)
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
pb	pares de bases
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PBST	PBS com Tween 20

PCI	fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (24:25:1)
PCR	“Polymerase Chain Reaction” (reação de polimerase em cadeia)
PEG	polietilenoglicol
pH	potencial hidrogeniônico
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonila
pmol	picomol
Rg	raio de giro
RNA	ácido ribonucléico
RNase	ribonuclease
SAXS	“small-angle X-ray scattering”(espalhamento de raios-X em baixo ângulo)
SC	meio sintético completo para levedura
SDS	dodecil sulfato de sódio
S-SPO	“super-sporulation” (meio para esporulação de levedura)
TAE	Tris-acetato EDTA
TCA	ácido tricloroacético
TE	Tris-EDTA
Tris	tris-hidroximetilaminometano
Triton X-100	polietilenoglicol-terc-octilfenil éter
Tween 20	monolaurato de polioxietilenosorbitana
U	unidade enzimática
UTR	“untranslated region” (região não traduzida de mRNA)
UV	ultravioleta
V	volt
YNB	“yeast nitrogen base” (base nitrogenada para levedura)
YPD	“yeast extract, peptone, dextrose” (meio rico para levedura contendo extrato de levedura, peptona e glicose)
YPG	“yeast extract, peptone, galactose” (meio rico para levedura contendo extrato de levedura, peptona, galactose)
xg	aceleração gravitacional
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1. Material	34
3.2. Métodos	34
3.2.1- Subclonagem de DNA	34
3.2.1.1- <i>Digestão de plasmídeos</i>	34
3.2.1.2- <i>Desfosforilação do vetor</i>	34
3.2.1.3- <i>Purificação de inserto e vetor</i>	34
3.2.1.4- <i>Reação de ligação</i>	35
3.2.2- Clonagem empregando a reação de polimerase em cadeia (PCR)	35
3.2.2.1- <i>Reação de PCR</i>	35
3.2.2.2- <i>Clonagem do produto de PCR</i>	36
3.2.3- Transformação bacteriana por choque térmico	36
3.2.3.1- <i>Competência</i>	36
3.2.3.2- <i>Transformação</i>	36
3.2.4- Eletroporação de bactérias	37
3.2.4.1- <i>Competência</i>	37
3.2.4.2- <i>Transformação</i>	37
3.2.5- Isolamento de DNA plasmidial a partir de bactéria em pequena escala – Miniprep	38
3.2.6- Transformação de leveduras	38
3.2.7- Transformação de leveduras de alta eficiência	39
3.2.8- Isolamento de DNA plasmidial a partir de leveduras	39
3.2.9- Preparo de DNA genômico de levedura	40
3.2.10- Rastreamento por duplo-híbrido	40
3.2.11- Ensaio de β-galactosidase	42
3.2.12- Sequenciamento de DNA	42
3.2.13- Teste de crescimento após diluição seriada	42
3.2.14- Ensaio de expressão do gene de proteína de fusão com GST em bactéria	43

3.2.15- Produção em larga escala e purificação de proteína de fusão com GST em bactéria	44
3.2.16- Produção de anticorpo policlonal em coelho	44
3.2.17- Western blot	45
3.2.18- Ensaio de copurificação (GST pulldown)	46
3.2.19- Geração das formas truncadas de eIF5A a partir do vetor de duplo-híbrido pBTM116	47
3.2.20- Nocauteamento de <i>LIA1</i> em <i>S. cerevisiae</i>	48
3.2.21- Cruzamento e esporulação de leveduras	48
3.2.22- Dissecção e caracterização de tétrades	49
3.2.23- Imunofluorescência indireta	49
3.2.24- Indução do gene de proteína de fusão com GFP em levedura	50
3.2.25- Produção em larga escala e purificação de proteína em fusão com cauda de histidinas	51
3.2.26- Ensaios de cristalização	53
3.2.27- Eletroforese em condições não-desnaturantes (PAGE nativo)	53
3.2.28- Obtenção do substrato protéico com alta radioatividade específica para os ensaios de hidroxilação <i>in vitro</i>	53
3.2.29- Ensaio da atividade hidroxilásica	54
3.2.30- Análise do conteúdo de metal de Lia1	54
3.2.31- Geração de novos alelos de Lia1 por meio da técnica de mutagenese sítio-dirigida	55
3.2.32- Purificação em pequena escala das proteínas Lia1 mutadas	55
3.2.33- Ensaios espectroscópicos	56
3.2.33.1- Dicroísmo Circular	56
3.2.33.2- Fluorescência intrínseca	57
3.2.33.3- Ensaios de “quenching” da fluorescência do triptofano	57
3.2.33.4- Cálculo de F_{app} dos processos de desnaturação térmica e química	57
3.2.34- Espalhamento de raios-X em baixo ângulo – SAXS	58
3.2.35- Espalhamento dinâmico de luz – DLS	58
3.2.36- Obtenção de curvas de crescimento	59
3.2.37- Ensaio de hipusinação <i>in vitro</i>	59
3.2.38- Ensaio de síntese protéica	60

3.2.39- Ensaio de síntese de DNA e RNA	61
4. RESULTADOS	66
4.1- Identificação de fatores celulares que interagem fisicamente com eIF5A por meio do rastreamento por duplo-híbrido	66
4.2- Produção de anticorpo policlonal anti-Lia1 em coelho	70
4.3- Confirmação da interação física entre as proteínas reveladas no rastreamento de duplo-híbrido de eIF5A por meio de ensaios de copurificação	73
4.4- Identificação dos sítios de ligação de eIF5A às proteínas Dys1 e Lia1	75
4.5- Efeito inibitório da α -hélice presente na extremidade N-terminal de Dys1 na interação com eIF5A	77
4.6- Análise de interações genéticas entre <i>TIF51A</i> e <i>LIA1</i>	79
4.7- Localização subcelular de Lia1	83
4.7.1- Localização subcelular por imunofluorescência indireta	83
4.7.2- Localização subcelular de GFP-Lia1	83
4.8- Análise estrutural e funcional da proteína Lia1	85
4.8.1- Ensaios de cristalização utilizando a proteína Lia1	85
4.8.2- Lia1 é uma metaloenzima constituída por ferro	90
4.8.3- Identificação de resíduos de aminoácidos de Lia1 requeridos para a atividade hidroxilásica, coordenação do metal e formação do complexo enzima-substrato	93
4.8.4- Caracterização estrutural de Lia1 por meio de ensaios espectroscópicos	99
4.8.5- Efeitos do pH na atividade catalítica e na estrutura terciária de Lia1	105
4.8.6- Análise dos processos de desnaturação térmica e química da proteína Lia1	107
4.8.7- Análise da estabilidade térmica da proteína Lia1 frente a variação de pH e compostos quelantes	112
4.8.8- Análise das alterações na estrutura terciária de Lia1 promovidas pela presença de agentes quelantes e variação de pH	115

4.8.9- Determinação estrutural de Lia1 nas formas ligada e livre de metal por SAXS	117
4.9- Identificação de fatores celulares que interagem fisicamente com as enzimas Dys1 e Lia1 por meio de rastreamentos por duplo-híbrido	121
4.9.1- Rastreamento por duplo-híbrido utilizando a proteína Dys1 como isca	121
4.9.2- Rastreamento por duplo-híbrido utilizando a proteína Lia1 como isca	126
4.10- Análise mutacional da proteína eIF5A de humanos em S. cerevisiae	131
4.10.1- Identificação de resíduos de aminoácidos críticos para a atividade da proteína eIF5A humana	131
4.10.2- Análise da estabilidade das proteínas eIF5A mutadas	132
4.10.3- Análise das proteínas humanas mutadas como substratos para as enzimas desoxihipusina sintase e desoxihipusina hidroxilase	135
4.10.4- Efeito das deleções nos domínios N- ou C-terminal de eIF5A na estabilidade e atividade da proteína	139
4.10.5- Efeitos da depleção de eIF5A no crescimento e síntese de DNA, RNA e proteínas em S. cerevisiae	141
5. DISCUSSÃO	145
5.1- Caracterização funcional da interação física entre eIF5A e suas enzimas modificadoras, Dys1 e Lia1	145
5.2- Análise estrutural e funcional da proteína Lia1	149
5.3- Análise mutacional da proteína eIF5A de humanos em S. cerevisiae	155
6. CONCLUSÕES	162
REFERÊNCIAS	163
ANEXO I	176
ANEXO II	182

1- INTRODUÇÃO

O fator de início de tradução 5A de eucariotos (eIF5A), inicialmente chamado de eIF4D, foi originalmente purificado a partir de ribossomos extraídos de lisados de reticulócitos de coelho (Benne e Hershey, 1978). A denominação dada a esta proteína decorreu da sua atividade estimulatória na síntese de metil-puomicina, um ensaio *in vitro* utilizado como modelo para avaliar fatores envolvidos na formação da primeira ligação peptídica durante a tradução (Benne e Hershey, 1978; Park *et al.*, 1993b).

Em *Saccharomyces cerevisiae* dois genes homólogos codificam para eIF5A, *TIF51A* (*HYP2*) e *TIF51B* (*HYP1*). Estes genes estão localizados em cromossomos distintos (Wohl *et al.*, 1992) e são regulados reciprocamente por oxigênio ou heme (Mehta *et al.*, 1990; Zitomer e Lowry, 1992; Schwelberger *et al.*, 1993). Desta forma, este tipo de regulação gênica determina qual isoforma estará disponível na célula sob condições de alta ou baixa tensão de oxigênio. Leveduras em aerobiose expressam somente *TIF51A*, cuja atividade é essencial para o crescimento celular nestas condições (Schnier *et al.*, 1991; Wohl *et al.*, 1993; Valentini *et al.*, 2002). Em condições anaeróbicas, por sua vez, é observada a presença exclusiva do produto codificado por *TIF51B* (Schnier *et al.*, 1991; Kang *et al.*, 1992; Tome e Gerner, 1997). Como esperado, deleção de *TIF51B* não influencia as taxas de crescimento de células haplóides em aerobiose (Wohl *et al.*, 1993). Apesar dos dados sugerirem que os produtos dos genes *TIF51A* e *TIF51B* possam ser requeridos para a expressão específica de genes aeróbicos ou anaeróbicos, respectivamente, o significado funcional da regulação recíproca dos genes codificadores de eIF5A em levedura é obscuro.

Assim como em levedura, as células humanas também possuem duas isoformas de eIF5A, as quais são designadas eIF5A-1 e eIF5A-2. No entanto, a maioria destas células expressa constitutivamente apenas o gene da isoforma eIF5A-1. Surpreendentemente, a superexpressão do mRNA de eIF5A-2 foi observada em certas linhagens de células cancerígenas, em contraste com a produção fraca desta isoforma apenas em testículos e cérebro. Diante deste dado, foi sugerido que eIF5A-2 seja codificado por um oncogene potencial (Guan *et al.*, 2001; Clement *et al.*, 2003).

As proteínas codificadas pelos dois genes de *S. cerevisiae* são altamente similares, compartilhando 90% de identidade, sendo que em relação à proteína de humanos, esta identidade é de 63%, o que sugere sua importância em processos celulares comuns (Schnier *et al.*, 1991). A caracterização funcional das isoformas humanas eIF5A-1 e eIF5A-2, as quais compartilham 84% de identidade, revelou que ambas as proteínas podem garantir o crescimento de uma linhagem de levedura em que ambos os genes *TIF51A* e *TIF51B* foram deletados (Clement *et al.*, 2003). Este fato mostra que eIF5A humana e de levedura não são apenas conservadas, mas são funcionalmente intercambiáveis *in vivo*. Desta forma, a demonstração de a proteína humana substituir completamente a proteína de levedura reforça a importância de eIF5A em processos celulares básicos.

eIF5A sofre duas modificações pós-traducionais. A primeira delas consiste na fosforilação de um resíduo de serina acetilado no N-terminal (Kang *et al.*, 1993; Klier *et al.*, 1993). A remoção deste resíduo revelou que a forma não fosforilada deste fator é suficiente para promover o crescimento de células *tif51AΔ* haplóides (Klier *et al.*, 1993), sugerindo que a fosforilação de eIF5A não seja essencial para o seu funcionamento *in vivo*. A segunda modificação deste fator é única na célula e corresponde à formação do resíduo de aminoácido hipusina a partir de um resíduo específico de lisina em eIF5A (Chen e Liu, 1997; Park *et al.*, 1997).

O aminoácido hipusina [N^ε-(4-amino-2-hidroxibutil)-lisina] foi descoberto a partir de extratos de cérebro bovino em 1971 por Shiba e colaboradores em sua busca por aminoácidos básicos e incomuns na célula. Após determinação de sua estrutura química, o nome hipusina foi proposto com base na relação estrutural desse aminoácido com porções dos compostos hidroxiputrescina e lisina (Shiba *et al.*, 1971). No entanto, a origem do grupamento 4-amino-2-hidroxibutil, o mecanismo de sua síntese e a fonte de hipusina eram totalmente desconhecidos. Em 1981, Park e colaboradores descobriram que a cadeia lateral do aminoácido hipusina era derivada da poliamina espermidina e que a síntese de hipusina tratava-se de uma modificação pós-traducional a ocorrer em uma única proteína da célula (Park *et al.*, 1981). Mais tarde, o fator de início de tradução eIF4D foi revelado como a única proteína a possuir o aminoácido hipusina na célula (Cooper *et al.*, 1983).

Não existe mecanismo conhecido para a síntese de hipusina como aminoácido livre. Do contrário, a formação do aminoácido hipusina em eIF5A ocorre através da ação sequencial de duas enzimas, desoxihipusina sintase e

desoxihipusina hidroxilase (Figura 1) (Park *et al.*, 1982; Murphey e Gerner, 1987; Park, 1996). A enzima desoxihipusina sintase (Dys1 em levedura, DHS em humano) catalisa a transferência do grupo aminobutil da poliamina espermidina para o amino grupo livre de um resíduo específico de lisina no precursor de eIF5A (K51 em levedura, K50 em humano) para formar um intermediário contendo o resíduo desoxihipusina. O intermediário formado é então hidroxilado pela enzima desoxihipusina hidroxilase (Lia1 em levedura, DOHH em humano) (Park *et al.*, 1993b; Park *et al.*, 1997), completando a síntese de hipusina e consequentemente a maturação de eIF5A (painel A). No entanto, quatro etapas são necessárias até a formação de desoxihipusina pela desoxihipusina sintase: (I) desidrogenção da poliamina espermidina dependente de NAD, (II) clivagem e transferência do grupo 4-aminobutil para um resíduo de lisina do sítio ativo (K329 na enzima humana) para formar um intermediário imino covalentemente ligado à enzima, (III) transferência do grupo 4-aminobutil para a lisina alvo em eIF5A e (IV) redução do intermediário pela enzima ligada a NADH para formar o resíduo de desoxihipusina (painel B, etapas I-IV) (Joe *et al.*, 1997; Wolff *et al.*, 1997). Interessantemente, todas as reações catalizadas pela desoxihipusina sintase são reversíveis (setas pontilhadas). Esta enzima pode alternativamente acomodar em seu sítio ativo putrescina, ao invés de eIF5A-Lys, como acceptor do grupamento aminobutil levando à formação de homoespermidina (painel B, etapas V e VI). No entanto, o alto valor de K_m (1,12mM) para putrescina sugere que a síntese de hipusina seja preferencial (K_m eIF5A = 1,5 μ M) (Park *et al.*, 2003).

eIF5A e suas enzimas modificadoras foram preservadas ao longo da evolução (Figura 2). Em especial, a sequência de aminoácidos de eIF5A ao redor do sítio de hipusinação é extremamente conservada nas diferentes espécies, revelando a importância desta modificação ao longo da evolução (Park *et al.*, 1993a). Essa região conservada é formada por uma sequência invariável de doze resíduos de aminoácidos: STSKTG-**hipusina**-HGHAK (Magdolen *et al.*, 1994; Chen e Liu, 1997). A enzima desoxihipusina sintase, por sua vez, também apresenta uma sequência de aminoácidos altamente conservada, e as enzimas das diferentes espécies apresentam propriedades catalíticas similares. (Kang *et al.*, 1995). A hipusina é produzida imediatamente após a tradução do RNA mensageiro de eIF5A e não é alterada ou removida até que a proteína eIF5A seja degradada (Park *et al.*, 1993a).

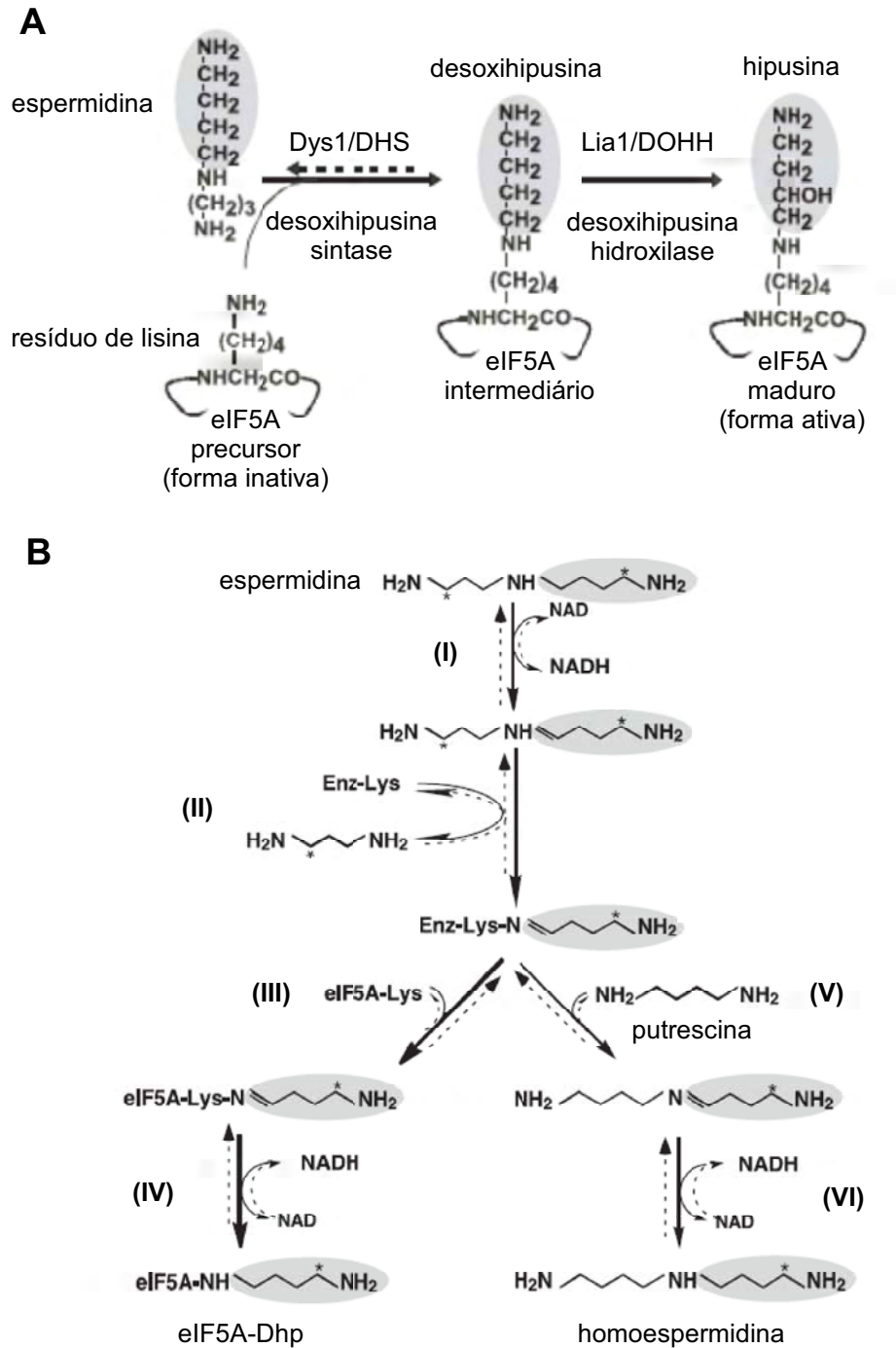


Figura 1- Via de biossíntese do resíduo de aminoácido hipusina no precursor de eIF5A. A: Esquema simplificado da modificação pós-traducional de eIF5A. A porção 4-aminobutil proveniente da poliamina espermidina está sombreada e é transferida ao resíduo de lisina do precursor inativo de eIF5A por meio da ação da enzima desoxihipusina sintase (Dys1 em levedura, DHS em humanos). O intermediário resultante, agora contendo desoxihipusina, é posteriormente hidroxilado pela enzima desoxihipusina hidroxilase (Lia1 em levedura, DOHH em humanos) o que resulta na ativação de eIF5A. As cadeias laterais da lisina, desoxihipusina e hipusina estão sendo mostradas. **B:** Mecanismo da reação catalisada pela desoxihipusina sintase. As vias que levam à formação de desoxihipusina e homoespermidina estão mostradas por setas sólidas. Ao contrário da reação de hidroxilação, as etapas catalisadas pela enzima desoxihipusina sintase são reversíveis (setas pontilhadas).

A. eIF5A*alça de hipusinação*

MADDLD FETGDAGASAT FPMQCSALRKNGFVVLKGRPCKIVEMSTSKTGKHGAKVHLVGIDIFTGKKYEDICPSTHMDVNT⁸⁴
 KRND FQLIGIQDGYLSLLQDSGEVREDLRLPEGDLGKETEQKYDCGEEILITVLSAMTEEA AAVAKAMAK¹⁵⁴

B. Desoxihipusina sintase

MEGLEREAPAGALA AVLKHSSTLPPESTQVRGYDFNRGNRYRALEAFCTTGFGATNFGRVQQVNAMIEKKLEPLSQDEIQHADLTQS⁹⁰
 RRPLTSCITIFLGYTSNLISSGIRETIRYLVOHNMVDVLVTTAGGV EEDLIKCLAPTYLGEFSLRGKELRENGINRIGNLLVPNENYCKFE¹⁸⁰
 DWLMPILDQVMQONTEGVKWTPSKMIARLGKEINNPE SVYYWAQKNHIPVFSALTDGSLGDMIFFHSYKNPGLVLDIVEDLRLINTQA²⁷⁰
 IFAKCTGMIIILGGGVVKKHIANANLMRNGADYAVYINTAQEFDGSDSGARPDEAVSWGKIRVDAQPVKVYADASLVFPLLVAETFAQKMD³⁶⁰
 AFMHEKNED³⁶⁹

C. Desoxihipusina hidroxilase

-----1-----2-----
 MVTEQEVD AIGQTLVDPKQPLQARFRALFTLRGLGGPGAIAWISQAFDDDSALLKHE LAYCLGQM⁶⁷
 -----3-----4-----
 ARAIPMLVDVLQDTRQEP MVRHEAGEALGATGDPEVLEILKQYSSDPVIEVAETQLAVRRLEWLQHGGEPAAGPYLSVDPA¹⁵¹
 -----5-----6-----
 PAERDVGRRLREALLDSESRPLFERYRAMFALRNAGGEEAALALAEGLHCGSALFRHEVGYVLGQLQH²¹⁸
 -----7-----8-----
 EAAVPQLAAALARCTENPMVRHECAEALGAIARPAALQAHADDPERVVRESCEVALDMEYEHETGRAFOYADGLEQLRGAPS³⁰²

Figura 2- Análise do grau de conservação da sequência de aminoácidos de eIF5A e suas duas enzimas modificadoras, desoxihipusina sintase e desoxihipusina hidroxilase. As sequências das proteínas humanas estão sendo mostradas. As cores representam os diferentes graus de conservação dos resíduos: vermelho, 100% de identidade; laranja a amarelo, substituições conservativas (por exemplo, F/Y; D/E; K/R/L/V/I/M; T/S/A/G/C/S) com >80% a >50% de identidade na sequência, respectivamente; branco, identidade insignificante. O diagrama está baseado nas proteínas eucarióticas (40 para eIF5A, 36 para DHS e 14 para DOHH) escolhidas entre uma variedade de espécies desse reino. Resíduos críticos para a ligação de substratos ou cofatores estão indicados pelos símbolos sob os resíduos (# NAD; * espermidina; o ferro; x eIF5A-Dhp). As repetições “HEAT” presentes na enzima desoxihipusina hidroxilase estão sendo mostradas por linhas pontilhadas (Wolff *et al.*, 2007).

Desta forma, a modificação é essencialmente irreversível. Assim como nenhuma outra enzima catalisa tal reação, as enzimas modificadoras de eIF5A parecem não possuir outro substrato. O grande mistério da formação de hipusina em eIF5A reside no fato de que a natureza desenvolveu um mecanismo pós-traducional singular, o qual envolve duas enzimas específicas para modificar uma única proteína essencial para a sobrevivência da célula.

O fato de eIF5A ser a única proteína eucariótica que sofre hipusinação evidencia uma atividade biológica fundamental para este fator. A importância da hipusinação para a atividade da proteína eIF5A foi mostrada a partir da observação de que eIF5A humana recombinante, não hipusinada, foi incapaz de estimular a síntese *in vitro* de metionil-puromicina (Smit-Mcbride *et al.*, 1989). Entretanto, quando este precursor foi modificado *in vitro* para a forma hipusinada, a proteína resultante tornou-se ativa neste ensaio (Park, 1989). Células nas quais a hipusinação foi bloqueada, por substituição da lisina alvo (K51R) ou deleção do gene que codifica para desoxihipusina sintase, tornaram-se inviáveis (Schnier *et al.*, 1991). Desta forma, demonstrou-se a essencialidade da hipusinação para a viabilidade celular (Park *et al.*, 1993a; Park *et al.*, 1997).

Hipusina, eIF5A e as duas enzimas modificadoras são encontradas essencialmente em todas as células eucarióticas, de leveduras a mamíferos. Arquea, por sua vez, possuem ambos o homólogo denominado aIF5A e a primeira enzima modificadora desoxihipusina sintase. No entanto, nenhuma hidroxilase capaz de modificar especificamente aIF5A foi identificada até o momento nas espécies desse grupo de bactéria (Park, 2006). Curiosamente, foi descrito que desoxihipusina, hipusina ou ambos ocorrem em algumas espécies (Bartig *et al.*, 1990), restando a dúvida de como hipusina pode ser então formada nestes organismos. Em contraste com eucariotos e arquea, não existe evidência para a ocorrência dos componentes da via de formação da hipusina em eubactérias, as quais possuem um homólogo distante de eIF5A, o fator de alongação P (EF-P) (Hanawa-Suetsugu *et al.*, 2004). EF-P é uma proteína essencial em bactérias que estimula a atividade peptidil-transferase de ribossomos (Glick e Ganoza, 1975). Assim como eIF5A, EF-P estimula a síntese de metil-puromicina *in vitro*, sugerindo, além da similaridade estrutural, uma conservação funcional entre EF-P e eIF5A (Park, 2006). Esses dados sugerem que eIF5A e suas enzimas modificadoras evoluíram sequencialmente, mas de forma independente (Figura 3).

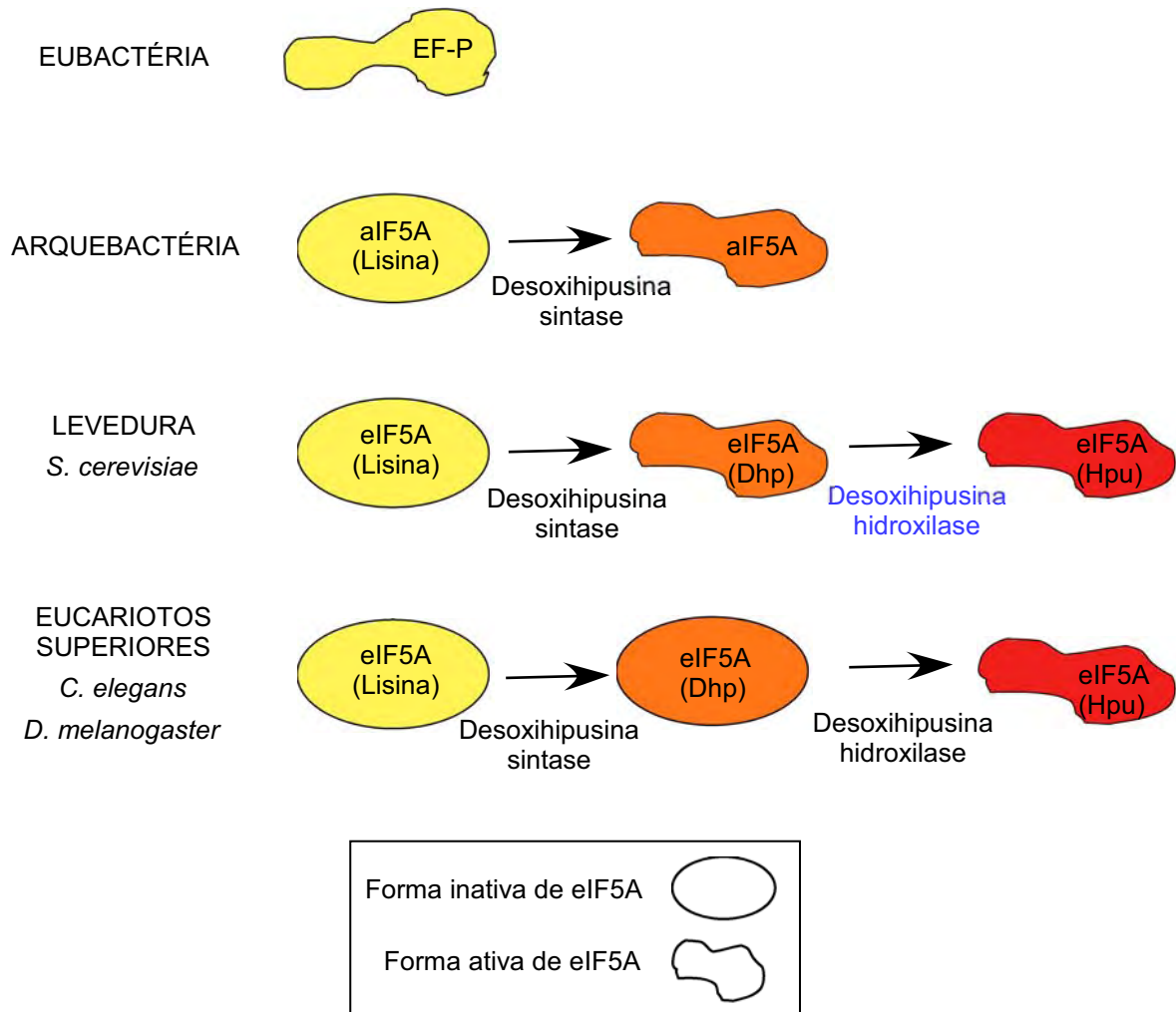


Figura 3- Esquema representativo da evolução de eIF5A e suas enzimas modificadoras. A proteína eIF5A é altamente conservada ao longo da evolução sendo encontrada de arquea a eucariotos. No entanto, eIF5A não ocorre em eubactérias, as quais contêm o homólogo distante, o fator de alongação EF-P. Ao contrário da desoxihipusina sintase, nenhuma hidroxilase é encontrada nas espécies de arquea. Em levedura a etapa de hidroxilação não é essencial (azul). Em contraste, em organismos eucarióticos multicelulares, eIF5A não é capaz de desempenhar sua atividade biológica se não for totalmente convertido a hipusina.

eIF5A é uma proteína ácida (pI 5,4), constituída de 157 aminoácidos (em *S. cerevisiae*) e com massa molecular de 18–21kDa, dependendo da espécie (Park *et al.*, 1997). As estruturas tridimensionais de homólogos de eIF5A de três espécies de arquea e de dois protozoários foram determinadas e revelaram várias características comuns (Kim *et al.*, 1998; Peat *et al.*, 1998; Yao *et al.*, 2003). De acordo com estes estudos, eIF5A apresenta dois domínios predominantemente compostos por folhas- β (Figura 4). A comparação destes domínios com outras proteínas de estruturas tridimensionais conhecidas mostra que o domínio N-terminal possui um dobramento classificado como “Translation Protein SH3-like motif”, também presente em várias proteínas ribossomais e fatores de alongação da tradução. O resíduo de lisina que sofre hipusinação (K50 em humanos) está localizado na extremidade de uma alça exposta presente no domínio N-terminal. A transferência do grupo 4-amino-2-hidroxibutil a este aminoácido adiciona uma longa cadeia lateral básica no local da formação do aminoácido hipusina, o qual é rodeado por resíduos básicos e hidrofílicos (STSKTG-**hipusina**-HGHA). O domínio C-terminal, por sua vez, é similar a dobramentos de proteínas as quais se ligam a ácidos nucleicos de fita simples (“Single-stranded Oligonucleotide Binding Fold”) (Gough *et al.*, 2001). De fato, dois outros estudos correlacionam a função de eIF5A com a ligação a mRNAs (Xu e Chen, 2001; Xu *et al.*, 2004). No entanto, estudos adicionais ainda necessitam ser realizados com o intuito de estabelecer um papel de eIF5A na interação física direta com mRNAs.

A enzima desoxihipusina sintase, por sua vez, trata-se de uma enzima tetramérica composta por quatro subunidades idênticas de aproximadamente 40kDa na proteína humana e 43kDa na proteína de levedura. As enzimas desses dois organismos compartilham 68% de identidade na sequência de aminoácidos (Wolff *et al.*, 2007). Os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da enzima, responsáveis pela ligação do substrato espermidina (* vermelho) e do cofator NAD (# azul), mostrados no painel B da Figura 2, foram identificados por meio da obtenção do cristal da enzima humana DHS em complexo com NAD (Liao *et al.*, 1998), sendo seus papéis posteriormente confirmados por mutagênese sítio-dirigida (Lee *et al.*, 2001). Como mostrado no painel B da Figura 2, todos os aminoácidos críticos para a ligação da espermidina (* vermelho) são totalmente conservados ao longo da evolução. Como discutido anteriormente, a lisina 329 (resíduo em branco) tem um papel essencial na formação de um intermediário enzima-substrato covalentemente ligado no sítio ativo

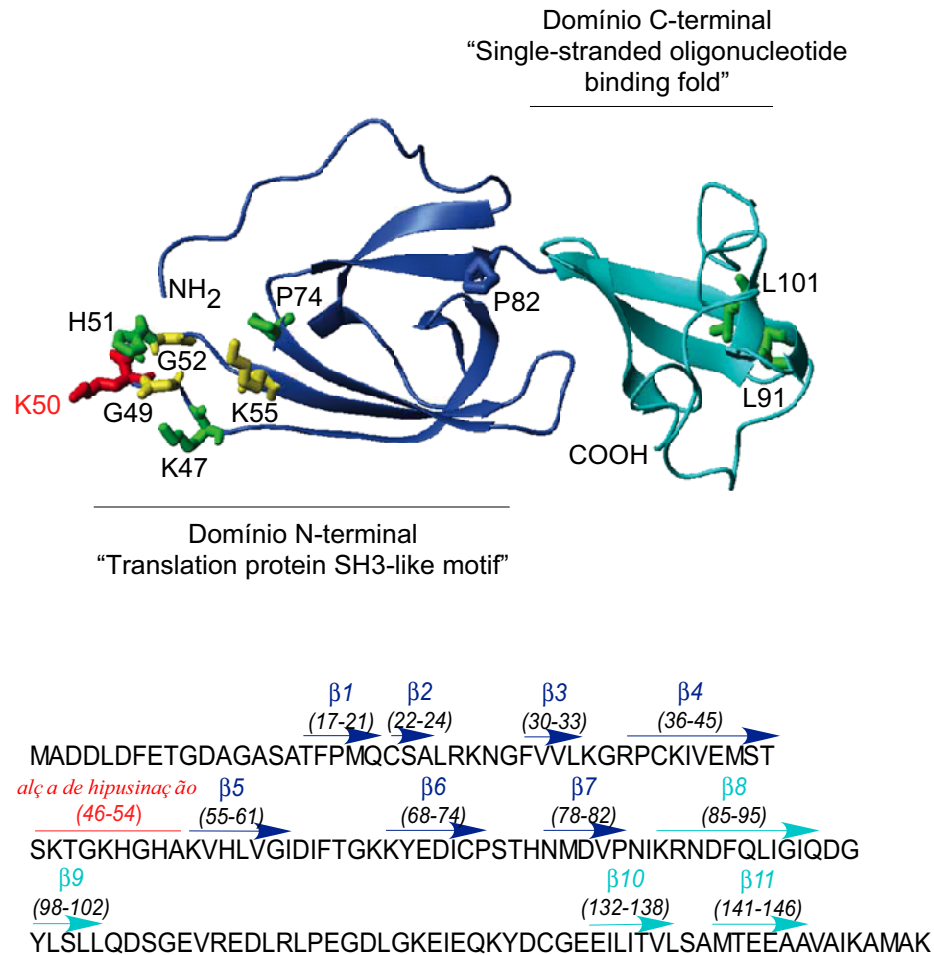
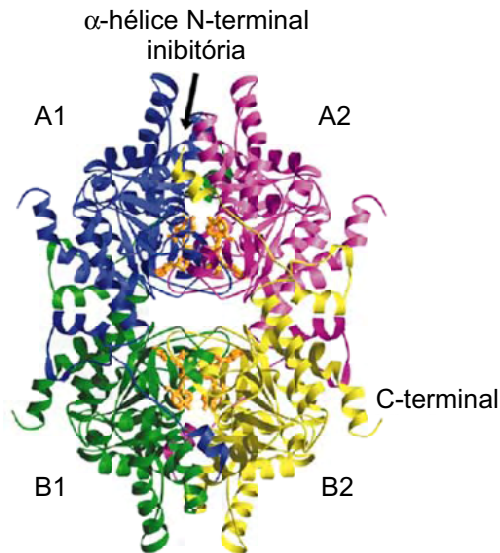


Figura 4- Modelo estrutural da proteína eIF5A. A estrutura tridimensional apresentada refere-se à proteína humana eIF5A-1 modelada por Facchiano e colaboradores (Facchiano *et al.*, 2001). Estão sendo mostrados os dois domínios N- e C-terminal, compostos predominantemente por folhas-β, com suas classificações estruturais. O local da modificação pós-traducional (lisina 50 em vermelho) está localizado em uma alça exposta presente no domínio N-terminal. Como será apresentado mais adiante, os resíduos coloridos em laranja e verde correspondem a resíduos que sofreram substituições para alanina resultando em inibição e redução do crescimento de células nocauteadas para os genes *TIF51A* e *TIF51B*, respectivamente.

da enzima, sem o qual a síntese de desoxihipusina no precursor eIF5A não ocorre (Joe *et al.*, 1997; Wolff *et al.*, 1997). Na estrutura tetramérica da enzima, dois dímeros firmemente associados contribuem com quatro sítios ativos na enzima, dois em cada interface do dímero. No entanto, a entrada de cada sítio ativo mostra-se bloqueada por uma α -hélice de duas voltas presente na extremidade N-terminal de um monômero (painel A, Figura 5). Uma vez que os cristais de DHS foram obtidos em condições de alta força iônica e pH ácido (Liao *et al.*, 1998), este dado sugere que a estrutura tridimensional apresentada seja correspondente à forma inativa da enzima.

Antes da determinação da estrutura da enzima desoxihipusina sintase, o sítio de ligação da espermidina havia sido investigado por meio da utilização de análogos de poliaminas com o intuito de identificar inibidores desta enzima (Jakus *et al.*, 1993). GC7 (1,7-diaminoheptano) mostrou ser o inibidor mais potente da desoxihipusina sintase *in vitro* e em cultura de diversas linhagens celulares (Park *et al.*, 1994; Lee e Folk, 1998), levando ao bloqueio do crescimento celular por causa da completa inibição da síntese de hipusina. Mais tarde, a estrutura de DHS complexada com o seu inibidor competitivo mais potente foi obtida. Os cristais desta vez foram crescidos sob condições mais próximas das fisiológicas, ou seja, baixa força iônica e pH neutro (Umland *et al.*, 2004). A α -hélice N-terminal não pôde ser detectada no mapa de densidade eletrônica, sugerindo que esta era de fato a forma ativa da enzima devido à falta de impedimento estérico da entrada do sítio ativo.

Apesar dos requerimentos catalíticos e estruturais da enzima desoxihipusina sintase estarem muito bem definidos na literatura, o segundo passo da formação do aminoácido hipusina em eIF5A é pouco compreendido. Isto é devido ao fato do gene da enzima desoxihipusina hidroxilase ter permanecido desconhecido até 2006 (Park *et al.*, 2006). A sequência de aminoácidos da proteína humana DOHH, codificada pelo gene *HLRC1*, é 48% idêntica e 61% similar à proteína codificada pelo gene *YJR070C* de levedura. Estudos de predição de estrutura secundária revelaram que DOHH pertence à família das proteínas que contêm “HEAT repeats”. As repetições “HEAT” são encontradas em uma série de proteínas citoplasmáticas, incluindo as quatro proteínas cujos nomes contribuem para sua definição, “Huntingtin, Elongation factor 3, protein phosphatase 2A e IOR1”. A estrutura secundária predita para uma sequência individual consiste de um par de α -hélices separadas por uma região não



B

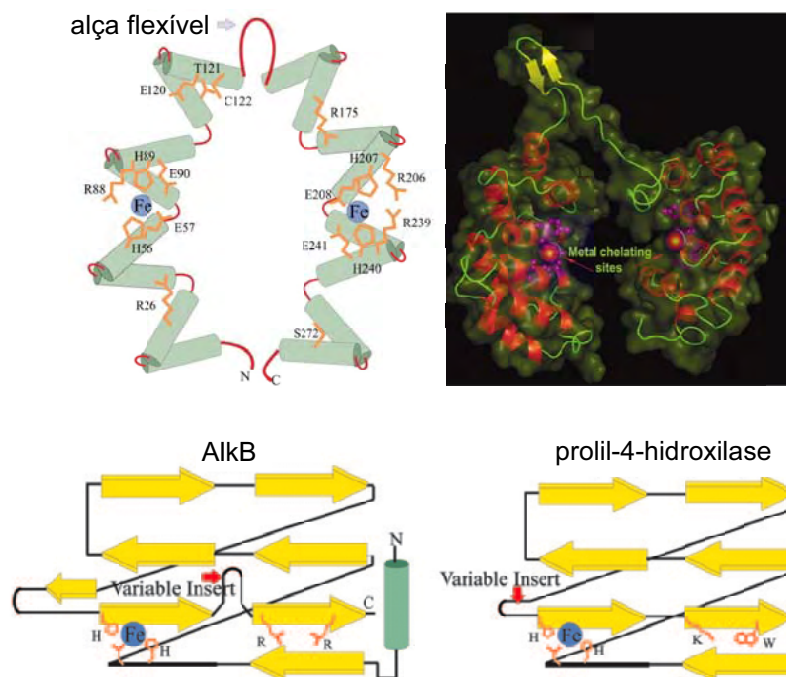


Figura 5- Estruturas tridimensionais das enzimas modificadoras de eIF5A. A: Estrutura cristalizada da enzima desoxihipusina sintase de humanos. O tetrâmero contém dois pares de dímeros firmemente associados, A1A2 e B1B2. Cada monômero está representado de uma cor (A1 azul, A2 rosa, B1 verde e B2 amarelo). Duas moléculas de NAD (mostradas em laranja) estão ligadas em cada interface do dímero. A estrutura secundária em α -hélice presente na extremidade N-terminal de um monômero está apontada por uma seta (Liao *et al.*, 1998). **B:** Estrutura modelada da enzima desoxihipusina hidroxilase de humanos. Os pares de resíduos de histidina (H) e ácido glutâmico (E) conservados coordenando o ferro estão sendo mostrados (painel superior). Oito repetições “HEAT”, caracterizadas por um par de α -hélices conectados por uma alça pequena, distribuem-se na proteína formando uma díade simétrica, em que ambos os domínios N- e C-terminal são conectados por uma alça flexível. Diagramas esquemáticos de duas dioxigenases DSBH: AlkB e prolin-4-hidroxilase (painéis inferiores esquerdo e direito, respectivamente) (Park *et al.*, 2006).

helicoidal podendo conter aproximadamente 37-50 resíduos de aminoácidos. Normalmente, estas estruturas repetem-se inúmeras vezes ao longo da proteína, revelando uma conformação alongada caracterizada por uma camada dupla de α -hélices. Desta forma, foi proposto que as repetições “HEAT” poderiam estar mediando um grande número de interações proteína-proteína (Groves *et al.*, 1999). Por exemplo, as repetições “HEAT” presentes na importina- β formam um sítio de ligação tanto para importina- α quanto para Ran-GTP (Enenkel *et al.*, 1996). A modelagem por homologia de DOHH revelou uma estrutura superhelicoidal consistindo de oito repetições “HEAT” organizadas em uma díade simétrica (repetições 1-4 no domínio N-terminal e 5-8 no domínio C-terminal) (painel B, Figura 5) (Park *et al.*, 2006). Dois sítios potenciais de coordenação de ferro, constituídos por resíduos de histidina e ácido glutâmico extremamente conservados ao longo da proteína, foram identificados de acordo com similaridades com sequências consenso presentes em outras hidroxilases. O papel desses resíduos foi avaliado por mutagênese sítio-dirigida. A substituição única desses aminoácidos para alanina resultou na completa perda de atividade enzimática, e em alguns mutantes, na dissociação do ferro de seus sítios de coordenação (Kim *et al.*, 2006). No entanto, a dependência de ferro para a atividade hidroxilásica já havia sido demonstrada por Csonga em 1986 (Csonga *et al.*, 1996). Neste estudo, foi demonstrado que dentre diferentes metais testados, somente a adição de Fe(II) e Fe(III) foi capaz de estimular a atividade endógena da enzima desoxihipusina hidroxilase, e de reativar a enzima previamente tratada com o agente quelante ciclopirox, resultando na recuperação completa de sua atividade enzimática após a perda do metal. Apesar da semelhança no sítio de ligação do metal, a estrutura predita para DOHH difere por completo da maioria das hidroxilases previamente estudadas; por exemplo, as dioxigenases dependentes de Fe(II) denominadas DSBH (“double-stranded β helix), AlkB e prolil-4-hidroxilase, as quais compartilham uma estrutura conhecida por “ β -jelly roll” como pode ser observado no painel B da Figura 5 (Park *et al.*, 2006).

Como dito anteriormente, foi sugerido que eIF5A atuasse no início da síntese protéica, promovendo a formação da primeira ligação peptídica. Apesar do requerimento por desoxihipusina/hipusina ter sido bastante estridente no ensaio de metil-puromicina (Smit-Mcbride *et al.*, 1989), a designação desta proteína como um fator geral do início da tradução foi comprometida por ensaios de depleção *in vivo*. A

análise da taxa de síntese protéica durante a rápida depleção de eIF5A em *S. cerevisiae* revelou uma redução de apenas 30% na taxa de síntese protéica total (Kang e Hershey, 1994). Diante deste dado, foi alternativamente sugerido que este fator poderia ser seletivamente requerido para a tradução de uma classe específica de RNA mensageiros, como por exemplo, aqueles envolvidos na transição G1/S do ciclo celular. Essa hipótese foi levantada, pois vários autores mostraram que o bloqueio de qualquer uma das etapas envolvidas na hipusinação de eIF5A leva a uma inibição da proliferação celular de diferentes linhagens tumorais de células de mamíferos (Hanauske-Abel *et al.*, 1994; Park *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1996; Shi *et al.*, 1996b; Tome e Gerner, 1997). Ainda, a observação de que em *S. cerevisiae*, após a depleção de eIF5A, ocorre um aumento de células estacionadas na fase G1 do ciclo celular (Kang e Hershey, 1994), aliada ao fato de sua expressão estar aumentada em linfócitos T ativados (Bevec *et al.*, 1994) reforçam o envolvimento de eIF5A na progressão do ciclo celular.

Apesar de ter sido proposta a participação de eIF5A no transporte nucleocitoplasmático da proteína Rev de HIV-1 (Ruhl *et al.*, 1993; Bevec *et al.*, 1996; Bevec e Hauber, 1997; Liu *et al.*, 1997; Hofmann *et al.*, 2001), outros estudos não concordam com a atribuição dessa função ao fator eIF5A (Henderson e Percipalle, 1997; Shi *et al.*, 1997; Lipowsky *et al.*, 2000; Valentini *et al.*, 2002). Dentre esses estudos, uma análise da localização subcelular de Rev utilizando diferentes linhagens de células de mamíferos, revelou que esta proteína, produzida transientemente, está localizada no núcleo, e que eIF5A apresenta uma localização citoplasmática que coincide com a do retículo endoplasmático (Shi *et al.*, 1996a). Ainda, a localização de Rev é alterada completamente, em contraste com a de eIF5A que permanece inalterada, quando é realizado o tratamento com inibidores da transcrição (actinomicina D e dicloro-D-ribofuranosilbenzimidazol, por exemplo). Entretanto, tratamento com puomicina, um inibidor da tradução conhecido por causar a dissociação dos ribossomos, alterou a localização subcelular de eIF5A em 30% das células, mas não de Rev nem de calnexina, uma proteína residente do retículo endoplasmático. Esses dados são consistentes com a associação de eIF5A ao retículo endoplasmático através dos ribossomos e sugerem que esta proteína não sofre translocação nucleocitoplasmática como ocorre com Rev (Shi *et al.*, 1997). Em levedura foi demonstrado que eIF5A apresenta uma localização citoplasmática com maior concentração perinuclear, confirmando os dados de localização obtidos

em células de mamíferos (Valentini *et al.*, 2002). Esta localização perinuclear não é alterada em leveduras contendo um alelo temperatura-sensível de *XPO1*, gene que codifica para CRM1/exportina1, na temperatura não permissiva. Assim como acontece em mamíferos, o bloqueio da ação de exportina1 em leveduras leva a um acúmulo de Rev no núcleo. Desta forma, esses dados associam eIF5A com o retículo endoplasmático e compromete o envolvimento de eIF5A com a exportação de proteínas contendo NES através do receptor CRM1/exportina1, como no caso da proteína Rev de HIV-1 (Valentini *et al.*, 2002).

O fator eIF5A também pode estar envolvido no decaimento de RNA mensageiros, pois foi demonstrado que o mutante temperatura-sensível do gene *TIF51A*, *ts1159*, acumula mRNAs sem o capacete 7-metil-guanosina na temperatura não permissiva (Zuk e Jacobson, 1998). Ainda, produção de um mutante da proteína humana eIF5A na linhagem de levedura nocaute para eIF5A levou ao acúmulo de uma série de mensageiros que normamente são degradados pela via NMD (Schrader *et al.*, 2006).

Um dos genes codificadores de eIF5A em leveduras, *TIF51A*, foi clonado por complementação do fenótipo temperatura-sensível de um dos mutantes inicialmente denominados de *npl2* (nuclear protein localization). Foi mostrado que os três mutantes do grupo de complementação *npl2* apresentam mutações no gene *TIF51A*. Esses novos mutantes condicionais de *S. cerevisiae* para o gene *TIF51A* foram descritos e caracterizados em nosso laboratório, passando a ser chamados *tif51A-1* (P83S), *tif51A-2* (P83L) e *tif51A-3* (C39Y e G118D) (Valentini *et al.*, 2002). A caracterização desses alelos mostrou que todos são mutantes temperatura-sensíveis com perda de função na temperatura não permissiva devido à rápida degradação de eIF5A (Valentini *et al.*, 2002) (Dias *et al.*, manuscrito submetido). Assim como o mutante *ts1159*, os mutantes *tif51A-1*, *tif51A-2* e *tif51A-3* também acumulam mRNAs na temperatura não permissiva. Entretanto, os nossos resultados sugerem que esse possível papel de eIF5A seja secundário, pois o fenótipo de inibição do crescimento não se correlaciona diretamente com o defeito na degradação de RNA mensageiros (Valentini *et al.*, 2002).

Diversos genes foram isolados por nosso laboratório como supressores em alto número de cópias do fenótipo de sensibilidade à temperatura do mutante *tif51A-1*. Dentre os genes isolados, destacam-se *PKC1*, *GIC1* e *ZDS1* (Valentini *et al.*, 2002; Zanelli e Valentini, 2005). O encontro desses genes levou à sugestão de uma

nova via de sinalização celular a partir de Pkc1. Esta proteína participa da resposta a choque hiposmótico desencadeada pelas proteínas Wsc1, 2 e 3, cujos genes também foram supressores de *tif51A-1*. Os supressores *PKC1*, *GIC1* e *ZDS1* são importantes para a polaridade celular em *S. cerevisiae*, um processo essencial para a progressão do ciclo celular deste organismo. De fato, os mutantes de eIF5A apresentaram defeitos na polarização do citoesqueleto de actina na temperatura não-permissiva, evidenciando a correlação de eIF5A com a progressão do ciclo celular, como já discutido anteriormente (Zanelli e Valentini, 2005). Adicionalmente, um rastreamento de letalidade sintética foi realizado utilizando o mutante temperatura-sensível *tif51A-3* e revelou o gene *YPT1* como sendo sinteticamente letal com *TIF51A* (Frigieri *et al.*, 2007). O encontro da letalidade sintética entre *tif51A-3* e *ypt1* é interessante, pois passou a envolver direta ou indiretamente a proteína eIF5A com a via secretória, uma vez que a proteína Ypt1 trata-se de uma GTPase envolvida com o trânsito vesicular do retículo endoplasmático para o Golgi. O dado de que os genes supressores *PKC1*, *WSC1*, *WSC2* e *WSC3* estão relacionados ao correto funcionamento da via secretória (Gustin *et al.*, 1998) fortalece o envolvimento de eIF5A nesta via do metabolismo celular. Interessantemente, foi observado que mutações na via secretória direcionam a uma rápida e específica atenuação do início de tradução. Isto ocorre como resposta primária da célula para preservação de energia e prevenção de acúmulo de proteínas não localizadas adequadamente devido à inativação do transporte vesicular (Deloche *et al.*, 2004). Diante deste dado, foi sugerido por nosso laboratório que eIF5A e Ypt1 trabalhem juntas na célula para garantir a síntese protéica apropriada e a secreção das proteínas necessárias para a formação do novo broto durante a fase G1/S em levedura.

Apesar da estimulação *in vitro* da síntese de metil-puromicina, não é certo se eIF5A funciona como um fator de início de tradução *in vivo* e se sua atividade celular é limitada a esse efeito. Ainda, através de diferentes estudos, eIF5A foi relacionado com proliferação celular, transporte nucleocitoplasmático, decaimento de mRNAs, integridade da parede celular e polarização do citoesqueleto de actina. Embora a função de eIF5A como fator de início de tradução nunca ter sido claramente demonstrada, a comprovação recente de que eIF5A associa-se com ribossomos ativamente engajados na tradução trouxe esta proteína de volta ao cenário da tradução (Jao e Chen, 2006; Zanelli *et al.*, 2006). Interessantemente, os defeitos

observados nos perfis polissomais de mutantes sensíveis à temperatura sugerem um papel para eIF5A nos passos de elongação da tradução ao invés do início da tradução (Zanelli *et al.*, 2006). Dados mais recentes obtidos em nosso laboratório mostram que mutantes condicionais de eIF5A, cujas proteínas são estáveis na temperatura não permissiva, apresentam defeitos claros na síntese de proteínas após passagem para a temperatura restritiva de crescimento (Dias *et al.*, manuscrito submetido). Entretanto, o mecanismo crucial pelo qual eIF5A afeta a tradução e se este efeito ocorre na tradução global ou de um grupo específico de mRNAs são questões ainda em aberto.

Uma vez que o entendimento de um sistema biológico requer a determinação da interação entre suas partes constituintes, e a caracterização das interações entre as proteínas desse sistema pode contribuir para o entendimento da função específica de cada fator, a análise de interações proteína-proteína empregando o sistema de duplo-híbrido tem sido amplamente utilizada na elucidação da função de diferentes fatores no metabolismo celular (Brachmann e Boeke, 1997; Parrish *et al.*, 2006). Dessa forma, a utilização do sistema de duplo-híbrido pode levar à identificação de prováveis parceiros físicos da proteína eIF5A. Espera-se que o estudo da relação funcional entre os possíveis parceiros físicos possa contribuir para o entendimento das funções celulares que eIF5A e suas proteínas ligantes exercem e dos mecanismos que regem sua regulação.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo o estudo da relação estrutura-função de eIF5A e suas enzimas modificadoras, Dys1 e Lia1, com a finalidade de melhor dissecar os elementos críticos para a formação do aminoácido hipusina e para o papel biológico desempenhado por estas proteínas no metabolismo celular.

2.2- Objetivos específicos

- Identificação de fatores celulares que interagem fisicamente com eIF5A por meio do rastreamento por duplo-híbrido
- Confirmação da interação física dos produtos dos genes *DYS1* e *LIA1* com a proteína eIF5A por ensaios de copurificação
- Determinação dos sítios de ligação de eIF5A às proteínas Dys1 e Lia1
- Determinação da localização subcelular da proteína Lia1
- Análise de interação genética entre os genes *TIF51A* e *LIA1* através dos ensaios de letalidade sintética e supressão em alto número de cópias
- Análise estrutural e funcional da proteína Lia1
- Identificação de fatores celulares que interagem fisicamente por duplo-híbrido com as enzimas modificadoras de eIF5A, Dys1 e Lia1
- Análise mutacional e funcional da proteína eIF5A de humanos em *S. cerevisiae*

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- MATERIAL

As linhagens de leveduras, os plasmídeos e os oligonucleotídeos utilizados neste estudo estão apresentados nas Tabelas 1, 2 e 3, respectivamente. A manutenção e cultivo das linhagens de *S. cerevisiae* e *E. coli*, bem como a composição e o preparo dos meios de cultura e soluções seguiram procedimentos padrão (Guthrie e Fink, 1991; Sambrook *et al.*, 2001; Ausubel *et al.*, 2004).

3.2- MÉTODOS

Os diferentes métodos utilizados estão sendo apresentados de acordo com a ordem dos resultados.

3.2.1- Subclonagem de DNA

3.2.1.1- Digestão de plasmídeos

Os plasmídeos de interesse foram digeridos em um volume de 20µL, utilizando as condições recomendadas para as diferentes enzimas de restrição (New England Biolabs).

3.2.1.2- Desfosforilação do vetor

Após digestão do vetor, foram adicionadas 5-10U da enzima fosfatase alcalina (CIAP - Calf Intestinal Alkaline Phosphatase) e a reação foi incubada a 37°C por 30 minutos. A reação foi interrompida por aquecimento a 75°C por 10 minutos.

3.2.1.3- Purificação de inserto e vetor

Após digestão dos plasmídeos e realização das modificações necessárias, os produtos obtidos foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8% em TAE (Tris 40mM, ácido acético glacial 0,11% e EDTA 1mM), contendo 0,5µg/mL de

brometo de etídio. Ao DNA foi adicionado tampão de amostra (azul de bromofenol 0,125%, xileno cianol 0,125% e glicerol 50%) e a solução foi aplicada no gel. O gel foi submetido à voltagem de 80V. O DNA foi visualizado utilizando luz ultravioleta e a imagem documentada utilizando o sistema de fotodocumentação Alphamager 2200 (Alpha Innotech Corporation). Os fragmentos desejados foram purificados utilizando o kit “QIAquick Gel Extraction” da QIAGEN.

3.2.1.4- Reação de ligação

Os fragmentos (vetor e inserto) após a purificação, foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% para avaliar a pureza e estimar a concentração dos mesmos. A reação de ligação foi realizada utilizando um volume final de 20 μ L, tampão apropriado, um excesso de inserto em relação ao vetor (usualmente 10 vezes) e 200-400U de T4 DNA ligase. A reação foi incubada a 16°C por 4-24 horas. A introdução dos produtos da reação de ligação em *E. coli* DH5 α competente foi realizada como descrito no item 3.2.3.2.

3.2.2- Clonagem empregando a reação de polimerase em cadeia (PCR)

3.2.2.1- Reação de PCR

As reações de PCR foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,5mL contendo 1 μ M de cada oligonucleotídeo, 1 μ L de uma mistura de desoxirribonucleotídeos 100 μ M cada (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 20 a 40ng de DNA plasmidial ou 1 μ L de DNA genômico de levedura da preparação obtida no item 3.2.9, e 2U da enzima HiFi Taq DNA polimerase (Invitrogen) num volume final de reação de 100 μ L. As condições das reações foram estabelecidas de acordo com a temperatura de desnaturação dos oligonucleotídeos utilizados. Após o último ciclo, as reações foram mantidas a 72°C por 5 minutos. Os produtos das reações foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TAE (Tris 40mM, ácido acético glacial 0,11% e EDTA 1mM) e então purificados utilizando o kit “QIAquick PCR Purification” da QIAGEN.

3.2.2.2- Clonagem do produto de PCR

Os produtos amplificados e purificados foram submetidos à digestão com as enzimas de restrição requeridas, seguindo as condições recomendadas pelo fabricante (New England Biolabs). Os produtos de digestão foram purificados após eletroforese em gel de agarose 0,8%, utilizando o kit “QIAquick Gel Extraction” da QIAGEN. Os fragmentos (vetor e inserto) foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8-1% para avaliar a pureza e estimar a concentração dos mesmos. A reação de ligação e a introdução dos produtos da reação de ligação em *E. coli* DH5 α competente foram realizadas como descrito nos itens 3.2.1.4 e 3.2.3.2, respectivamente.

3.2.3- Transformação bacteriana por choque térmico

3.2.3.1- Competência

Uma colônia de *E.coli* DH5 α foi inoculada em 10mL de meio LB (extrato de levedura 5g/L, NaCl 10g/L e triptona 10g/L) e incubada a 37°C sob agitação por uma noite. A cultura foi então diluída em 250mL de meio SOB (triptona 20g/L, extrato de levedura 5g/L, NaCl 10mM, KCl 2,5mM, MgCl₂.4H₂O 10mM e MgSO₄.7H₂O 10mM) até atingir D.O._{600nm}=0,6. A cultura foi incubada em banho de gelo por 10 minutos e centrifugada a 2.500xg a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram suspensas em 80mL de solução TB (Pipes pH7,0 10mM, MnCl₂.4H₂O 55mM, CaCl₂.2H₂O 15mM e KCl 250mM) gelada e incubadas no gelo por 10 minutos. As células foram centrifugadas e suspensas em 20mL de TB gelado adicionado de 1,5mL de DMSO. As células foram novamente incubadas em gelo por 10 minutos. Para armazenamento, 200 μ L de células foram alíquotados e congelados a -80°C.

3.2.3.2- Transformação

Células da linhagem de *E. coli* DH5 α competentes foram descongeladas em banho de gelo. Em um tubo de microcentrífuga foram adicionados 100 μ L das células

competentes e 50–250ng de DNA plasmidial ou 10µL da reação de ligação. Os tubos foram mantidos em banho de gelo por 30 minutos e submetidos ao choque térmico em banho-maria a 42°C por 2 minutos. A seguir, 1mL de meio LB líquido foi adicionado ao tubo, o qual foi incubado por 1 hora a 37°C, sob agitação. Finalmente, as células foram plaqueadas em meio seletivo (meio LB contendo ampicilina 50µg/mL) e incubadas a 37°C até a obtenção de colônias.

3.2.4- Eletroporação de bactérias

3.2.4.1- Competência

Uma cultura estacionária da linhagem HB101 de *E.coli* foi diluída 100 vezes em 1L de meio LB fresco e incubada a 37°C, sob agitação até atingir D.O._{600nm} = 1,0-1,2. As células foram coletadas por centrifugação a 3.200xg por 20 minutos a 4°C e lavadas uma vez com 500mL de água gelada e duas vezes com 250mL de água gelada. Uma nova lavagem com 30mL de glicerol 20% gelado foi realizada. As células foram suspensas em 3mL de glicerol 20% gelado e congeladas em alíquotas de 40µL a -80°C.

3.2.4.2- Transformação

2µL de DNA plasmidial purificado de levedura foram adicionados a 40µL de células eletrocompetentes. Estas foram transferidas para uma cubeta de eletroporação (0,1cm) e submetidas a um pulso elétrico com as seguintes constantes elétricas: voltagem 1,7kV, resistência 200Ω e capacitância 25µF. Em seguida, as células foram removidas da cubeta com 1mL de meio LB e incubadas a 37°C por 1 hora sob agitação. Finalmente, as células foram plaqueadas em meio seletivo M9 (Na₂HPO₄ 46mM, KH₂PO₄ 22mM, NaCl 8,5mM, NH₄Cl 18mM, glicose 4g/L, prolina 20µg/mL, ampicilina 100µg/mL e ágar 18g/L), para possibilitar a seleção do plasmídeo contendo a marca *LEU2*. A seguir, as placas foram incubadas a 37°C até a obtenção de colônias.

3.2.5- Isolamento de DNA plasmidial a partir de bactéria em pequena escala – Miniprep

Células da linhagem de *E. coli* DH5 α contendo os plasmídeos de interesse foram inoculadas em 3mL de meio LB contendo 50 μ g/mL de ampicilina e incubadas a 37°C por aproximadamente 16 horas, sob agitação constante. A cultura foi centrifugada por 1 minuto a 12.000xg. As células foram suspensas em 200 μ L de TE (Tris 10mM pH 8,0 e EDTA 1mM pH 8,0). Foram adicionados 200 μ L de solução NaOH/SDS (NaOH 0,2M e SDS 1%), incubando-se por 5 minutos a 37°C. Em seguida foram adicionados 150 μ L de acetato de sódio 3M pH 4,8 e o tubo foi invertido várias vezes. Após centrifugação por 6 minutos a 12.000xg, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. A seguir, foi adicionado isopropanol (3 vezes o volume da amostra). Após incubação de 5 minutos a 37°C, o tubo foi centrifugado por 10 minutos a 12.000xg. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado duas vezes com etanol 75%. Depois de seco, o DNA foi suspenso em 50 μ L de TE pH 8,0.

3.2.6- Transformação de leveduras

Uma colônia da linhagem de levedura desejada foi inoculada em 5mL de meio adequado e incubada a 30°C sob agitação por toda a noite. 1,5mL da cultura foram centrifugados na velocidade máxima por 5 segundos. Após descarte do sobrenadante, as células foram lavadas com 1mL de água estéril, suspensas em 1mL de solução de acetato de lítio 100mM e então incubadas por 5 minutos a 30°C. As células foram coletadas por centrifugação e o sobrenadante foi removido. Foram adicionados, na seguinte ordem, 240 μ L de PEG 50%, 36 μ L de acetato de lítio 1M, 25 μ L de DNA de espermatozoides de salmão, 5 μ L de DNA plasmidial da preparação obtida no item 3.2.5, completando-se o volume de reação com 45 μ L de água. O tubo foi então agitado vigorosamente (vortex) por 1 minuto e incubado a 42°C por 20 minutos. As células foram centrifugadas na velocidade máxima por 10 segundos. Após o sobrenadante ter sido removido, as células foram suspensas em 150 μ L de água estéril e então plaqueadas em meio seletivo apropriado. As placas foram incubadas a 30°C até o aparecimento de colônias.

3.2.7- Transformação de leveduras de alta eficiência

Uma colônia da linhagem de levedura de interesse foi inoculada em 10mL de meio adequado e incubada a 30°C sob agitação por toda a noite. A partir desta cultura inoculou-se $5,0 \times 10^6$ células/mL em 10mL de meio pré-aquecido. As células foram incubadas a 30°C até que a concentração atingisse $2,0 \times 10^7$ células/mL, centrifugadas a 3.000xg por 5 minutos e lavadas com água. Após centrifugação, as células foram suspensas em 600μL de solução de acetato de lítio 100mM e incubadas por 15 minutos a 30°C. Coletou-se novamente as células por centrifugação e removeu-se o sobrenadante. Foram adicionados, na seguinte ordem, 480μL de PEG 50%, 72μL de acetato de lítio 1M, 50μL de DNA de esperma de salmão, 1μg da biblioteca de cDNA completando-se o volume de reação com 108μL de água. O tubo foi então agitado vigorosamente (vortex) por 1 minuto e incubado a 30°C por 30 minutos. O choque térmico foi dado incubando-se o tubo a 42°C por 20 minutos, tomando-se cuidado de inverter o tubo a cada 5 minutos para equilíbrio da temperatura. As células foram centrifugadas como descrito acima, suspensas em 2mL de água, plaqueadas em meio seletivo e incubadas a 30°C até o aparecimento das colônias.

3.2.8- Isolamento de DNA plasmidial a partir de leveduras

De uma cultura estacionária da linhagem de levedura desejada, um volume de 1,5mL foi centrifugado a 12.000xg por 1 minuto. A seguir, o sobrenadante foi desprezado, as células lavadas com 1mL de água e suspensas em 200μL de tampão de lise (Triton X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100mM, Tris-HCl pH 8,0 10mM e EDTA 1mM). Foram adicionados 200μL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e 300mg de pérolas de vidro. O tubo foi então agitado vigorosamente (vortex) por 5 minutos e centrifugado a 16.000xg por 1 minuto. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e adicionada de igual volume de isopropanol. Após centrifugação de 10 minutos a 16.000xg, o sobrenadante foi removido e o precipitado lavado com 500μL de etanol 75% gelado. O precipitado, depois de seco, foi suspenso em 50μL de água.

3.2.9- Preparo de DNA genômico de levedura

A linhagem de levedura de interesse foi crescida em 10mL de YPD (extrato de levedura 10g/L e peptona 20g/L) até a saturação ($D.O_{600nm} > 1$). A cultura foi centrifugada a 3.000xg por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante descartado e as células lavadas com 500μL de água Milli-Q. As células foram suspensas em 200μL de tampão de lise (Tris-HCl 10mM pH 8,0, Triton X100 2%, SDS 1%, NaCl 100mM e EDTA 1mM) e 200μL de PCI (fenol/clorofórmio/álcool isoamílico), e foram adicionados aproximadamente 300mg de pérolas de vidro. As células foram submetidas a agitação vigorosa por 3 a 4 minutos, adicionadas de 200μL de TE pH8,0 e novamente submetidas a agitação por mais 1 minuto. As células foram centrifugadas a 13.400xg por 5 minutos, e a fase aquosa foi transferida para um novo tubo. A extração com 200μL de PCI foi repetida por 3 vezes. Os ácidos nucléicos foram então precipitados da fase aquosa com 1mL de etanol absoluto gelado e submetidos à centrifugação a 13.400xg por 2 minutos a 4°C. O precipitado foi suspenso em 400μL de TE pH 8,0, adicionado de 3μL de RNase A (10mg/ml) e incubado a 37°C por 30 minutos. A extração com PCI foi repetida mais uma vez e o DNA precipitado com 10μL de acetato de amônio 4M e 1mL de etanol absoluto. O tubo foi centrifugado a 13.400xg por 2 minutos a 4°C e o precipitado lavado com 400μL de etanol 75% gelado. O precipitado foi seco ao ar livre e suspenso em 50μL de TE pH8,0.

3.2.10- Rastreamento por duplo-híbrido

O sistema de duplo-híbrido, ferramenta deste estudo, explorou o fato de que a proteína de ligação LexA é incapaz de ativar a transcrição a não ser quando associada ao domínio de ativação de Gal4. Este sistema foi utilizado com a finalidade de rastrear uma biblioteca de cDNA de *S. cerevisiae* utilizando eIF5A, Dys1 ou Lia1 como iscas.

As construções plasmidiais produzindo as proteínas alvo em fusão com a proteína de ligação ao DNA LexA foram obtidas como segue: o gene *TIF51A* foi amplificado por PCR utilizando os oligonucleotídeos SVO102 e SVO52, o qual foi inserido no sítio *Bam*HI do vetor pBTM116 contendo a marca auxotrófica *TRP1*

(pSV278). A construção plasmidial pBTM116-*DYS1* (pSV549) foi obtida por subclonagem do fragmento *EcoRI-EcoRI* do pSV519 já disponível no laboratório. A construção plasmidial pBTM116-*LIA1* foi, por sua vez, gerada por subclonagem do fragmento *EcoRI-EcoRI* obtido a partir do pSV356 (pSV492).

A linhagem L40 foi utilizada para rastrear a biblioteca de cDNA clonada em fusão com o domínio de ativação de Gal4 no vetor pACT (*LEU2*). Esta linhagem contém os dois marcadores do sistema de duplo-híbrido *lexAop-HIS3* e *lexAop-LacZ*. Desta forma, os clones da biblioteca de cDNA que codificarem proteínas capazes de interagir com a proteína de interesse foram identificados pela capacidade de causar a ativação destes genes repórteres, *HIS3* e *LacZ*. Os reagentes (vetores e biblioteca de cDNA) para este rastreamento foram cedidos pela Dra. Carla C. Oliveira, Instituto de Química, USP.

Inicialmente, a linhagem repórter L40 foi transformada com o plasmídeo contendo o gene de interesse em fusão com a proteína de ligação ao DNA LexA ou com o vetor pBTM116 vazio. Após a avaliação da correta expressão da proteína de fusão por western blot, o próximo passo foi introduzir na linhagem L40 já possuindo a proteína de fusão com LexA, o plasmídeo pACT. Os transformantes obtidos foram então testados para verificar a capacidade de causar a ativação dos genes repórteres, *HIS3* e *LacZ*. Nesta etapa é importante que os transformantes não apresentem crescimento no meio seletivo SC -Leu/Trp/His e ainda sejam negativos para o ensaio de β -galactosidase.

Após os testes de expressão e auto-ativação, o rastreamento por duplo-híbrido foi iniciado. A linhagem de levedura L40 possuindo o plasmídeo contendo o gene de interesse em fusão com o domínio de ligação ao DNA de LexA foi transformada com uma biblioteca de cDNA. As colônias que cresceram no meio seletivo para os dois plasmídeos (pBTM116/*TRP1* e pACT/*LEU2*) e para o gene repórter auxotrófico *HIS3* foram então repicados para meio SC -Leu/Trp, ausente de qualquer seleção para o gene *HIS3*. Após o crescimento a 30°C foram novamente repassadas para meio SC -Leu/Trp/His. Os transformantes que confirmaram a marca His⁺ foram testados para β -galactosidase. Os transformantes positivos para a expressão do gene *HIS3* e produção da β -galactosidase tiveram os seus plasmídeos isolados. Os plasmídeos purificados dos clones positivos foram introduzidos na linhagem de *E. coli* HB101. Esta linhagem apresenta uma deficiência para leucina

que permite selecionar o plasmídeo *LEU2* da biblioteca de cDNA quando plaqueada em meio seletivo (meio M9 adicionado de prolina e ampicilina). Os plasmídeos foram isolados e novamente introduzidos na linhagem L40 com o plasmídeo contendo o gene de interesse em fusão com a proteína de ligação ao DNA LexA. Esta etapa é importante para verificar a associação da presença do plasmídeo com a habilidade de expressar os genes repórteres *HIS3* e *LacZ* (plasmid linkage). Desta forma, os transformantes que apresentaram o fenótipo His⁺ e β-gal⁺ foram considerados clones positivos e tiveram as extremidades dos cDNAs presentes no plasmídeo *LEU2* sequenciadas.

3.2.11- Ensaio de β-galactosidase

A linhagem de interesse foi crescida sobre uma membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences) em meio sólido SC -Leu/Trp durante a noite. A membrana foi então retirada da placa e colocada sobre um papel alumínio flutuando no nitrogênio líquido com as células voltadas para cima. Após 30 segundos, a membrana foi submergida no nitrogênio líquido por 5 segundos e retirada para descongelar em temperatura ambiente. Um papel de filtro (Whatman) foi colocado em uma placa de petri e umedecido com 1,5mL de Tampão Z (Na₂HPO₄ 60mM, NaH₂PO₄ 40mM, KCL 10mM, MgSO₄ 1mM pH7,0) adicionado de X-gal (0,5mg/mL). A membrana, com as células voltadas para cima, foi colocada sobre este papel de filtro e incubada a 30°C em câmara úmida até o desenvolvimento de coloração azul.

3.2.12- Sequenciamento de DNA

O sequenciamento foi realizado utilizando-se o kit “Big Dye Terminator” e o sequenciador semi-automático ABI377 (Applied Biosystems).

3.2.13- Teste de crescimento após diluição seriada

As linhagens de levedura a serem analisadas foram crescidas na temperatura permissiva em 10mL de meio seletivo até aproximadamente 1-2x10⁷ células/mL. Após centrifugação a 3.000xg por 10 minutos e remoção do meio de cultura, as

células foram suspensas na concentração de $2,5 \times 10^8$ células/mL. 200 μ L da suspensão foram transferidos para um poço de microplaca. A suspensão foi diluída seriadamente (1:10) em meio líquido apropriado. Utilizando um pipetador multicanal, 4 μ L da suspensão original e das diluições foram aplicados nos meios de cultura de interesse. A seguir, as placas foram incubadas nas temperaturas de escolha até a observação de crescimento. Para a análise da supressão do fenótipo temperatura-sensível dos alelos *tif51A* por *LIA1* em alto número de cópias, este gene, obtido por PCR utilizando os oligonucleotídeos SVO154 e SVO155, foi clonado no sítio *EcoRI* do vetor pSV65 (*URA3*, 2 μ), gerando a construção plasmidial pSV355.

3.2.14- Ensaio de expressão do gene de proteína de fusão com GST em bactéria

O gene *LIA1* foi clonado por PCR, utilizando os oligonucleotídeos SVO155 e SVO156, no sítio *EcoRI* do vetor de expressão pGEX-4T-1, o qual permite a produção da proteína de fusão com GST em bactéria (pSV356).

Uma colônia da linhagem de *E. coli* DH5 α contendo a construção plasmidial para expressão do gene de interesse em fusão com GST foi inoculada e crescida em 5mL de meio LB líquido, acrescido de ampicilina (50 μ g/mL), a 37°C durante uma noite sob agitação. Em seguida, a cultura foi diluída 1:100 em 10mL de meio de cultura fresco e crescida nas mesmas condições até atingir a D.O._{600nm}=0,6. Retirou-se uma alíquota de 400 μ L da cultura. Após centrifugação da alíquota a 12.000xg por 5 minutos e descarte do sobrenadante, as células foram suspensas em 40 μ L de tampão de amostra para proteína. No restante da cultura foi induzida a expressão da proteína de fusão com 0,4mM de IPTG e, após 1, 2 e 3 horas de crescimento foram retirados 400 μ L de amostra. Da mesma forma, as células foram coletadas por centrifugação e suspensas em 60 μ L, 80 μ L e 110 μ L de tampão de amostra para proteína, respectivamente. Todas as amostras foram armazenadas a -80°C e fervidas por 5 minutos, antes de serem resolvidas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE).

3.2.15- Produção em larga escala e purificação de proteína de fusão com GST em bactéria

Uma colônia da linhagem de *E. coli* DH5 α transformada com o plasmídeo que permite a expressão do gene da proteína de fusão com GST foi inoculada e crescida em 100mL de meio LB líquido, acrescido de ampicilina (50 μ g/mL), a 37°C durante uma noite sob agitação. Em seguida, a cultura foi diluída 1:10 em 1000mL de meio de cultura fresco e crescida nas mesmas condições até atingir a D.O._{600nm}=0,6. Neste momento, a cultura foi induzida com 0,4mM de IPTG e, após 3 horas de incubação, a cultura foi centrifugada a 4.000xg por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante foi desprezado. A seguir, as células foram lavadas em 250mL de PBS gelado e centrifugadas a 4.000xg por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e a lavagem repetida. As células foram armazenadas a -80°C. As células expressando a proteína de fusão de interesse foram descongeladas em banho de gelo e suspensas em 10mL de PBS gelado contendo 0,4mL de um coquetel completo de inibidores de protease (Boehringer Mannheim), PMSF 2mM e DTT 1mM. Posteriormente, as células foram submetidas à sonicação de 4 segundos de pulso e 9,9 segundos de repouso durante 2 minutos em uma amplitude de 35%. A seguir, adicionou-se 1mL de Triton X-100 e centrifugou-se a 20.000xg por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante contendo a proteína de fusão de interesse foi submetido ao processo de purificação por afinidade à resina de glutationa-sepharose utilizando o sistema cromatográfico FPLC, de acordo com as recomendações do fabricante (Amersham Biosciences). Posteriormente, os eluatos obtidos foram quantificados pelo método de Bradford, utilizando o Kit “Bio Rad Protein Assay” da Bio Rad.

3.2.16- Produção de anticorpo policlonal em coelho

Os eluatos obtidos no processo da purificação da proteína a ser utilizada como imunógeno foram utilizados na imunização de coelhos, utilizando o seguinte esquema:

Primeira inoculação: Um volume de eluato contendo 300 μ g de proteína foi homogeneizado com o mesmo volume de adjuvante completo de Freund. O

antígeno foi vigorosamente agitado em vortex e na seringa para produção de emulsão. A emulsão foi então inoculada na região dorsal por via intradérmica, em quatro diferentes locais.

Segunda inoculação: Um volume de eluato contendo 300µg de proteína foi homogeneizado com o mesmo volume de adjuvante incompleto de Freund. O antígeno foi vigorosamente agitado em vortex e na seringa para produção de emulsão. O material foi inoculado na região dorsal por via subcutânea, em diferentes locais. Esta inoculação foi realizada 21 dias após a primeira inoculação.

Primeira sangria: A primeira sangria foi realizada 11 dias após a segunda inoculação.

Terceira Inoculação: Esta inoculação foi realizada essencialmente como a segunda, 10 dias após a primeira sangria.

Segunda sangria: A segunda sangria foi realizada 11 dias após a terceira inoculação.

Quarta Inoculação: Esta inoculação foi realizada essencialmente como a segunda, 10 dias após a segunda sangria.

Terceira sangria: A terceira sangria foi realizada 11 dias após a quarta inoculação.

Após cada sangria, os soros foram obtidos e cada um foi testado por western blot contra extrato total de levedura em diferentes diluições.

3.2.17- Western blot

As amostras protéicas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) e transferidas para membrana de nitrocelulose utilizando tampão de transferência (24,8mM Tris-HCl, 192mM glicina) e tensão de 100V por 60 minutos. A transferência foi avaliada por coloração com Ponceau-S. A membrana foi bloqueada a temperatura ambiente por 60 minutos em tampão PBST (PBS 1X, Tween-20 0.25%) contendo 5% de leite desnatado sob agitação. A membrana foi então incubada por 1 hora a temperatura ambiente com uma diluição adequada de soro imune em PBST contendo 5 % de leite desnatado. Posteriormente, a membrana foi lavada 3 vezes por cinco minutos com PBST. A seguir, a membrana foi incubada por 45 minutos com anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (Sigma), em PBST contendo 5 % de leite desnatado. Após três novas lavagens de cinco minutos com PBST, a membrana foi tratada com reagentes

quimioluminescentes (ECL-Amersham Biosciences) e exposta a filme de raios-X.

3.2.18- Ensaio de copurificação (GST pulldown)

Para a confirmação das interações físicas evidenciadas por duplo-híbrido, os genes *DYS1* e *LIA1* foram introduzidos no vetor pYGEX, o qual permite a expressão de genes em fusão com GST em levedura. Para a obtenção da construção contendo *DYS1* em pYGEX, este gene foi inicialmente clonado no vetor pGEX-4T-1. O fragmento contendo o gene *DYS1*, obtido por PCR utilizando os oligonucleotídeos SVO181 e SVO182, foi inicialmente clonado nos sítios *EcoRI*-*Bam*HI do vetor pGEX-4T-1, gerando o plasmídeo pSV430. A seguir, o fragmento *Bam*HI-*Sal*I foi obtido da construção pSV430 e então subclonado nos sítios de restrição *Bam*HI-*Sal*I do vetor pYGEX, gerando a construção pSV431. Devido ao fato do gene *LIA1* possuir um sítio para *Bam*HI interno e o vetor pYGEX possuir poucas opções de sítios únicos para clonagem, esse gene foi subclonado neste vetor em duas etapas. Inicialmente, o fragmento *Sma*I-*Bam*HI (767pb) do pSV356 foi clonado nos sítios *Xba*I-*Bam*HI (o sítio *Xba*I foi preenchido com Klenow DNA polimerase) do pYGEX, gerando a construção pSV360. Na segunda etapa, o fragmento *Bam*HI-*Bam*HI do pSV356 foi subclonado no sítio *Bam*HI do plasmídeo pSV360, gerando a construção pSV361. As construções plasmidiais que permitem a produção de GST-eIF5A (pSV36) e GST-eIF5A^{K51R} (pSV40) já estavam disponíveis no laboratório. Adicionalmente, o gene *LIA1* foi subclonado (fragmento *Sma*I-*Hind*III) do pSV355) em vetor *LEU2*, 2 μ (pSV64), gerando a construção plasmidial pSV464.

Uma pré-cultura da linhagem de interesse, contendo a construção plasmidial para expressão do gene de interesse em fusão com GST, foi incubada a 30°C durante a noite em meio SC-Ura, acrescido de glicose 2%. Esta foi diluída em 500mL de meio SC-Ura, acrescido de rafinose 2%, para D.O._{600nm}=0,016 e incubada a 30°C até atingir D.O._{600nm}=0,4-0,5 (15 a 18 horas). A expressão do gene da proteína de fusão com GST foi então induzida com 50mL de galactose 20% por 3 horas. As células foram centrifugadas a 2.500xg por 7 minutos a 4°C e lavadas duas vezes com PBS (NaCl 137mM, KCl 2,7mM, Na₂HPO₄ 10,1mM, KH₂PO₄ 1,8mM pH7,4) gelado. Após pesagem, as células foram congeladas a -80°C. As células foram descongeladas em gelo e suspensas (volume em mL igual ao peso em gramas) em Tampão A (Hepes 30mM pH7,5, acetato de potássio 100mM, acetato de magnésio

2mM) acrescido de β -mercaptoetanol 7mM, PMSF 1mM e 5 μ g/mL dos seguintes inibidores de protease: pepstatina, leupeptina, aprotinina e quimostatina (Sigma). Pérolas de vidro foram adicionadas em quantidade igual ao peso das células. Para romper as células o tubo foi agitado vigorosamente (agitação manual) durante um minuto, descansando no gelo por um minuto e o processo repetido por 4 vezes. O extrato foi clarificado por centrifugação a 23.000xg por 20 minutos a 4°C e quantificado pelo método de Bradford (BioRad).

Em tubo de 1,5mL gelado contendo 300 μ L de resina glutationa-sepharose (suspensão 50%) foram adicionados 5-10mg de extrato celular. Após incubação de uma hora a 4°C com agitação lenta, a resina foi lavada 5 vezes com 1mL de Tampão A. A resina foi fervida com 100 μ L de tampão de amostra (2X) para SDS-PAGE. Um volume de 10 μ L foi aplicado em gel SDS-PAGE 12% e a copurificação checada por western blot.

3.2.19- Geração das formas truncadas de eIF5A a partir do vetor de duplo-híbrido pBTM116

As deleções em *TIF51A* foram realizadas a partir da construção plasmidial pSV278. Um esquema simplificado está apresentado no painel A da Figura 9. Inicialmente, foi realizada a deleção dos primeiros 42 aminoácidos de eIF5A. Para tanto, o fragmento de 360pb, obtido a partir da digestão de *TIF51A* com a enzima de restrição *HincII*, foi subclonado no sítio *BamHI* do vetor pBTM116 gerando a construção plasmidial pSV429. A seguir, a segunda deleção feita no domínio N-terminal removeu os 63 aminoácidos iniciais de eIF5A. Neste caso, o fragmento *EcoRV* de 1,2kb do plasmídeo pSV278, o qual codifica para eIF5A-LexA, foi subclonado no sítio *BamHI* do vetor pBTM116. Novamente houve a necessidade de preencher o sítio *BamHI* com Klenow DNA polimerase. Desta forma, foi gerada a construção plasmidial pSV420. Ainda, a utilização dos sítios de restrição para as enzimas *MfeI* e *BamHI*, presentes em *TIF51A*, possibilitou a terceira deleção no domínio N-terminal. Os aminoácidos 1 ao 90 de eIF5A foram excluídos pela subclonagem do fragmento *MfeI-BamHI* de 470pb do plasmídeo pSV278 nos sítios *EcoRI-BamHI* do vetor pBTM116, gerando o plasmídeo pSV421. Finalmente, foi realizada a deleção da região compreendida entre os aminoácidos 90 e 152, ou seja,

a deleção do domínio C-terminal de eIF5A. Para tanto, a construção plasmidial pSV278 foi digerida separadamente com as enzimas *MfeI* e *AluI*. Enquanto a utilização da enzima *MfeI* gera extremidades coesivas, a digestão por *AluI* gera extremidades abruptas. Assim, após a digestão com *MfeI*, foi realizado o tratamento com a endonuclease Mung Bean, que proporcionou a conversão da extremidade coesiva em abrupta, seguido da digestão com a enzima *EcoRI*. Por sua vez, após a digestão com *AluI*, foi realizada a digestão com a enzima *BamHI*. Desta forma, foram gerados dois fragmentos, *EcoRI-MfeI* de 280pb e *AluI-BamHI* de 325pb. A clonagem destes fragmentos foi feita nos sítios *EcoRI-BamHI* do vetor pBTM116, gerando o plasmídeo pSV422.

A análise do mapeamento dos sítios de ligação de eIF5A às proteínas Dys1 e Lia1 utilizando as diferentes formas truncadas de eIF5A foram realizadas em colaboração com a Dra. Glória M. Thompson.

3.2.20- Nocauteamento de *LIA1* em *S. cerevisiae*

O nocauteamento gênico foi realizado através de uma estratégia envolvendo PCR e recombinação homóloga (Baudin *et al.*, 1993). O gene *HIS3*, clonado no vetor plasmidial pSV42, foi amplificado utilizando os oligonucleotídeos SVO157 e SVO158, os quais contêm sequências flanqueadoras do gene de interesse *LIA1*. Posteriormente, o produto amplificado foi utilizado para transformar as linhagens haplóides de *S. cerevisiae* (SVL56 e SVL78) e os clones recombinantes foram selecionados em meio de cultura desprovido de histidina. O nocaute nas células haplóides foi confirmado por PCR, utilizando um oligonucleotídeo da região codificadora do gene *HIS3* (SVO19) e outro de uma das regiões flanqueadoras do gene alvo SVO159.

3.2.21- Cruzamento e esporulação de leveduras

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

foram incubadas a 25°C. Após o crescimento, os diplóides foram isolados em meio duplo seletivo. Os diplóides foram crescidos em meio S-SPO líquido (extrato de levedura 2,5g/L; acetato de potássio 15g/L; adenina, uracil e tirosina 0,04g/L; histidina, leucina, lisina, triptofano, metionina e arginina 0,02g/L; fenilalanina 0,1g/L e treonina 0,35g/L) a 25°C, sob agitação até a formação de ascos. O aparecimento de ascos ocorreu após 3-7 dias.

3.2.22- Dissecção e caracterização de tétrades

200µL da cultura submetida à esporulação foram centrifugados momentaneamente. Após a remoção do sobrenadante, as células foram suspensas em 100µL de sorbitol 20%. Então, foram adicionados 3µL de zimoliase (10mg/mL) e a reação foi incubada a temperatura ambiente por 15 minutos. A seguir, foi adicionado 1mL 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 fator de acasalamento foi definido através do cruzamento com cepas de fator de acasalamento conhecido e seleção dos diplóides em meio seletivo. O fenótipo temperatura-sensível foi checado pelo crescimento em meio YPD em diferentes temperaturas de incubação.

3.2.23- Imunofluorescência indireta

As leveduras de interesse foram cultivadas em 5mL de meio YPD e crescidas até a concentração de aproximadamente 2×10^7 células/mL. A seguir, as células foram fixadas com 600µL de formaldeído 37% por 90 minutos na mesma temperatura de crescimento sob agitação constante. As células foram coletadas por centrifugação a 2.000xg por 3 minutos e lavadas com 1mL de tampão fostato de potássio 0,1M pH6,5. Após lavagem, as células foram suspensas em 100µL de solução P (tampão fostato de potássio 0,1M pH6,5, sorbitol 1,2M). DTT foi então adicionado numa concentração final de 25mM e a suspensão foi incubada a temperatura ambiente por 10 minutos. Acrescentou-se 2,5µL de zimoliase (10mg/mL

em solução P) e a suspensão foi incubada a temperatura ambiente por 10 minutos sob agitação. Durante o tratamento das células com zimoliase, a lâmina de microscopia foi tratada com polilisina 0,3% e incubada a temperatura ambiente por 1 minuto. A lâmina foi lavada três vezes com água, deixando-a secar ao ar livre por 10 minutos. Após secagem da lâmina, 20µL da suspensão de células foram aplicados sobre a lâmina tratada. A lâmina foi incubada por 5 minutos a temperatura ambiente e o excesso foi removido. Imediatamente, as células foram imersas em metanol gelado por 7 minutos e, posteriormente, em acetona gelada por 30 segundos. As células foram lavadas com solução PBS contendo BSA 10mg/mL e incubadas por uma noite a temperatura ambiente em câmara úmida escura com os anticorpos primários diluídos apropriadamente na solução PBS/BSA. Após incubação, as células foram submetidas a quatro lavagens com PBS/BSA. As células foram tratadas com anticorpo secundário conjugado à fluoresceína diluído apropriadamente em PBS/BSA por 2 horas a temperatura ambiente em câmara úmida escura. A seguir, as células foram lavadas três vezes com PBS/BSA e uma vez com PBS e incubadas com 20µL de solução contendo DAPI (1µg/mL em tampão PBS) por 5 minutos. As células foram lavadas duas vezes com tampão PBS. A lâmina foi seca ao ar livre, coberta com solução contendo p-fenilenodiamino (um cristal de p-fenilenodiamino em 100µL de água e 900µL de glicerol), e visualizada por microscopia de fluorescência.

3.2.24- Indução do gene de proteína de fusão com GFP em levedura

LIA1 foi clonado em fusão com o gene da proteína fluorescente GFP (Green Fluorescent Protein) no vetor pSV76 em duas etapas. Inicialmente, o fragmento *SmaI-BamHI* do pSV356 foi clonado nos sítios *BamHI-XbaI* (o sítio *XbaI* foi preenchido com Klenow polimerase) do pSV76. A seguir, o fragmento *BamHI-BamHI* do pSV356 foi subclonado no sítio *BamHI* da construção plasmidial obtida anteriormente, gerando a construção pSV466.

Inicialmente, a linhagem de *S. cerevisiae*, contendo a construção plasmidial para expressão do gene de interesse em fusão com GFP, foi incubada em 5mL de meio SC-Ura, acrescido de glicose 2%, a 30°C por 24 horas. A cultura foi diluída em 100mL de meio SC-Ura contendo 2% de rafinose para obtenção da D.O._{600nm}=0,016

e, em seguida, incubada a 30°C. O crescimento foi acompanhado até que atingisse $D.O_{600nm}=0,4-0,5$. Uma alíquota de 10mL foi retirada da cultura. A expressão do gene da proteína de fusão com GFP foi então induzida pela adição, ao restante da cultura, de galactose na concentração final de 2%. A cultura foi incubada a 30°C por 3 horas. Uma nova alíquota de volume normalizado foi removida a cada hora para obter a mesma quantidade de células presente na alíquota anterior. As alíquotas, por sua vez, foram centrifugadas e os sobrenadantes removidos. Para checar a expressão da proteína de fusão com GFP através de ensaio de western blot, as alíquotas foram adicionadas de 200µL de tampão de amostra (2X) e de 300mg de pérolas de vidro, submetidas à agitação vigorosa por 10 minutos a 4°C e então fervidas por 5 minutos. As células produzindo a proteína de fusão com GFP foram visualizadas em microscópio de fluorescência após fixação com formaldeído 3,7% por 30 minutos e coloração do núcleo com DAPI (5µg/mL).

3.2.25- Produção em larga escala e purificação de proteína em fusão com cauda de histidinas

Para produzir a proteína Lia1 em fusão com cauda de histidinas, a região codificadora do gene *LIA1*, amplificada por PCR utilizando os oligonucleotídeos SVO261 e SVO262, foi clonada nos sítios para a enzima de restrição *NdeI* do vetor de expressão pET14b, gerando a construção plasmidial pSV502.

Células de *E. coli* contendo a construção plasmidial pSV502 foram descongeladas em gelo e lisadas em tampão de lise (tampão fosfato 50mM pH8,0; NaCl 300mM; imidazol 10mM; DTT 2mM; PMSF 2mM; 1X PLAC). Para a lise celular, a suspensão foi submetida à sonicação, em gelo, a ciclos de 4 segundos de sonicação e 10 segundos de repouso, durante 2 minutos, numa amplitude de 60%. O lisado foi então centrifugado a 20.000xg por 20 minutos e o sobrenadante filtrado em filtro de 0,45µm. O lisado clarificado e filtrado foi submetido à cromatografia de afinidade utilizando-se uma coluna de Ni-NTA de 5mL e o sistema cromatográfico ÄKTA FPLC (GE Healthcare). O procedimento para purificação foi realizado como descrito pelo fabricante. Resumidamente, após a aplicação da amostra na coluna, esta foi lavada com tampão de lavagem (tampão fosfato 50mM pH8,0; NaCl 300mM; imidazol 20mM). Em seguida, foi feita a eluição da proteína de fusão com um

gradiente de tampão de lavagem e tampão de eluição (tampão fosfato 50mM pH8,0; NaCl 300mM; imidazol 250mM). As frações obtidas da cromatografia foram analisadas por SDS-PAGE e coloração por “Coomassie Blue”. As frações contendo a proteína de interesse foram reunidas e submetidas à diálise em membrana SpectraPor (Spectrum) com poro de seleção de 12-14kDa em 2L de tampão 10mM Tris-HCL pH7,5 por uma noite a 4°C.

3.2.26- Ensaios de cristalização

A proteína Lia1 purificada foi submetida a ensaios de varredura de cristalização utilizando os “kits fatoriais” Crystal Screen 1 e 2 (Hampton Research) e Jena 1 a 10 (Jena Biosciences). Foi utilizado o método de “gota sentada” nas diferentes condições permitidas pelos kits. A partir da observação de indícios de cristalização da proteína em alguma condição do rastreamento, foram preparadas novas soluções para o refinamento das condições de cristalização com variações no pH e/ou na concentração e natureza de precipitante ou aditivos. Os ensaios de cristalização foram realizados no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – LNLS, Campinas.

3.2.27- Eletroforese em condições não-desnaturantes (PAGE nativo)

As proteínas foram separadas por eletroforese analítica utilizando-se géis de poliacrilamida 8-16% em tampão Tris-Glicina (Invitrogen). As amostras foram preparadas adicionando-se tampão de corrida para eletroforese nativa 2X (Invitrogen) e então aplicadas no gel nativo após pré-corrida de 125V por 30 minutos a 4°C em tampão Tris-Glicina pH8,3 (Invitrogen). Da mesma forma que a pré-corrida, a corrida eletroforética foi realizada utilizando-se voltagem constante de 125V durante 2,5 horas a 4°C.

3.2.28- Obtenção do substrato protéico com alta radioatividade específica para os ensaios de hidroxilação *in vitro*

1mg da proteína eIF5A recombinante de levedura, purificada por afinidade a resina de níquel, foi adicionado a uma mistura reacional contendo tampão Glicina-

NaOH 0,2M, NAD 1mM, DTT 1mM, 25mg de BSA, 1mL de H^3 -espermidina (concentração final de $12,5\mu\text{M}$) e 0,1mg de Dys1 recombinante em um volume final de 4mL. Como controle positivo do experimento, as proteínas humanas recombinantes eIF5A e DHS foram adicionadas a uma segunda mistura reacional de volume final $40\mu\text{L}$. Após incubação a 37°C por duas horas, uma alíquota de $40\mu\text{L}$ foi retirada de cada reação e adicionada de $500\mu\text{g}$ de BSA. Em seguida, 1mL de ácido tricloroacético 10%, contendo 1mM de cada uma das poliaminas espermidina, espermina e putrescina, foi adicionado para a precipitação das proteínas. O restante da reação foi congelado a -20°C . As amostras foram mantidas em gelo por 15 minutos e então submetidas a centrifugação a $14.000\times g$ por 3 minutos a 4°C . Após remoção do TCA, o precipitado foi lavado três vezes com TCA 10% contendo 1mM de poliaminas. A radioatividade dos sobrenadantes obtidos na última etapa de lavagem foi então medida para avaliar a retirada do excesso de espermidina radioativa com as sucessivas lavagens. Os precipitados foram então hidrolisados em $400\mu\text{L}$ de 6N HCl por 18 horas a 110°C . As amostras foram liofilizadas a vácuo sob aquecimento por 2 horas para a retirada do HCl e suspensas em $100\mu\text{L}$ de água. Um alíquota de $5\mu\text{L}$ foi retirada e a radioatividade referente a desoxihipusina formada foi analisada. É sabido que 20.000dpm correspondem a 1pmol de substrato eIF5A marcado radioativamente. Desta forma, foi possível estimar a quantidade de proteína que foi marcada radioativamente e, com isto, avaliar o rendimento da reação. Como o rendimento foi maior que 10%, baseado na concentração inicial de eIF5A adicionada a reação, foi dado continuidade ao experimento como descrito a seguir. 0,5g/mL de sulfato de amônio (correspondente a 75% de saturação) foram adicionados aos 4mL finais da reação. A amostra foi homogeneizada até completa solubilização do sal. É importante manter a reação em gelo durante esta etapa de precipitação. A seguir, a amostra foi transferida para tubos de microcentrifuga (1mL cada) e então centrifugadas na velocidade máxima por 20 minutos a 4°C . Após a remoção dos sobrenadantes, os precipitados foram suspensos em $375\mu\text{L}$ de PBS1X. As amostras foram então novamente agrupadas em um único tubo e o processo de precipitação por sulfato de amônio foi repetido por mais duas vezes para a retirada completa do excesso de H^3 -espermidina. O precipitado foi suspenso em 1mL de Tris-HCl pH7,5 50mM contendo DTT 1mM. Uma alíquota de $10\mu\text{L}$ da amostra final foi retirada e adicionada de $100\mu\text{g}$ de BSA e $100\mu\text{L}$ de TCA 10%. Após 15 minutos

no gelo, a alíquota foi centrifugada na velocidade máxima por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o precipitado foi adicionado de 100 µL de NaOH 0,1N. A contagem da radioatividade de ambos sobrenadante e precipitado foi realizada e deve ser menor que 5% quando comparada à contagem obtida no precipitado. Finalmente, os substratos radioativos gerados foram dialisados contra tampão Tris-HCl pH7,5 50mM, NaCl 0,1M e DTT 1mM por 4 horas a 4°C para remover o sulfato de amônio e eventualmente H³-espermidina. A radioatividade final de 1µL da amostra foi então determinada pela leitura no cintilador.

3.2.29- Ensaio da atividade hidroxilásica

0,3µg ou 3µg das proteínas purificadas foi adicionado a uma mistura reacional contendo Tris-HCl pH7,5 25mM, DTT 6mM, 25µg de BSA e 2pmol (4x10⁴dpm) do substrato marcado radioativamente em um volume final de 20µL. Após incubação a 37°C por uma hora, 500µg de BSA foram adicionados a cada uma das amostras, seguido da adição de 1mL de ácido tricloroacético 10% para a precipitação das proteínas. As amostras foram mantidas em gelo por 15 minutos e então submetidas a centrifugação a 14.000xg por 10 minutos a 4°C. Após remoção do TCA, os precipitados foram hidrolisados em 400µL de HCl 6N por 18 horas a 110°C. As amostras foram liofilizadas a vácuo sob aquecimento por 2 horas para a completa retirada do HCl e finalmente suspensas em 100µL de água. 50µL do hidrolisado ácido contendo os aminoácidos desoxihipusina e/ou hipusina marcados radioativamente e presentes em 50µL do hidrolisado ácido foram então submetidos a cromatografia líquida de troca-iônica como descrito no item 3.2.21. A radioatividade em cada uma das frações coletadas foi medida utilizando o cintilador LS6000IC (Beckman).

3.2.30- Análise do conteúdo de metal de Lia1

Amostras de 200µL contendo 50µg (correspondente a 7µM) de cada uma das proteínas mutadas e selvagem foram preparadas utilizando-se tampões pré-tratados com Chelex 100. As amostras, assim como o tampão Tris-HCl, foram enviadas para

a análise do conteúdo dos metais cádmio, cobalto, cromo, cobre, ferro, magnésio, manganês, níquel e zinco pela técnica “inductively coupled plasma-high resolution mass spectrometry”, a qual foi realizada na Universidade de Michigan.

3.2.31- Geração de novos alelos de Lia1 por meio da técnica de mutagenese sítio-dirigida

Os mutantes com substituições em aminoácidos conservados foram gerados utilizando-se o kit “Quick Change Site-Directed Mutagenesis” de acordo com as recomendações do fabricante (Stratagene). O vetor plasmidial contendo o gene *LIA1* selvagem em fusão com GST (pSV356) ou LexA (pSV492) foi utilizado como molde para a PCR mutagênica e os pares de oligonucleotídeos foram planejados de modo a promoverem a troca para o aminoácido de interesse. Os genes selvagem e mutados foram sequenciados para a confirmação das mutações desejadas. Os plasmídeos gerados foram então introduzidos em bactérias competentes da linhagem BL21(DE3), para a expressão dos genes de fusão com GST, ou na linhagem repórter do duplo-híbrido L40, para obtenção das proteínas mutadas em fusão com LexA. Os plasmídeos gerados contendo o gene *LIA1* mutado assim como os oligonucleotídeos utilizados em cada reação de PCR mutagênica estão apresentados nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

3.2.32- Purificação em pequena escala das proteínas Lia1 mutadas

Uma colônia de *E. coli* transformada com a construção plasmidial para expressão do gene de interesse em fusão com GST foi inoculada e crescida em 5mL de meio LB líquido, acrescido de ampicilina (50µg/mL), a 37°C durante uma noite sob agitação. Em seguida, a cultura foi diluída para a D.O._{600nm}=0,1 em 50mL de meio de cultura fresco e crescida nas mesmas condições até atingir a D.O._{600nm}=0,5. A expressão da proteína de fusão foi induzida com 1mM de IPTG por 3 horas a 37°C. Após a indução, as células foram coletadas por centrifugação e suspensas em 800µL de tampão A (Tris-HCl pH7,5 50mM, DTT 1mM) contendo coquetel completo de inibidores de protease ausente de EDTA (Roche). Posteriormente, as células foram submetidas à sonicação de 5 segundos de pulso e 10 segundos de repouso durante 2 minutos em uma amplitude de 50%. As células foram então centrifugadas

a 14.000xg por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante contendo a proteína de fusão de interesse foi submetido ao processo de purificação por afinidade à resina de glutathiona-sepharose (GE Healthcare). 200µL de resina glutathiona-sepharose (suspensão 50%) foram adicionados ao lisado clarificado. Após incubação de 3 horas a 4°C sob agitação lenta, a resina foi lavada 3 vezes com 500µL de tampão B (50mM Tris-HCl pH7,5, 1mM DTT, 0,1M NaCl) utilizando-se colunas de centrifugação (“spin modules”) (Q-biogene). Para a obtenção das proteínas livres de tag, a resina foi submetida a digestão com trombina utilizando-se, para tanto, o kit “Thrombin Cleavage Capture Kit” (Novagen). As proteínas obtidas foram concentradas utilizando-se os módulos “Amicon YM30” (Millipore) e então equilibradas em tampão A para os ensaios de atividade enzimática e eletroforese em gel não-desnaturante.

3.2.33- Ensaios espectroscópicos

3.2.33.1- Dicroísmo Circular

Os experimentos de dicroísmo circular foram realizados no espectropolarímetro JASCO J-810, com a temperatura controlada através de um sistema interno de controle de temperatura (*Peltier type control system* PFD 425S, JASCO). Os espectros de dicroísmo circular na região do UV distante (190 - 250 nm) foram obtidos utilizando-se uma cubeta de quartzo de 0,1 cm de caminho ótico, a uma concentração de 0,2 mg/mL de proteína em tampão 10 mM Tris-HCl pH 7,5. Todos os espectros de dicroísmo circular foram corrigidos pela contribuição do tampão utilizado e as elipticidades observadas foram transformadas em elipticidade molar por resíduo [θ]. A desnaturação térmica para estudo da estabilidade da proteína foi realizada variando-se a temperatura em um intervalo de 10°C a 95°C a cada 0,2°C. Os espectros de CD foram coletados a cada 5°C. Da mesma forma, a estabilidade estrutural de Lia1 foi acompanhada por mudanças na elipticidade a 222nm em cada variação de 0,2°C.

3.2.33.2- Fluorescência intrínseca

Os espectros de fluorescência foram obtidos utilizando-se o Fluorímetro Aminco Bowman. As medidas foram feitas em cubeta de quartzo com as 4 faces polidas utilizando-se 0,2 mg/mL de Lia1 em tampão 10 mM Tris-HCl pH 7.5. A proteína foi excitada a 280 nm (excitação dos aminoácidos tirosina e triptofano) e 295 nm (excitação do aminoácido triptofano) e a leitura foi feita em um intervalo de comprimento de onda de 310 nm a 400 nm. Todos os espectros de emissão foram corrigidos pela contribuição do tampão utilizado.

3.2.33.3- Ensaios de “quenching” da fluorescência do triptofano

Estudos de “quenching” foram realizados utilizando o comprimento de onda de 295nm para excitação e 342nm para emissão. As intensidades de fluorescência foram corrigidas pela diluição e contribuição dos compostos utilizados como “quenchers” (acrilamida e KI) e colocadas em um gráfico como a razão da intensidade de fluorescência inicial (F_0) pela intensidade obtida em cada concentração do “quencher” versus a concentração do “quencher” (F_0/F vs $[Q]$). O coeficiente angular determinado pela regressão linear resultou na constante de Stern Volmer K_{sv} . As soluções estoque de iodeto (KI 1M) foram preparadas antes do uso e mantidas em gelo protegidas da luz.

3.2.33.4- Cálculo de F_{app} dos processos de desnaturação térmica e química

O sinal de CD ou fluorescência observado em uma dada temperatura ou concentração de GdnHCl foi convertido para F_{app} (“apparent fractional extent of unfolding”) utilizando a equação:

$$F_{app} = (Y_{obs} - Y_U) / (Y_U - Y_N)$$

onde Y_{obs} é o sinal observado para CD ou fluorescência e Y_N e Y_U referem-se aos estados nativo e desnaturado, respectivamente. Os valores Y_N e Y_U foram obtidos por extrapolação linear da dependência da temperatura ou agente desnaturante das regiões antes e após a transição.

3.2.34- Espalhamento de raios-X em baixo ângulo - SAXS

Os experimentos de SAXS foram realizados na linha de luz D011A no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas). Os dados foram coletados utilizando o detector MAR CCD 165 (MAR Research) e dez minutos de tempo de exposição para cada medida. O comprimento de onda utilizado foi de 1,488Å. A distância entre amostra e detector foi 1074,35mm. As intensidades de espalhamento foram gravadas na variação angular $0,0501 \text{ \AA}^{-1} < q < 0,3085 \text{ \AA}^{-1}$, em que q é o vetor de espalhamento ($4\pi\sin\theta/\lambda$), e 2θ e λ correspondem ao ângulo e comprimento de onda dos raios-X espalhados, respectivamente. As medidas foram realizadas em temperatura ambiente. O tratamento dos dados foi realizado utilizando o programa FIT2D. Os dados de intensidade foram reduzidos a $I(q)$ versus q através de procedimentos padrões para corrigir a intensidade do feixe incidente, absorção da amostra e subtração do branco. O raio de giro, R_g , foi calculado utilizando a curva gerada com o programa GNOM, o qual também fornece a função de distância de distribuição $P(r)$ e a dimensão máxima das partículas espalhadas, definido como o ponto em que $P(r)$ torna-se zero. O modelo de baixa resolução foi calculado usando o programa DAMMIN. Para aumentar a confiabilidade dos resultados, os modelos finais foram obtidos pela média de seis modelos independentes, calculada, por sua vez, com o programa DAMAVER.

3.2.35- Espalhamento dinâmico de luz - DLS

As medidas de espalhamento dinâmico de luz foram realizadas no instrumento de temperatura controlada DynaPro (Protein Solutions). Os dados foram analisados utilizando a versão 6 do software DYNAMICS (Protein Solutions). Cada medida foi constituída por pelo menos 500 leituras independentes de dez segundos de duração cada. 100µL de uma solução concentrada da proteína Lia1 em tampão 20mM Tris-HCl pH 7,5 foram centrifugados a 15.000xg por 1 hora a 4°C. Uma alíquota de 60µL foi colocada em uma cubeta de quartzo. Todas as medidas foram realizadas a 25°C.

Os diferentes ensaios espectroscópicos apresentados nos itens 3.2.33 a 3.2.35 foram realizados no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – LNLS, Campinas, sob a supervisão do Dr. Francisco Javier Medrano.

3.2.36- Obtenção de curvas de crescimento

As linhagens de levedura foram crescidas em meio YPG a 30°C sob agitação constante por uma noite. No dia seguinte as células, em fase exponencial do crescimento, foram diluídas para $D.O_{600nm}=0,05$. A partir deste momento, as culturas foram monitoradas através da absorbância a 600nm a cada hora em um período de 10 horas.

3.2.37- Ensaio de hipusinação *in vitro*

As proteínas eIF5A selvagem e mutadas foram testadas quanto à capacidade de atuarem como substrato para ambas as enzimas Dys1 e Lia1 em um ensaio *in vitro*. Para isto, as proteínas Dys1 e Lia1, produzidas como proteínas de fusão com cauda de histidinas, foram purificadas isoladamente por afinidade a resina de níquel. Células da linhagem de *E. coli* BL21(DE3) foram transformadas com o vetor plasmidial pET11a contendo o gene *TIF51A* selvagem ou mutado. A produção das diferentes proteínas eIF5A foi induzida por 3 horas pela adição de IPTG 1mM. Após centrifugação das culturas de 5mL, as células foram lisadas por sonicação em 200µL de tampão Tris gelado (Tris-HCl 50mM pH7,5; DTT 1mM) contendo um coquetel de inibidores de protease (Roche). O lisado clarificado foi obtido por centrifugação a 15.000xg a 4°C por 20 minutos. Alíquotas (1-10µL) contendo aproximadamente 2-5µg da proteína eIF5A recombinante foram adicionadas a uma mistura reacional contendo tampão Tris-HCl 125mM pH8,5; NAD 1mM; DTT 6mM; 25µg de BSA e 3µCi de H³-espermidina em um volume final de 20µL. A reação foi iniciada pela adição de 0,1µg e 1 µg das enzimas recombinantes Dys1 e Lia1, respectivamente. Após incubação por 2 horas a 37°C, 500µg de BSA foram adicionados e as proteínas foram precipitadas com 1mL de TCA 10% contendo as poliaminas putrescina, espermidina e espermina na concentração final de 1mM cada. Após remoção da espermidina radioativa com sucessivas lavagens com TCA 10%

contendo poliaminas, as proteínas foram hidrolisadas em HCl 6N a 110 °C por 18 horas. As amostras foram liofilizadas a vácuo sob aquecimento por 2 horas para a completa retirada do HCl, e finalmente suspensas em 100µL de água. 50µL do hidrolisado ácido contendo os aminoácidos desoxihipusina e/ou hipusina marcados radioativamente foram então submetidos à cromatografia líquida de troca-iônica no analisador de aminoácidos modelo D-400 (Durrum).

3.2.38- Ensaio de síntese protéica

As linhagens de levedura de interesse foram crescidas a 30°C em meio rico ou mínimo contendo galactose ou glicose até D.O._{600nm}=0,5. Para a medida do ponto inicial da síntese protéica (tempo 0), 10mL (referente à 1 D.O._{600nm}) de células de cada cultura foram retirados. As culturas foram centrifugadas e os precipitados foram suspensos em 0,2mL de meio YPD contendo 20µCi de H³-leucina. As células foram incubadas na presença do radioativo a 30°C por 20 minutos sob vigorosa agitação. Decorrido esse tempo, 1mL de uma solução gelada contendo 0,3mg/mL de cicloheximida e 1mg/mL de leucina não radioativa foi adicionado. Após incubação no gelo por 1 minuto, as células foram coletadas por centrifugação e os precipitados imediatamente congelados em gelo seco. A transferência do restante da cultura para meio contendo galactose foi então realizada. O procedimento descrito acima foi realizado a cada hora por um período de 5 horas de incubação. Após as sucessivas amostras terem sido coletadas em todos os pontos do experimento, 1mL de TCA 15% foi adicionado aos precipitados. As amostras depois de suspensas foram fervidas a 100°C durante 15 minutos. As amostras foram resfriadas em gelo e os precipitados originados na precipitação por TCA foram coletados por centrifugação a 15.000xg por 5 minutos a 4°C. Após duas lavagens com TCA 10% para a retirada do excesso de radioativo, os precipitados foram dissolvidos em 0,1mL de NaOH 0,2N. Alíquotas de 50µL foram utilizadas para a medida de radioatividade no cintilador LS6000IC (Beckman). Alíquotas de 10µL foram por sua vez utilizadas para a determinação da concentração de proteína total através do ensaio de Bradford (Bio-rad). A taxa de síntese protéica foi calculada para cada amostra e expressa como dpm/µg/20min. Adicionalmente, 20µg de proteínas totais foram separadas por SDS-PAGE. A detecção das proteínas eIF5A humana e de levedura foi realizada por

western blot, utilizando anticorpos específicos para cada uma das proteínas.

3.2.39- Ensaio de síntese de DNA e RNA

A linhagem selvagem W303-1A e a linhagem mutada UBHY-R foram crescidas em YPG até $D.O_{600nm}=0,5$, momento em que foram transferidas para YPD. Para medida da síntese de DNA e RNA, 20 μ Ci de H³-timidina ou H³-uracila foram adicionados em 1mL de cultura, respectivamente. As culturas em duplicatas para cada experimento foram incubadas sob agitação por 20 minutos a 30 °C. A marcação radioativa foi interrompida pela adição de 500 μ L de uma solução gelada contendo 0,3mg/mL de timina (para DNA) ou 0,3mg/mL de uracila (para RNA) não radioativa. Após incubação no gelo por 1 minuto, as células foram coletadas por centrifugação e os precipitados imediatamente congelados em gelo seco. As mesmas medidas foram feitas após 1, 3, 4 e 5 horas de transferência para YPD. Após todas as amostras terem sido coletadas, 1mL de TCA 15% foi adicionado aos precipitados. As amostras depois de suspensas foram fervidas a 100°C durante 15 minutos. As amostras foram resfriadas em gelo e os precipitados originados na precipitação por TCA foram coletados por centrifugação a 15.000xg por 5 minutos a 4°C. Após duas lavagens com TCA 10% para a retirada do excesso de radioativo, os precipitados foram dissolvidos em 0,1mL de NaOH 0,2N. Alíquotas de 50 μ L foram utilizadas para a medida de radioatividade no cintilador LS6000IC (Beckman).

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

Linhagem	Descrição	Referência
SVL14	<i>MATa his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 ade2-1 ura3-1 can1-100 tif51-A-1^{ts}</i>	(Valentini et al., 2002)
SVL26	<i>MATa his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 ade2-1 ura3-1 can1-100 tif51-A-2^{ts}</i>	(Valentini et al., 2002)
SVL32	<i>MATa his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 ade2-1 ura3-1 can1-100 tif51-A-3^{ts}</i>	(Valentini et al., 2002)
SVL55	<i>MATa ura3-52 trp1Δ63 leu2Δ1</i>	Dra. Pamela Silver
SVL56	<i>MATα ura3-52 his3Δ200 leu2Δ1</i>	Dra. Pamela Silver
SVL78	<i>MATa ura3-52 his3Δ200 trp1Δ63 leu2Δ1</i>	Dra. Pamela Silver
SVL407	<i>MATa ura3-52 trp1Δ63 leu2Δ1 lia1Δ::HIS3</i>	este trabalho
SVL408	<i>MATα ura3-52 leu2Δ1 lia1Δ::HIS3</i>	este trabalho
HHY13a	<i>MATα leu2 his3 ura3 trp1 can1 tif51AΔ::LEU2 tif51B::HIS3 (pBM-TIF51A)</i>	(Schwelberger et al., 1993)
HHY212d	<i>MATα leu2 his3 ura3 trp1 can1 tif51AΔ::LEU2 tif51B::HIS3 (pBM-TIF51A) (p414GAL1-helF5A-1m)</i>	este trabalho
HHY212s	<i>MATα leu2 his3 ura3 trp1 can1 tif51AΔ::LEU2 tif51B::HIS3 (p414GAL1-helF5A-1m)</i>	este trabalho
L40	<i>MATa his3Δ200 trp1-901 leu2-3,112 ade2 gal4 gal80 LYS::(lexAop)₄-HIS3 URA3::(lexAop)₈-lacZ</i>	(Bartel e Fields, 1995)
UBHY-R	<i>MATα leu2 his3 ura3 trp1 can1 tif51AΔ::LEU2 tif51B::HIS3 (YCpUB-R5A)</i>	(Kang e Hershey, 1994)
W303-1A	<i>MATα leu2-3 his3-11,112 ade2-1,15 ura3-1 trp1-1 can1-100</i>	(Schwelberger et al., 1993)

Tabela 2. Plasmídeos utilizados nos experimentos deste estudo.

Plasmídeo	Descrição	Origem
pSV36	<i>TIF51A</i> clonado no vetor pYGEX	coleção do laboratório
pSV40	<i>tif51A</i> ^{K51R} clonado no vetor pYGEX	coleção do laboratório
pSV42	plasmídeo contendo o gene <i>HIS3</i>	Dra. Pamela Silver
pSV64	vetor 2 μ , <i>LEU2</i> , Ap ^R	
pSV65	vetor 2 μ , <i>URA3</i> , Ap ^R	Dra. Pamela Silver
pSV76	vetor de expressão de proteína de fusão com GFP (N-terminal, pGAL) em levedura, <i>URA3</i> , 2 μ , Ap ^R	Dra. Pamela Silver
pSV107	<i>TIF51A</i> clonado em pSV65	coleção do laboratório
pSV278	<i>TIF51A</i> clonado em pBTM116	este trabalho
pSV285	<i>TIF51A</i> clonado em pACT	este trabalho
pSV355	<i>LIA1</i> clonado em pSV65	este trabalho
pSV356	<i>LIA1</i> clonado em pGEX-4T-1	este trabalho
pSV360	fragmento <i>Bam</i> HI- <i>Sma</i> I do pSV356 (<i>LIA1</i>) clonado em pYGEX	este trabalho
pSV361	<i>LIA1</i> clonado em pYGEX	este trabalho
pSV420	<i>tif51A</i> (Δ 1-63) clonado em pBTM116	este trabalho
pSV421	<i>tif51A</i> (Δ 1-90) clonado em pBTM116	este trabalho
pSV422	<i>tif51A</i> (Δ 90-152) clonado em pBTM116	este trabalho
pSV429	<i>tif51A</i> (Δ 1-42) clonado em pBTM116	este trabalho
pSV430	<i>DYS1</i> clonado em pGEX-4T-1	este trabalho
pSV431	<i>DYS1</i> clonado em pYGEX	este trabalho
pSV464	<i>LIA1</i> clonado em vetor 2 μ , <i>LEU2</i>	este trabalho
pSV466	<i>LIA1</i> clonado em pSV76	este trabalho
pSV492	<i>LIA1</i> clonado em pBTM116	este trabalho
pSV502	<i>LIA1</i> clonado em pET14b	este trabalho
pSV519	<i>DYS1</i> clonado em vetor pJG4-5	coleção do laboratório
pSV549	<i>DYS1</i> clonado em pBTM116	este trabalho
pSV557	<i>dys1</i> (Δ 1-82) clonado em pACT	
pSV558	<i>DYS1</i> clonado em pACT	
pSV559	<i>dys1</i> (Δ 1-24) clonado em pACT	
pSV898	<i>lia1</i> ^{H79A} em vetor pBTM116	este trabalho
pSV899	<i>lia1</i> ^{E80A} em vetor pBTM116	este trabalho
pSV902	<i>lia1</i> ^{H112A} em vetor pBTM116	este trabalho
pSV903	<i>lia1</i> ^{E238A} em vetor pBTM116	este trabalho
pSV905	<i>lia1</i> ^{E116D} em vetor pBTM116	este trabalho
pSV906	<i>lia1</i> ^{E116A} em vetor pBTM116	este trabalho

pSV907	<i>lia1</i> ^{H237A} em vetor pBTM116	este trabalho
pSV910	<i>lia1</i> ^{H270A} em vetor pGEX-4T-1	este trabalho
pSV912	<i>lia1</i> ^{E113A} em vetor pGEX-4T-1	este trabalho
pSV913	<i>lia1</i> ^{E271A} em vetor pGEX-4T-1	este trabalho
pSV918	<i>lia1</i> ^{H270A} em vetor pBTM116	este trabalho
pSV920	<i>lia1</i> ^{E113A} em vetor pBTM116	este trabalho
pSV921	<i>lia1</i> ^{E271A} em vetor pBTM116	este trabalho
pSV940	<i>LIA1</i> clonado no vetor pACT (cDNA do #267 obtido do rastreamento por duplo-híbrido de eIF5A)	este trabalho
pSV945	<i>lia1</i> ^{H79A} em vetor pGEX-4T-1	este trabalho
pSV946	<i>lia1</i> ^{E80A} em vetor pGEX-4T-1	este trabalho
pSV947	<i>lia1</i> ^{H112A} em vetor pGEX-4T-1	este trabalho
pSV948	<i>lia1</i> ^{H237A} em vetor pGEX-4T-1	este trabalho
pSV949	<i>lia1</i> ^{E238A} em vetor pGEX-4T-1	este trabalho
pSV950	<i>lia1</i> ^{E116A} em vetor pGEX-4T-1	este trabalho
pSV951	<i>lia1</i> ^{E116D} em vetor pGEX-4T-1	este trabalho
pACT	vetor de expressão de proteína de fusão com Gal4 (domínio de ativação da transcrição) em levedura, <i>LEU2</i> , 2 μ , Ap ^R	(Bartel e Fields, 1995)
pBTM116	vetor de expressão de proteína de fusão com LexA (proteína de ligação ao DNA) em levedura, <i>TRP1</i> , 2 μ , Ap ^R	(Bartel e Fields, 1995)
pGEX-4T-1	vetor de expressão de proteína de fusão com GST em bactéria, Ap ^R	Amersham Biosciences
pYGEX	vetor de expressão de proteína de fusão com GST em levedura, <i>URA3</i> , 2 μ , Ap ^R	Dra. Pamela Silver
pET14b	vetor de expressão de proteína de fusão com cauda de histidinas em bactéria, Ap ^R	Amersham Biosciences
pBM-TIF51A	vetor <i>CEN4</i> , <i>ARS1</i> , Ap ^R , <i>URA3</i> , <i>GAL10</i> contendo o gene <i>TIF51A</i>	(Schwelberger <i>et al.</i> , 1993)
YCpUB-R5A	vetor <i>CEN11</i> , <i>ARSH4</i> , Ap ^R , <i>URA3</i> , <i>GAL10</i> contendo o gene <i>TIF51A</i> em fusão com elementos desestabilizadores (gene de ubiquitina, códon de arginina e <i>lacI</i>)	(Kang e Hershey, 1994)
p414GAL1	Vetor <i>CEN6</i> , <i>ARSH4</i> , Ap ^R , <i>TRP1</i> , <i>GAL1</i> , mutantes heIF5A-1	este trabalho

Tabela 3- Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos deste estudo.

Oligonucleotídeo	Descrição	Sítio de restrição*
SVO19	5' - gCCTCATCCAAAggCgC - 3'	—
SVO52	5' - CgCggATCCgAATTACACTgCCTgCATAAagg - 3'	<i>Bam</i> HI
SVO102	5' - CgCggATCCAAATgTCTgACgAAgAAC - 3'	<i>Bam</i> HI
SVO154	5' - CCggAATTCCTACgTATAgTCCTTTggTTC - 3'	<i>Eco</i> RI
SVO155	5' - CCggAATTCCTATgCTTTgAAgACCAg - 3'	<i>Eco</i> RI
SVO156	5' - CCggAATTCATgTCTACTAACTTTg - 3'	<i>Eco</i> RI
SVO157	5'-ACTgTAgTCCTTCTAACATACCACgCAAgAAgAAAA AAAAAACggCCTCCTCTAgTACACTC- 3'	—
SVO158	5'-ATACAATgATTATTgTTACTATCATTATTgATgATg CTgATTCTTgCgCgCCTCgTTCAGAAAg - 3'	—
SVO159	5' - gTCgTgggCgTTTCCAg - 3'	—
SVO181	5' - CCggAATTCggAATACAAAAGCCgCTg - 3'	<i>Eco</i> RI
SVO182	5' - CgCggATCCATgTCCgATATCAAC - 3'	<i>Bam</i> HI
SVO261	5' - ggAATTCCATATgCTTACTAACTTTg - 3'	<i>Nde</i> I
SVO262	5' - ggAATTCCATATgCTAATTAgCAgTTggAg - 3'	<i>Nde</i> I
SVO409	5' - CTgAgTTgTTgAAggCAgAAgTggCCTAC - 3'	H79A
SVO410	5' - gTAggCCACTTCTgCCTTCAACAACTCAg - 3'	H79A
SVO411	5' - gTTgTTgAAgCACgCAgTggCCTACgTgTTg - 3'	E80A
SVO412	5' - CAACACgTAggCCACTgCgTgCTTCAACAAC - 3'	E80A
SVO417	5' - gAACCAATggTgAgAgCAgAAgCCgCTgAg - 3'	H112A
SVO418	5' - CTCAGCggCTTCTgCTCTCACCATTggTTC - 3'	H112A
SVO419	5' - CAATggTgAgACACgCAgCCgCTgAggCTTTg - 3'	E113A
SVO420	5' - CAAAgCCTCAgCggCTgCgTgTCTCACCATTg - 3'	E113A
SVO421	5' - ACACgAAgCCgCTgATgCTTTgggTgGCCCTA - 3'	E116D
SVO422	5' - TAgggCACCCAAAgCATCAgCggCTTCgTgT - 3'	E116D
SVO423	5' - ACACgAAgCCgCTgCAgCTTTgggTgCCCTA - 3'	E116A
SVO424	5' - TAgggCACCCAAAgCTgCAgCggCTTCgTgT - 3'	E116A
SVO435	5' - CCTTTTCAAggCTgAAATCgCCTACgTC - 3'	H237A
SVO436	5' - gACgTAggCgATTTCAgCCTTgAAAAggg - 3'	H237A
SVO437	5' - CCTTTTCAAgCATgCAATCgCCTACgTC - 3'	E238A
SVO438	5' - gACgTAggCgATTgCATgCTTgAAAAggg - 3'	E238A
SVO443	5' - CAATggTTAgggCTgAAgCTgCTgAAgC - 3'	H270A
SVO444	5' - gCTTCAGCAgCTTCAGCCCTAACCAT - 3'	H270A
SVO445	5' - ATggTTAggCATgCAgCTgCTgAAgCC - 3'	E271A
SVO446	5' - ggCTTCAGCAgCTgCATgCCTAACCAT - 3'	E271A

*Os sítios de restrição incorporados nos oligonucleotídeos estão sublinhados. A substituição para o aminoácido de interesse em Lia1 promovida pela utilização de um par de oligonucleotídeos na mutagenese sítio-dirigida está indicada.

4- RESULTADOS

4.1- Identificação de fatores celulares que interagem fisicamente com eIF5A por meio do rastreamento por duplo-híbrido

Com o intuito de contribuir para a elucidação da função biológica de eIF5A, o sistema de duplo-híbrido foi utilizado para rastrear uma biblioteca de cDNA de *S. cerevisiae* cujos clones apresentavam-se em fusão com o domínio de ativação de Gal4 (pACT). O gene *TIF51A*, por sua vez, foi clonado no vetor pBTM116, o qual permite a produção da proteína de fusão LexA-eIF5A (pSV278). Para que o rastreamento por duplo-híbrido pudesse ser iniciado, a linhagem repórter L40 foi transformada com ambas as construções plasmidiais pBTM116-*TIF51A* e pACT e submetida ao ensaio de western blot com a finalidade de avaliar a correta produção da proteína de fusão a ser utilizada como isca. No painel A da Figura 6, as canaletas 1 a 4 contém lisados dos transformantes A-D e a canaleta 5 contém lisado da levedura L40 contendo o vetor plasmidial pBTM116 utilizada como controle negativo. As bandas correspondentes às proteínas eIF5A endógena e LexA-eIF5A estão indicadas. Esses resultados confirmam a produção de LexA-eIF5A pelos transformantes selecionados. Posteriormente, os quatro transformantes foram checados quanto à expressão basal dos marcadores deste sistema de duplo-híbrido. A capacidade de crescer em meio SC -Leu/Trp/His assim como a atividade de β -galactosidase dessas leveduras foi comparada a dois controles positivos e um negativo (L40 contendo pBTM-*NIP7* + pACT-*NOP8* (++)), pBTM-*NIP7* + pACT-*RRP43* (+) ou pBTM116 + pACT vazios (-)) (Zanchin e Goldfarb, 1999). Como pode ser observado no painel B da Figura 6, LexA-eIF5A na presença do domínio de ativação de Gal4 não induz a expressão de ambos os genes repórteres do sistema de duplo-híbrido. Diante disto, os clones da biblioteca que codificarem proteínas capazes de interagir com eIF5A serão identificados pela capacidade de causar a ativação dos genes repórteres, *HIS3* e *LacZ*.

No rastreamento de eIF5A $1,1 \times 10^6$ transformantes foram analisados. Dentre 3056 transformantes inicialmente positivos para histidina, 2443 clones apresentaram fenótipo His⁺ após segunda passagem em meio drop-out triplo. Destes, 59 foram positivos para β -galactosidase. Na etapa que se refere ao "plasmid linkage", três clones foram abandonados devido à impossibilidade de recuperar o plasmídeo

LEU2. Os outros 56 clones tiveram seus plasmídeos purificados e reintroduzidos na linhagem repórter L40 contendo a construção plasmidial pBTM116-*TIF51A* (pSV278). Quatorze clones apresentaram fenótipos His⁺ e β-gal⁺ confirmando a ligação com o plasmídeo e sendo, portanto, considerados clones verdadeiros. Os clones tiveram então seus plasmídeos *LEU2* sequenciados. *DYS1* foi o gene mais frequente, sendo encontrado em 10 dos 14 clones isolados. Os quatro clones restantes, por sua vez, revelaram o gene *YJR070C*, sugerindo que este gene codifica o mais novo parceiro de eIF5A. Neste estudo, *YJR070C* foi nomeado *LIA1*, pois codifica um ligante de eIF5A. Os dados gerados neste rastreamento estão apresentados na Tabela 4. O painel C da Figura 6 apresenta os fenótipos His⁺ e β-gal⁺ de um dos clones contendo o cDNA de Dys1 (pSV558) ou Lia1 (pSV940), evidenciando a interação física estabelecida entre estas proteínas. A linhagem L40 contendo pBTM116-*TIF51A* + pACT ou pBTM116-*NIP7* + pACT-*NOP8* (Zanchin e Goldfarb, 1999) foi utilizada como controle negativo e positivo, respectivamente. Como mostrado, a interação de eIF5A com Lia1 não é tão intensa como com Dys1.

Tabela 4- Rastreamento por duplo-híbrido de eIF5A

NÚMERO DE TRANSFORMANTES ANALISADOS				LIGAÇÃO COM O PLASMÍDEO			CLONES SEQUENCIADOS	GENES IDENTIFICADOS
TOTAL	HIS ⁺	CONFIRMADOS HIS ⁺	β-GAL ⁺	TESTADOS	HIS ⁺	B-GAL ⁺		
1,1x10 ⁶	3056	2443	59	56	14	14	14	10# = <i>DYS1</i> 4# = <i>LIA1</i>

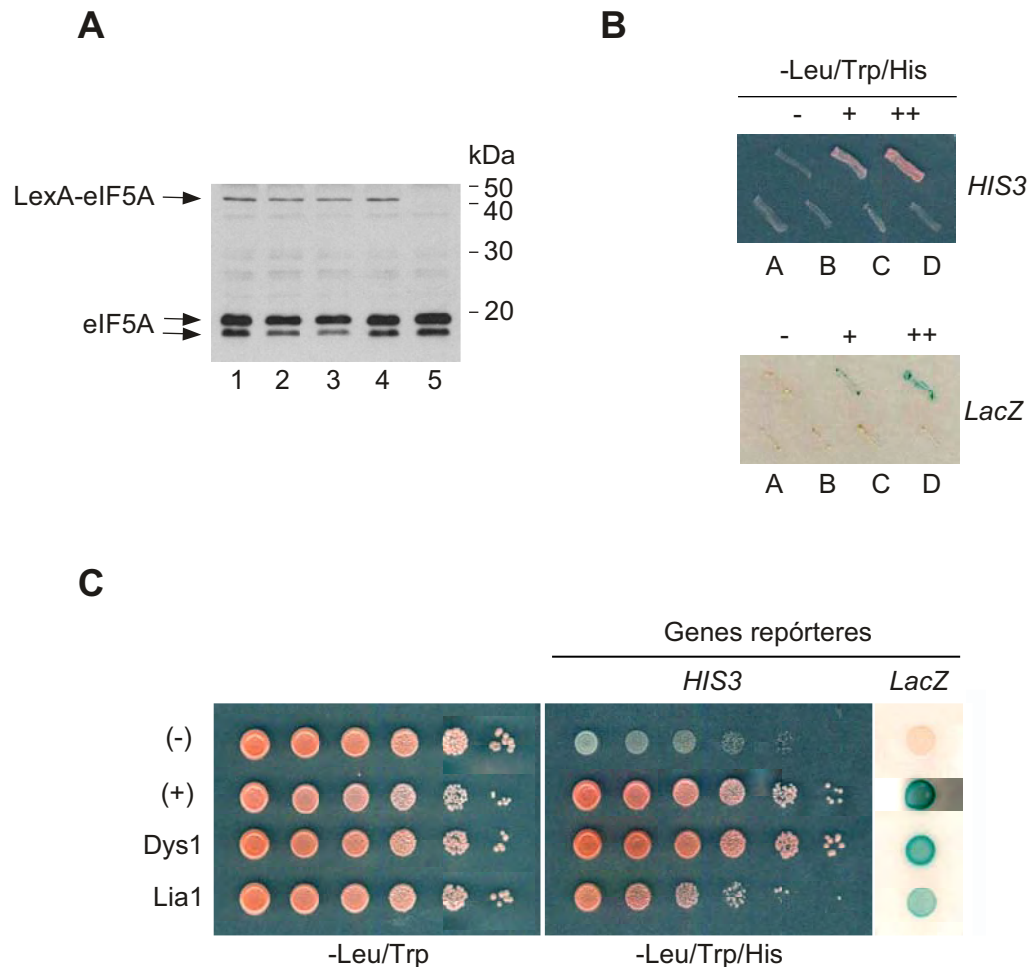


Figura 6- Rastreamento por duplo-híbrido utilizando eIF5A como isca. A: Avaliação da produção da proteína de fusão LexA-eIF5A. Lisados da linhagem L40 transformada com os plasmídeos pBTM116-*TIF51A* e pACT (canaletas 1 a 4) ou pBTM116 (canaleta 5) foram submetidos a SDS-PAGE 12% e western blot utilizando anticorpo policlonal anti-eIF5A (1:5.000). A proteína de fusão LexA-eIF5A bem como eIF5A endógena estão indicadas por setas. **B:** Teste de auto-ativação dos genes repórteres *HIS3* e *lacZ* pela proteína de fusão LexA-eIF5A. Transformantes da linhagem L40 contendo concomitantemente os plasmídeos pBTM116-*TIF51A* e pACT (A-D) foram plaqueados em meio SC -Leu/Trp/His e ensaiados para -galactosidase em membrana de nitrocelulose após crescimento em SC -Leu/Trp. A linhagem L40 contendo as construções plasmidiais pBTM116-*NIP7* + pACT(-), pBTM116-*NIP7* + pACT-*RRP43* (+) ou pBTM116-*NIP7* + pACT-*NOP8* (++) foi utilizada como controle (Zanchin e Goldfarb, 1999). **C:** Clones identificados no rastreamento por duplo-híbrido de eIF5A. Diluições seriadas (1:10) das culturas das linhagens produzindo a proteína LexA-eIF5A, assim como as proteínas Dys1 ou Lia1 em fusão com o domínio de ativação de Gal4, foram plaqueadas em meio SC -Leu/Trp e SC -Leu/Trp/His, para avaliação do controle de crescimento e do gene repórter *HIS3*, respectivamente. O crescimento foi avaliado após 2 a 3 dias de incubação a 30°C. O fenótipo β -gal⁺ foi avaliado através do ensaio de β -galactosidase. A linhagem L40 contendo as construções plasmidiais pBTM116-*TIF51A* + pACT ou pBTM116-*NIP7* + pACT-*NOP8* foi utilizada como controle negativo e positivo, respectivamente.

4.2- Produção de anticorpo policlonal anti-Lia1 em coelho

A região codificadora do gene *LIA1* foi amplificada por PCR utilizando os oligonucleotídeos SVO 154 e SVO 155. O produto de PCR obtido foi então clonado no vetor de expressão pGEX-4T-1 para a produção de GST-Lia1, gerando a construção plasmidial pSV356. Células de *E. coli* DH5 α competentes transformadas com a construção plasmidial obtida foram submetidas ao teste de expressão da proteína de fusão GST-Lia1, como descrito no item 3.2.14. O painel A da Figura 7 mostra o resultado de SDS-PAGE após coloração com Coomassie Blue para a visualização das proteínas. As canaletas 2 a 5 apresentam, respectivamente, os lisados obtidos da cultura antes e após 1, 2 e 3 horas de indução com IPTG. Nesta figura é possível observar um aumento significativo da banda correspondente à proteína de fusão de interesse de aproximadamente 63kDa. A canaleta 1 apresenta o padrão de tamanho molecular 10kDa (Invitrogen). O período de indução de 3 horas foi considerado suficiente para a expressão de GST-Lia1. Após o teste de indução com IPTG, a proteína de fusão GST-Lia1 foi produzida em larga escala e purificada por afinidade à resina glutathione-sepharose em um aparelho de cromatografia líquida FPLC (Amersham Biosciences), como descrito no item 3.2.15. As frações coletadas foram analisadas por eletroforese (SDS-PAGE 12%) e coradas com Coomassie. No painel B da Figura 7 estão apresentadas as amostras obtidas nas diferentes etapas do processo de purificação da proteína GST-Lia1. A canaleta 1 contém o padrão de tamanho molecular 10kDa (Invitrogen). As canaletas 2 e 3 são correspondentes à fração não ligada e à etapa de lavagem da resina, respectivamente. Na canaleta 4 é possível visualizar a purificação da proteína de interesse GST-Lia1, após a eluição com glutathione livre.

A proteína GST-Lia1 purificada foi utilizada para a imunização de um coelho segundo o protocolo descrito em 3.2.16. O painel C da Figura 7 corresponde ao western blot contra extrato total de levedura, utilizando o soro obtido a partir de cada um dos sangramentos parciais do coelho. O soro anti-Lia1, obtido após a primeira etapa da imunização (1ª sangria), foi testado nas diluições 1:200, 1:500 e 1:1.000 (canaletas 3 a 5). Como pode ser observado, o soro anti-Lia1 já reconheceu a proteína de 36kDa a partir do extrato total de levedura selvagem. Entretanto, nota-se que o título do soro melhorou significativamente após a conclusão do esquema de imunização. As canaletas 6 a 8 mostram os resultados obtidos com a segunda

sangria (diluições 1:2.000, 1:5.000 e 1:10.000) e revelam um título já relativamente alto para o anticorpo produzido. Nas canaletas 9 a 11 estão apresentadas as diluições 1:5.000, 1:10.000 e 1:20.000 referentes à terceira sangria. Na canaleta 12 foi utilizado o soro anti-eIF5A (1:5.000) como controle positivo do western blot. O soro do coelho proporcionou uma boa resposta imunológica, pois o mesmo permitiu em todas as sangrias a detecção da proteína Lia1. Ainda, como observado na canaleta 11 da Figura 7, o título 1:20.000 permitiu uma melhor detecção da proteína Lia1 e um menor sinal da banda revelada logo abaixo de Lia1. Esta proteína pode ser um produto de degradação de Lia1, uma vez que não é a mesma banda detectada com o soro pré-imune (canaleta 1). Sendo assim, para a detecção de Lia1 nos ensaios posteriores, foi utilizado o soro referente à 3ª sangria na diluição 1:20.000.

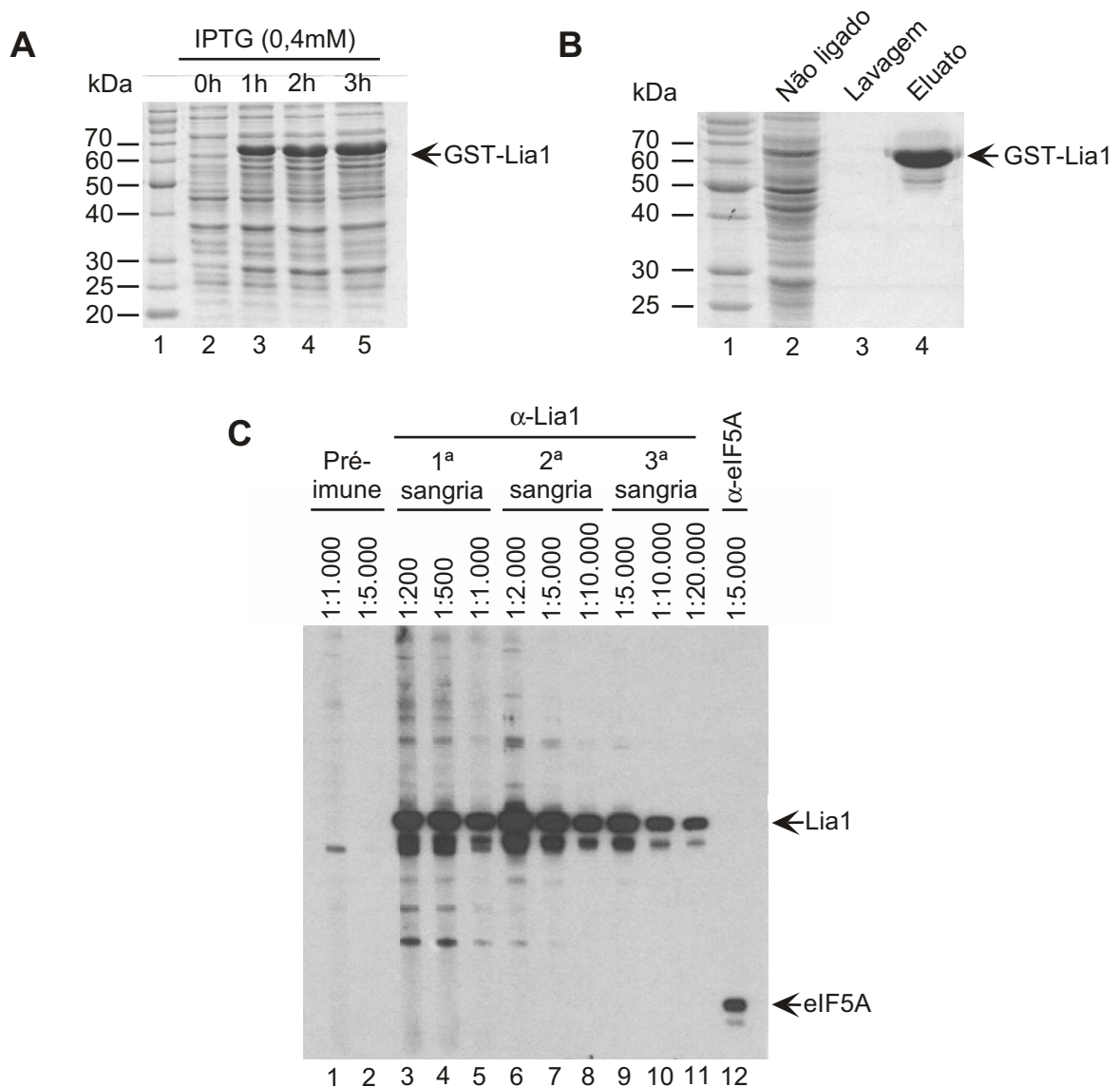


Figura 7- Análise das etapas da produção e purificação da proteína de fusão GST-Lia1 e avaliação do anticorpo policlonal anti-Lia1 produzido em coelho. **A:** Teste de indução da expressão do gene da proteína de fusão GST-Lia1. Lisados obtidos da cultura antes e após 1, 2 e 3 horas de indução com IPTG (canaletas 2 a 5, respectivamente). **B:** Etapas da purificação de GST-Lia1. Alíquota do material não ligado à resina de glutationa-sepharose (canaleta 2), alíquotas das frações coletadas na etapa de lavagem da resina (canaleta 3) e após a eluição da proteína de fusão (canaleta 4). As proteínas foram separadas por SDS-PAGE e coradas com Coomassie Blue. A proteína de fusão GST-Lia1 está apontada por uma seta. **C:** Análise do anticorpo policlonal anti-Lia1. Ensaio de western blot contra extrato total de leveduras, utilizando os soros obtidos após subseqüentes imunizações com a proteína GST-Lia1. As proteínas Lia1 e eIF5A estão indicadas na figura por setas.

4.3- Confirmação da interação física entre as proteínas reveladas no rastreamento de duplo-híbrido de eIF5A por meio de ensaios de copurificação

Como o rastreamento por duplo-híbrido pode gerar artefatos, as interações evidenciadas devem ser sempre validadas por outros ensaios. Desta forma, o método de escolha para a confirmação da interação física de Dys1 ou Lia1 a eIF5A foi o de copurificação (GST pulldown).

Para os ensaios de copurificação, células da linhagem SVL55 produzindo as proteínas de fusão GST-eIF5A (pSV36), GST-eIF5A^{K51R} (pSV40), GST-Lia1 (pSV361) ou GST-Dys1 (pSV431) foram utilizadas. Como discutido na introdução, a proteína mutada eIF5A^{K51R} não é funcional (Schnier *et al.*, 1991). Quantidades normalizadas dos extratos contendo as proteínas de fusão de interesse foram submetidas ao processo de purificação por afinidade à resina de glutathione-sepharose como descrito no item 3.2.18. As proteínas copurificadas foram então reveladas por western blot. Os resultados obtidos neste ensaio estão apresentados na Figura 8. A membrana de nitrocelulose corada com Ponceau-S revela as proteínas purificadas aplicadas no gel utilizado para o western blot (controle de carregamento). Como pode ser observado no painel A, a proteína Dys1 (43kDa) foi copurificada com ambas as proteínas de fusão GST-eIF5A e GST-eIF5A^{K51R} (canaletas 2 e 3, respectivamente), mas não com GST sozinha (canaleta 1), utilizada como controle negativo do experimento. Similarmente, eIF5A (18kDa) também foi copurificada por GST-Dys1 (painel B, canaleta 2) e por GST-Lia1 (painel C, canaleta 2), mas não por GST. Por outro lado, GST-eIF5A e GST-eIF5A^{K51R} não permitiram a copurificação de Lia1 (dados não mostrados). O insucesso em revelar a interação física entre Lia1 e eIF5A através deste ensaio pode ser devido a uma baixa produção de Lia1 na célula. Dessa forma, a copurificação de Lia1 por GST-eIF5A foi realizada na presença de excesso da proteína Lia1, produzida a partir da construção plasmidial *LIA1/LEU2/2μ* (pSV464). Como pode ser observado no painel D da Figura 8, a proteína Lia1 foi copurificada com GST-eIF5A (canaleta 2) mas não com GST (canaleta 1) ou com GST-eIF5A^{K51R} (canaleta 3). Os resultados em conjunto confirmam, portanto, a interação física das proteínas Dys1 e Lia1, evidenciadas no rastreamento por duplo-híbrido, com eIF5A.

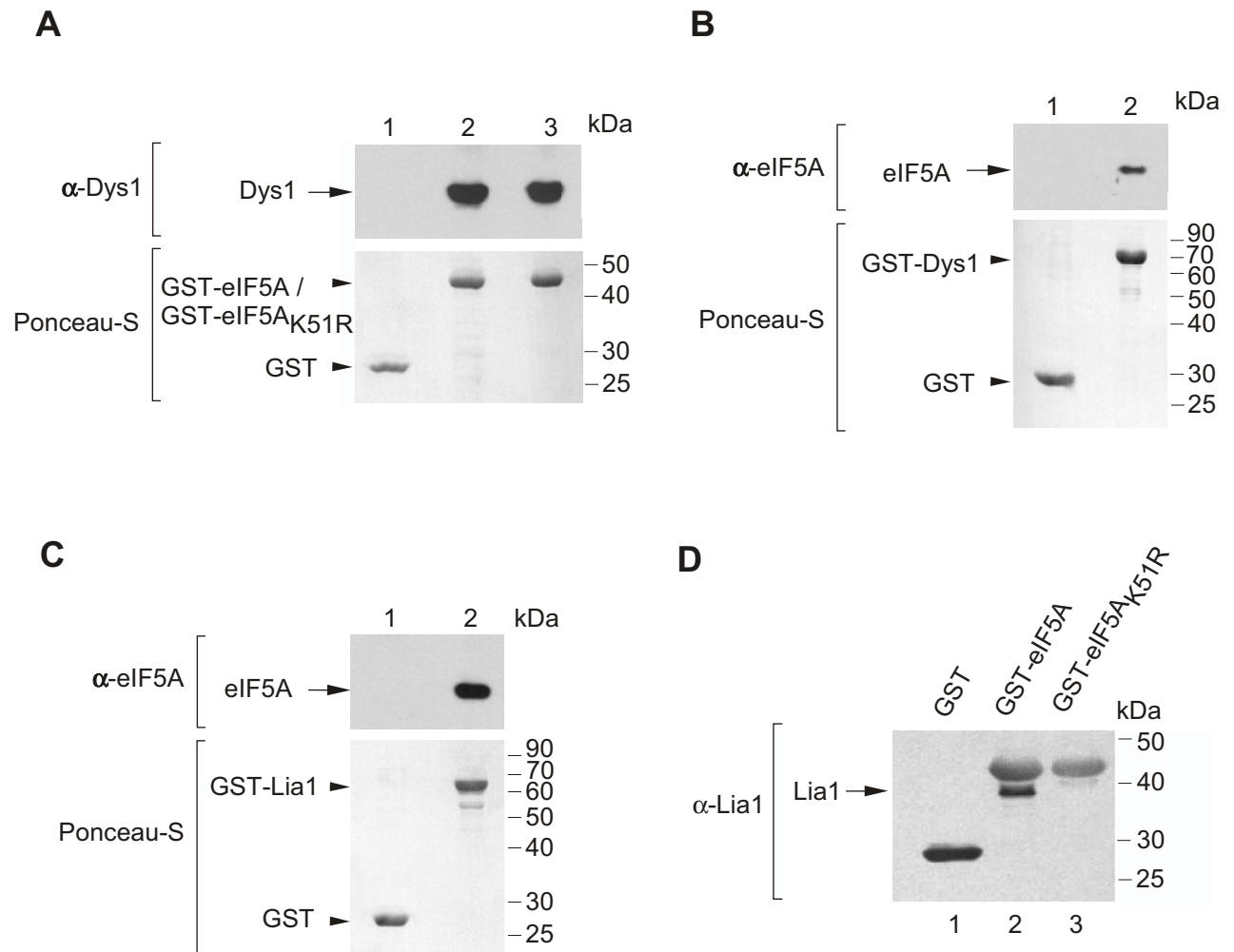


Figura 8- Confirmação das interações físicas reveladas no rastreamento por duplo-híbrido de eIF5A por copurificação. A: Copurificação de Dys1 por GST-eIF5A (canaleta 2) e GST-eIF5A_{K51R} (canaleta 3), mas não por GST sozinha (canaleta 1). O ensaio de western blot foi revelado com soro policlonal anti-Dys1. **B:** Copurificação de eIF5A por GST-Dys1 (canaleta 2). **C:** Copurificação de eIF5A por GST-Lia1 (canaleta 2). Os ensaios de western blot dos painéis B e C foram revelados com soro policlonal anti-eIF5A. Novamente, GST (canaleta 1) não copurificou eIF5A. A membrana de nitrocelulose corada com ponceau-S nos três painéis revela as proteínas purificadas pela resina de glutathiona-sepharose (controle de carregamento). **D:** Copurificação de Lia1 com GST, GST-eIF5A e GST-eIF5A_{K51R} na presença de excesso de Lia1. O ensaio de western blot foi revelado com soro policlonal anti-Lia1, o qual reconhece GST. As pontas das setas indicam a posição das proteínas purificadas, enquanto que as setas mostram as proteínas copurificadas. Os anticorpos policlonais anti-eIF5A e anti-Dys1 já estavam disponíveis no laboratório.

4.4- Identificação dos sítios de ligação de eIF5A às proteínas Dys1 e Lia1

Para definir qual domínio de eIF5A é requerido para a interação com Dys1 e Lia1, deleções na proteína eIF5A foram geradas a partir de sítios de restrição presentes no gene *TIF51A*. Através das estratégias descritas no item 3.2.19 foram geradas três deleções no domínio N-terminal de eIF5A e apenas uma deleção no domínio C-terminal (Figura 9, painel A). No painel B da Figura 9 está apresentada a estrutura terciária predita para a proteína eIF5A humana (Facchiano *et al.*, 2001). As setas indicam a posição do resíduo de aminoácido correspondente da proteína de levedura e, conseqüentemente, os locais em que as deleções foram geradas. As proteínas LexA-eIF5A truncadas capazes de interagir com as proteínas de interesse Dys1 e Lia1, fusionadas ao domínio de ativação de Gal4 presente no vetor pACT, foram identificadas pela capacidade de causar a ativação do gene repórter do sistema de duplo-híbrido *HIS3*.

A interação física entre as formas truncadas de eIF5A e Dys1 foi ensaiada utilizando um dos clones mais fortes selecionados no rastreamento, Dys1(K29), o qual apresenta uma deleção de 28 aminoácidos da região N-terminal (pSV557). Novamente, a linhagem L40 contendo pBTM116-*TIF51A* + pACT ou pBTM116-*NIP7* + pACT-*NOP8* foi utilizada como controles negativo e positivo, respectivamente (Zanchin e Goldfarb, 1999). Como pode ser observado no painel C da Figura 9, a ligação de eIF5A a Dys1 não foi abolida por completo por nenhuma deleção de eIF5A. A deleção dos resíduos 1-42 ou 1-63 de eIF5A enfraquece a interação com Dys1 provavelmente devido a uma mudança conformacional na estrutura de eIF5A. Isto sugere que o correto dobramento do substrato é essencial para uma interação eficiente com Dys1. Por outro lado, os resultados apresentados no painel D da Figura 9 demonstram claramente que Lia1 (pSV940) interage com a região C-terminal de eIF5A, uma vez que as linhagens contendo as deleções na região N-terminal (Δ 1-42, Δ 1-63 e Δ 1-90) apresentam crescimento igual à linhagem contendo a proteína selvagem. Entretanto, o crescimento da linhagem contendo a deleção do domínio C-terminal de eIF5A (Δ 90-152) foi bastante reduzido em SC -Leu/Trp/His, semelhante ao crescimento observado no controle negativo.

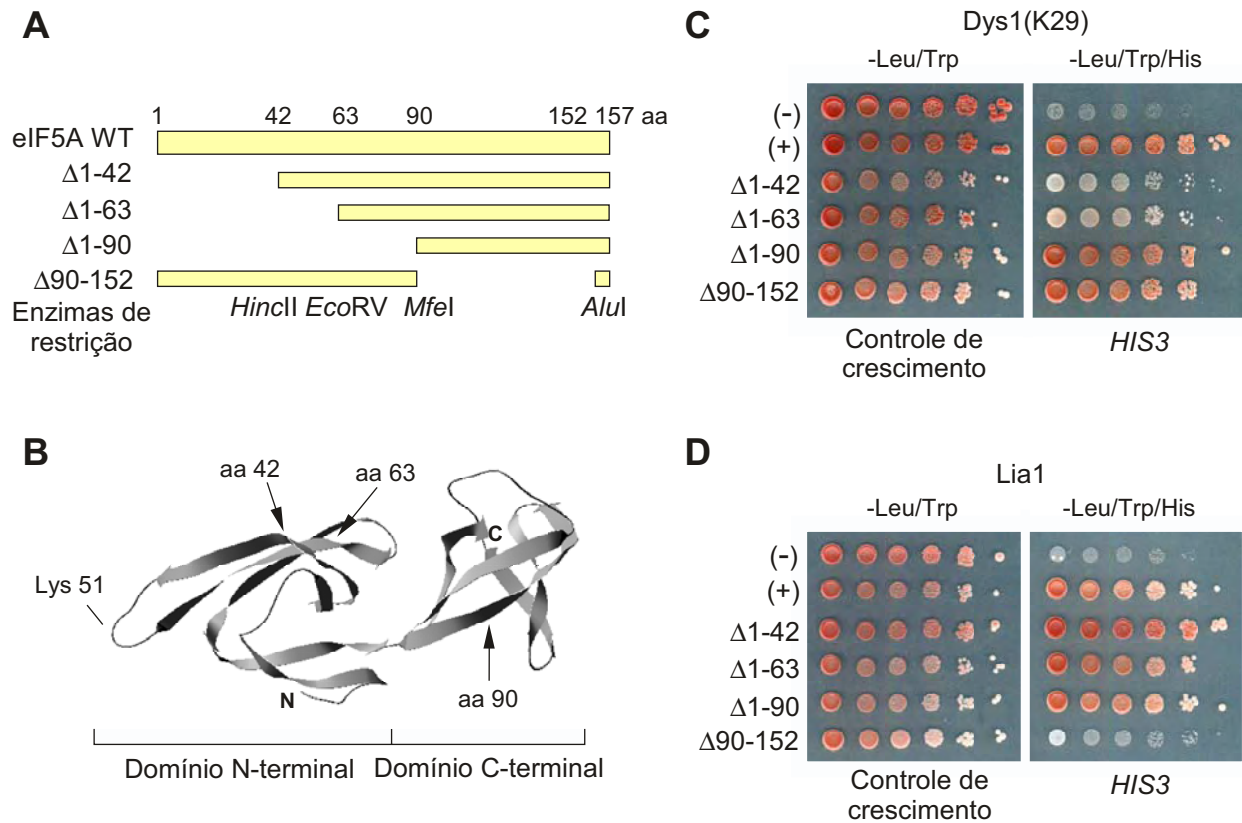


Figura 9- Identificação do sítio de ligação da proteína eIF5A às proteínas Dys1 e Lia1. **A:** Esquema simplificado das diferentes deleções produzidas em LexA-eIF5A, aqui representada apenas a proteína eIF5A. Adicionalmente, os sítios de restrição presentes no gene *TIF51A* e utilizados para obter as deleções correspondentes na proteína estão sendo mostrados. **B:** Estrutura terciária predita da proteína eIF5A humana. As setas indicam a posição dos aminoácidos correspondentes à proteína de levedura e os sítios das deleções. **C:** Mapeamento da região de eIF5A responsável pela ligação à proteína Dys1. Neste ensaio foi utilizada a forma truncada Dys1(K29). **D:** Mapeamento da região de eIF5A responsável pela ligação à proteína Lia1. Diluições seriadas (1:10) das culturas das linhagens produzindo as diferentes proteínas LexA-eIF5A selvagem e truncadas, assim como as proteínas Dys1 ou Lia1 em fusão com o domínio de ativação de Gal4, foram plaqueadas em meio SC -Leu/Trp e SC -Leu/Trp/His. O crescimento foi avaliado após 2 a 3 dias de incubação a 30°C. Como controle positivo foi utilizada a linhagem L40 contendo as construções plasmidiais pBTM116-*NIP7* + pACT-*NOP8* (Zanchin e Goldfarb, 1999). Como controle negativo, foi utilizada a linhagem L40 contendo pBTM116-*TIF51A* e o vetor vazio pACT.

4.5- Efeito inibitório da α -hélice presente na extremidade N-terminal de Dys1 na interação com eIF5A

Durante a análise dos clones positivos do rastreamento de duplo-híbrido, foi observado que os dez clones isolados possuindo o gene *DYS1* exibiam padrões diferentes de crescimento celular em meio SC -Leu/Trp/His (resultados não mostrados). A análise da sequência de nucleotídeos obtida com o sequenciamento do cDNA de cada um dos clones revelou diversas deleções na extremidade 5' do gene *DYS1*. Tais deleções resultaram na produção de quatro formas truncadas da proteína Dys1, as quais iniciam nos seguintes resíduos de aminoácido: ácido aspártico 3 (D3), prolina 9 (P9), leucina 12 (L12) e lisina 29 (K29).

Interessantemente, a proteína codificada a partir da deleção dos 84 nucleotídeos iniciais (K29, pSV557) revelou a interação mais forte com eIF5A, enquanto que a deleção de 24 nucleotídeos (P9, pSV559) e a presença do gene *DYS1* inteiro (M1, pSV558) resultaram no enfraquecimento da interação com eIF5A (Figura 10, painel A). Uma vez que a proteína de levedura compartilha 79% de similaridade com a proteína humana, a estrutura tridimensional do monômero da proteína humana Dys1 foi utilizada na tentativa de localizar cada uma das deleções. Como mostrado no painel B da Figura 10, a diferença entre as proteínas truncadas K29 e P9 reside na α -hélice situada na extremidade N-terminal, sugerindo que esta estrutura secundária pode estar impedindo a ligação de eIF5A a Dys1 selvagem, uma vez que os clones M1 e P9 apresentam crescimento reduzido em meio SC -Leu/Trp/His (painel A, Figura 10). Uma vez que o mapeamento da região de eIF5A responsável pela ligação com a proteína Dys1 foi realizado com o clone K29, essa análise foi novamente realizada utilizando-se o clone M1, o qual codifica a proteína Dys1 inteira. Como pode ser observado no painel C da Figura 10, a interação de Dys1 com o domínio C-terminal de eIF5A (Δ 1-90) não é afetada pela presença da α -hélice. Entretanto, a interação de Dys1 com o domínio N-terminal de eIF5A (Δ 90-152) é completamente abolida na presença da α -hélice. Como os resultados apresentados com a proteína Dys1(K29) revelaram a capacidade da enzima interagir com ambos os domínios de seu substrato protéico (painel C, Figura 9), a perda da interação observada com o domínio N-terminal, mas não com o C-terminal, quando a proteína Dys1 inteira é utilizada (painel C, Figura 10) demonstra que cada domínio de eIF5A tem um sítio de ligação independente na enzima.

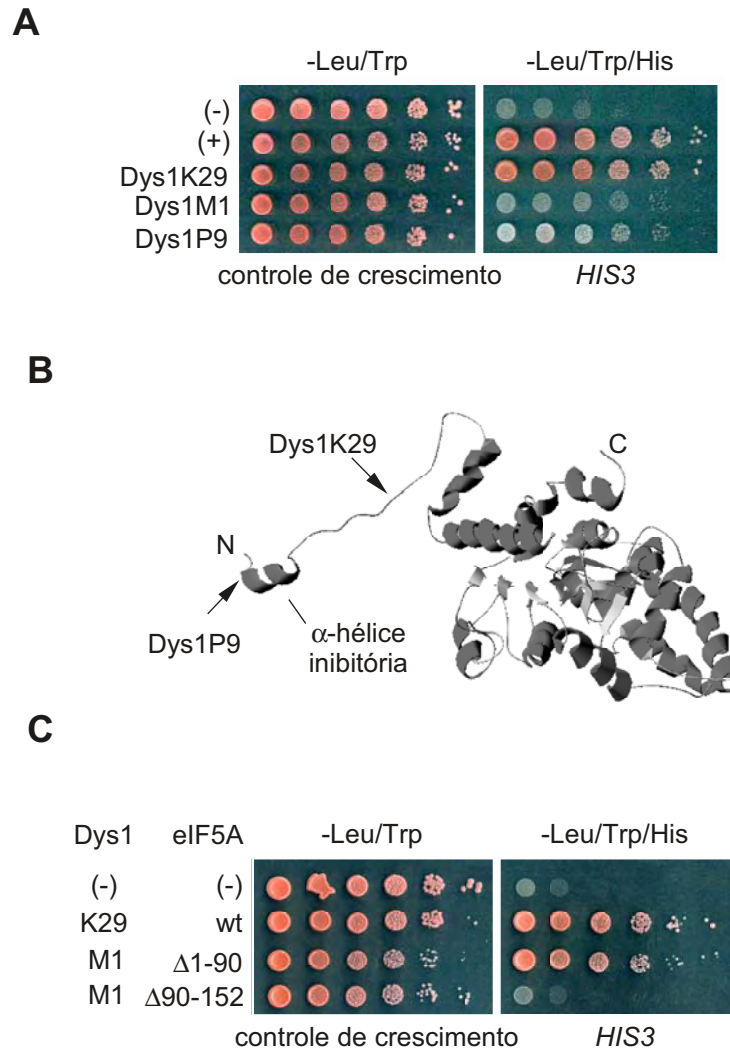


Figura 10- Efeito inibitório da α -hélice localizada na extremidade N-terminal de Dys1 na interação com eIF5A. **A:** Avaliação da expressão do gene repórter do duplo-híbrido *HIS3* como indicativo da interação entre as formas truncadas de Dys1 e eIF5A. **B:** Estrutura tridimensional do monômero da proteína humana Dys1 (Liao *et al.*, 1998). A localização dos aminoácidos iniciais de cada forma truncada de Dys1 está indicada por setas. **C:** Mapeamento da região de eIF5A que se liga à proteína selvagem Dys1(M1) por duplo-híbrido. A linhagem L40 contendo pBTM116-*NIP7* + pACT-*NOP8* (+) (Zanchin e Goldfarb, 1999) ou pBTM116-*TIF51A* + pACT (-) foi utilizada como controle.

4.6- Análise de interações genéticas entre *TIF51A* e *LIA1*

Com o intuito de avançar na caracterização funcional da interação física entre eIF5A e Lia1, foi realizada a análise de interações entre os genes codificadores destas proteínas. Para isto, o nocauteamento do gene *LIA1* foi realizado segundo a estratégia de recombinação homóloga descrita no item 3.2.20. Como pode ser visto no painel A da Figura 11, as linhagens supostamente nocauteadas para cada tipo de acasalamento crescem indistinguíveis das linhagens contendo o gene *LIA1* selvagem tanto a 25°C quanto a 36°C. A confirmação da obtenção do nocaute de *LIA1* foi realizada por western blot e PCR. O painel B da Figura 11 apresenta o ensaio de western blot, revelado com soro policlonal anti-Lia1. Como pode ser observado nas canaletas 2 e 4, a proteína Lia1 não está sendo produzida no mutante nulo selecionado para cada um dos tipos de acasalamento (SVL407 e SVL408, respectivamente), o que indica a correta inserção do fragmento de PCR gerado acima. As canaletas 1 e 3 contêm lisados das leveduras selvagens haplóides para cada tipo de acasalamento (SVL56 e SVL78).

Ainda, a análise do nocauteamento foi realizada por PCR utilizando DNA genômico das leveduras nocauteadas (SVL407 e SVL408), as quais não produzem a proteína Lia1. Amostra de DNA purificado a partir da célula haplóide selvagem SVL56 foi utilizada como controle. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8% e os resultados estão mostrados no painel C da Figura 11. Na reação de PCR foram utilizados os oligonucleotídeos SVO159 e SVO19. Esses oligonucleotídeos reconhecem, respectivamente, uma sequência localizada em uma das regiões flanqueadoras do gene *LIA1* e uma sequência interna do gene *HIS3* (Figura 11, painel D). Neste caso, o tamanho esperado para o produto amplificado é de aproximadamente 1,4kb e pode ser observado somente nas canaletas 2 e 3, referentes às linhagens nocauteadas. A mesma combinação de oligonucleotídeos foi utilizada em uma reação empregando DNA genômico da levedura selvagem SVL56 (controle negativo). Assim, como pode se notar na canaleta 1, nenhum fragmento foi gerado. A canaleta 4 contém o padrão de tamanho molecular 1kb ladder (Invitrogen). Desta forma, todos esses resultados confirmam o nocauteamento correto do gene *LIA1* e mostram que o gene *LIA1* não é essencial, confirmando os resultados disponíveis no banco de dados do genoma de *S. cerevisiae*.

Como a interação física entre as proteínas eIF5A e Lia1 foi identificada por duplo-híbrido e confirmada por ensaios de copurificação, decidiu-se verificar a existência de interações genéticas entre *TIF51A* e *LIA1* através de análises de supressão fenotípica e de letalidade sintética. Para isto, três mutantes condicionais de *S. cerevisiae* para o gene *TIF51A*, *tif51A-1* (SVL14), *tif51A-2* (SVL26) e *tif51A-3* (SVL32), foram utilizados (Valentini *et al.*, 2002). Os alelos *tif51A-1* e *tif51A-3* exibem, na temperatura não-permissiva, defeitos de crescimento mais pronunciados quando comparados ao alelo *tif51A-2*.

O painel A da Figura 12 apresenta a dissecação das tétrades obtidas do cruzamento entre a linhagem nocauteada *lia1Δ::HIS3* (SVL408) e os mutantes *tif51A-1*, *tif51A-2* e *tif51A-3*, respectivamente. Como pode ser observado, todas as tétrades dissecadas permitiram a obtenção de quatro células haplóides viáveis. Com base nesses resultados, pode-se concluir que o gene *LIA1* não é sinteticamente letal com *TIF51A*.

A análise da supressão do fenótipo temperatura-sensível dos mutantes condicionais de *TIF51A* foi realizada na presença do gene *LIA1* em alto número de cópias (pSV355). No painel B da Figura 12 verifica-se o crescimento dos mutantes *tif51A-1*, *tif51A-2* e *tif51A-3* contendo os plasmídeos *URA3/2μ* (pSV65), utilizado como controle negativo; *TIF51A/URA3/2μ* (pSV107), utilizado como controle positivo; e *LIA1/URA3/2μ* (pSV355) em meio seletivo (SC-Ura) nas temperaturas permissiva (25°C) e não permissiva (36°C) de crescimento. Como pode ser observado, *LIA1* em alto número de cópias não suprime o fenótipo temperatura-sensível dos mutantes *tif51A*.

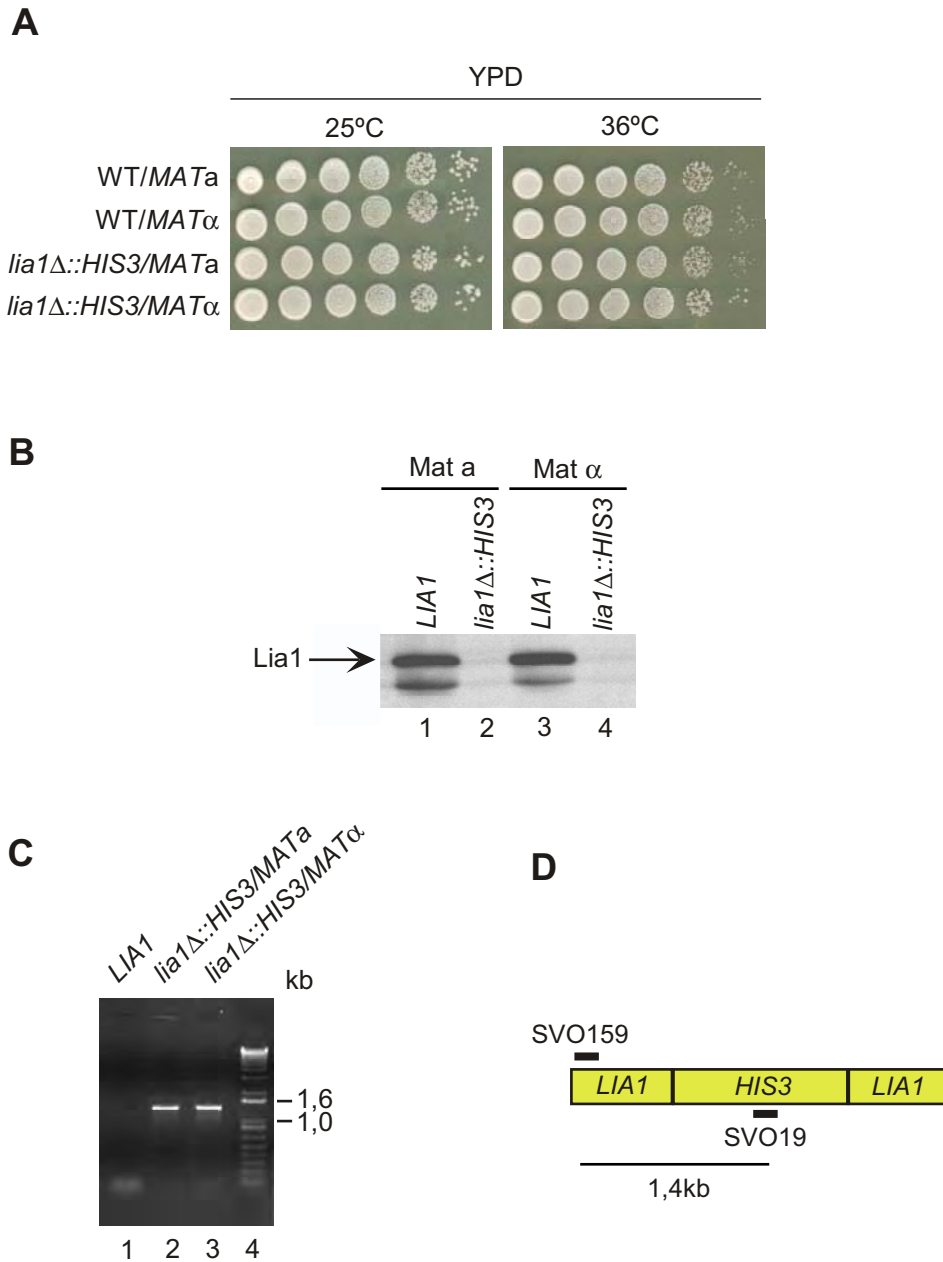


Figura 11- Nocauteamento do gene *LIA1* em *S. cerevisiae*. **A:** Diluições seriadas das linhagens contendo *LIA1* selvagem ou nocauteado foram cultivadas em meio YPD a 25°C e 36°C. **B:** Ensaio de western blot, revelado com soro policlonal anti-Lia1, utilizando lisados obtidos de haplóides selvagens (SVL56 e SVL78) e nocauteados (SVL407 e SVL408) de cada um dos tipos de acasalamento. **C:** Confirmação do nocauteamento por PCR utilizando DNA genômico obtido dos haplóides nocauteados, de ambos os tipos de acasalamento, como também de um haplóide selvagem. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8%. **D:** Esquema simplificado da estratégia utilizada para confirmação do nocauteamento por PCR.

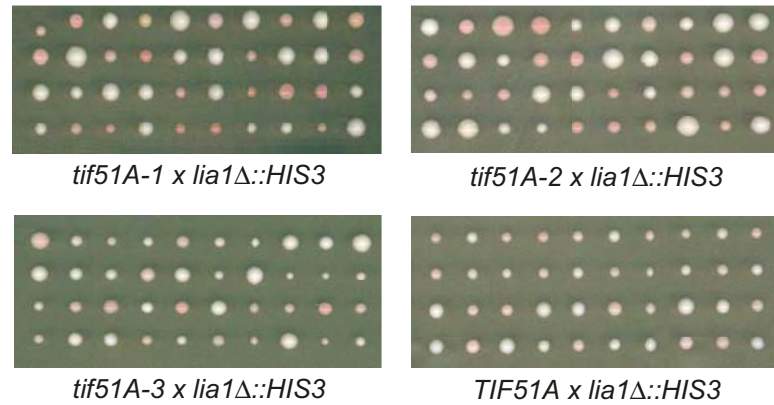
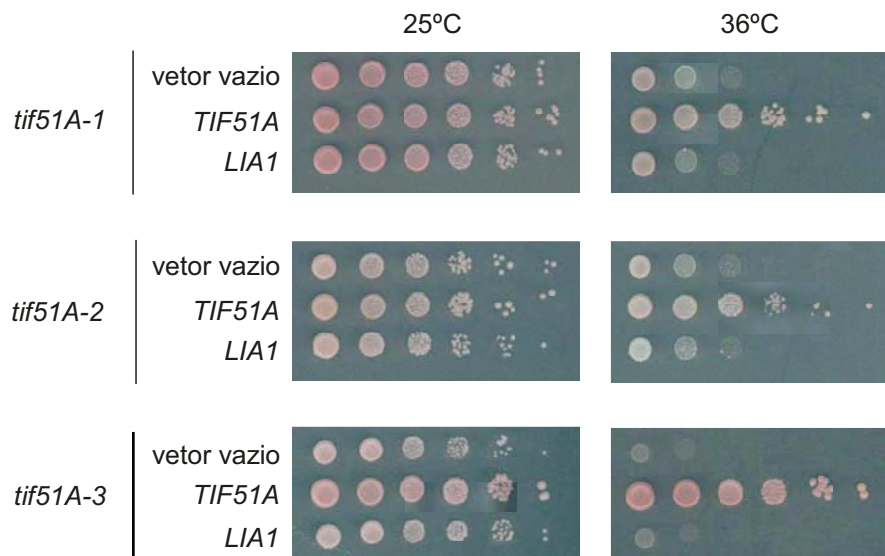
A**B**

Figura 12- Análise de interação genética entre *TIF51A* e *LIA1*. **A:** Análise de letalidade sintética. Tétrades dos diplóides gerados nos cruzamentos entre *lia1Δ::HIS3* e *tif51A-1*, *tif51A-2*, *tif51A-3* ou *TIF51A*. **B:** Análise de supressão do fenótipo temperatura-sensível dos mutantes condicionais de *TIF51A* na presença do gene *LIA1* em alto número de cópias. As linhagens *tif51A-1*, *tif51A-2* e *tif51A-3* contendo o gene *TIF51A* em vetor 2 μ /URA3 (controle positivo), o vetor 2 /URA3 (controle negativo) e o gene *LIA1* em vetor 2 μ /URA3 foram cultivadas em meio SC-Ura nas temperaturas permissiva (25°C) e não permissiva (36°C) de crescimento dos mutantes.

4.7- Localização subcelular de Lia1

4.7.1- Localização subcelular por imunofluorescência indireta

Os resultados da localização subcelular de Lia1 utilizando o anticorpo policlonal anti-Lia1 podem ser visualizados no painel A da Figura 13. A coluna da esquerda refere-se à microscopia de fluorescência. Neste caso, pode ser verificado um sinal de alta intensidade evidenciando o compartimento citoplasmático. Observa-se ainda que não há exclusão nuclear, apenas vacuolar. A coluna do meio mostra a localização do núcleo após coloração com DAPI. A coluna da direita, por sua vez, mostra a preservação das células utilizadas através da microscopia de Nomarski (DIC-Differential Interference Contrast).

4.7.2- Localização subcelular de GFP-Lia1

Com a finalidade de confirmar os resultados de localização obtidos por imunofluorescência indireta, *LIA1* foi clonado em fusão com o gene da proteína fluorescente GFP (Green Fluorescent Protein), gerando a construção pSV466. Após a confirmação da expressão do gene da proteína de fusão GFP-Lia1 (dados não mostrados), a proteína de fusão GFP-Lia1 foi visualizada em microscópio de fluorescência. No painel B da Figura 13, pode ser observado um sinal fluorescente intenso no citoplasma (painéis à esquerda), como o sinal obtido na imunofluorescência indireta (painel A). Enquanto que os painéis do meio mostram a localização nuclear com DAPI, nos painéis da direita as células estão mostradas por microscopia de Nomarski. Os resultados obtidos pela produção de GFP-Lia1 em células vivas confirmam o padrão citoplasmático observado no ensaio de imunofluorescência indireta. Ainda, esta localização está de acordo com a interação física revelada entre Lia1 e a proteína eIF5A e com a localização subcelular de eIF5A em levedura (Valentini *et al.*, 2002). Em um estudo recente, no qual foi realizada uma análise em larga escala da localização de 75% das proteínas de levedura, a mesma localização subcelular foi descrita para a proteína Lia1 (Huh *et al.*, 2003). No entanto, não se pode descartar a localização nuclear, mas outros experimentos seriam necessários para confirmar que Lia1 também está presente no núcleo.

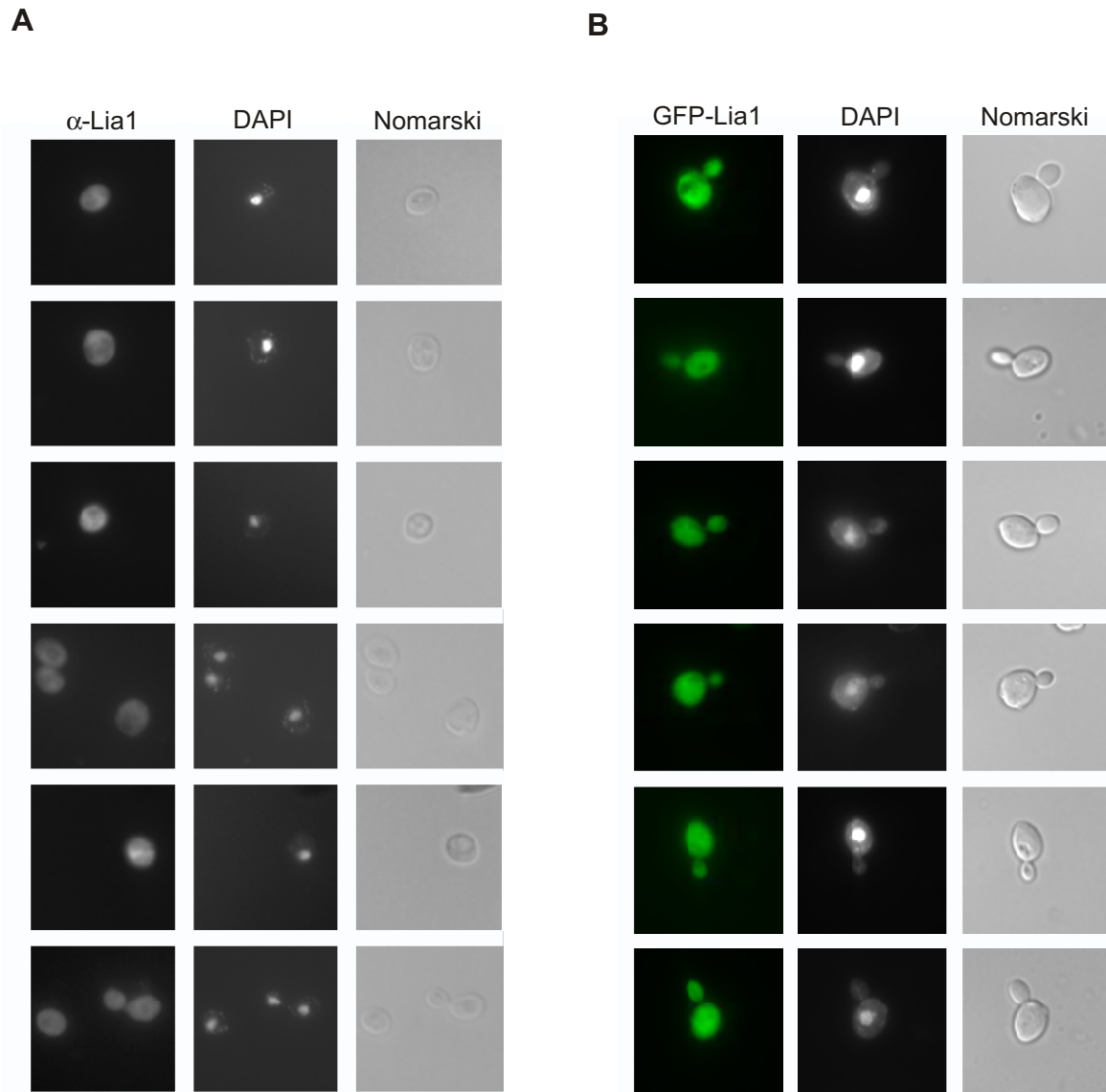


Figura 13- Localização subcelular de Lia1. **A:** Imunofluorescência indireta. A coluna da esquerda apresenta o resultado da fluorescência obtido utilizando o anticorpo policlonal anti-Lia1. A coluna do meio apresenta a marcação nuclear por DAPI. Na coluna da direita as células foram visualizadas por microscopia de Nomarski. **B:** Localização de GFP-Lia1. Os painéis da esquerda apresenta a microscopia de fluorescência da proteína de fusão GFP-Lia1. Nos painéis do meio está evidenciado o compartimento nuclear através da utilização do marcador DAPI. Por sua vez, nos painéis da direita, as leveduras podem ser visualizadas por microscopia de Nomarski.

4.8- Análise estrutural e funcional da proteína Lia1

Apesar do rastreamento por duplo-híbrido ter revelado a proteína Lia1, este dado não contribuiu para a elucidação da função de eIF5A, uma vez que a função de Lia1 era naquele momento desconhecida. Recentemente, foi demonstrado que o gene *LIA1* e seu homólogo em humanos *HLRC1* codificam a enzima responsável pela etapa final do processo de hipusinação, desoxihipusina hidroxilase (Park *et al.*, 2006). Desta forma, ao contrário da desoxihipusina sintase, a desoxihipusina hidroxilase ainda não é uma proteína bem caracterizada em todos os aspectos. Os dados disponíveis na literatura envolvendo esta enzima foram gerados a partir de experimentos empregando a proteína parcialmente purificada (Abbruzzese *et al.*, 1986).

Lia1 é uma proteína de 325 aminoácidos, com ponto isoelétrico teórico 4,61 e massa molecular calculada de 36kDa. Assim como para a proteína humana DOHH, estudos de predição de estrutura secundária revelaram que Lia1 pertence à família das proteínas que possuem repetições conhecidas como “HEAT-like repeats”. Apesar de relacionada às “HEAT repeats”, o par de α -hélices nessa família é caracterizado por apresentar uma sequência de aminoácidos mais curta. Normalmente, as “HEAT repeats” repetem-se várias vezes e consecutivamente, apresentando-se, desta forma, distribuídas por toda proteína. Esta distribuição talvez explique a falta de qualquer outro domínio significativo na proteína Lia1.

Uma vez que Lia1 não é uma proteína bem caracterizada, a determinação da estrutura terciária desta hidroxilase pode auxiliar não somente na determinação dos elementos estruturais críticos para a catálise enzimática e ligação do substrato, mas também ser de fundamental importância para revelar a conformação que as “HEAT-like repeats” adquirem, procurando confirmar se são “HEAT repeats” verdadeiras. Interessantemente, estas estruturas secundárias não ocorrem em outras hidroxilases, sugerindo ser uma característica única da hidroxilase de eIF5A.

4.8.1- Ensaios de cristalização utilizando a proteína Lia1

Para iniciar os ensaios de cristalização de Lia1, optou-se por produzir a proteína recombinante em fusão com cauda de histidinas. Para tanto, a região codificadora do gene *LIA1* foi clonada no vetor de expressão pET14b, para a

produção de His-Lia1, gerando a construção plasmidial pSV502. Células de *E. coli* BL21 competentes foram submetidas à indução da expressão com IPTG (0,1mM). Alíquotas da cultura foram retiradas antes e após 1, 2 e 3 horas de indução a 30°C por 3 horas. O painel A da Figura 14 mostra o resultado de SDS-PAGE após coloração com Coomassie para a visualização das proteínas. As canaletas 1 a 4 apresentam, respectivamente, os lisados obtidos da cultura antes e após 1, 2 e 3 horas de indução com IPTG. Nesta figura é possível observar um aumento significativo da banda correspondente à proteína de fusão de interesse. A canaleta 5 apresenta o padrão de tamanho molecular 10kDa (Invitrogen). O período de indução de 3 horas foi considerado suficiente para a expressão de His-Lia1. Após confirmação da solubilidade da proteína de fusão (painel B, Figura 14), a purificação foi realizada através de cromatografia de afinidade em coluna Ni-NTA. As frações coletadas foram analisadas por eletroforese (SDS-PAGE 12%) e coradas com Coomassie. No painel C da Figura 14 estão apresentadas as amostras obtidas nas diferentes etapas do processo de purificação da proteína His-Lia1. Nas canaletas 4 e 5 é possível visualizar a purificação da proteína de interesse His-Lia1, após a eluição com imidazol. As outras alíquotas analisadas correspondem à fração não ligada (canaleta 1), à etapa de lavagem da resina (canaletas 2 e 3) e ao extrato celular (canaleta 7). A canaleta 6 contém o padrão de tamanho molecular 10kDa (Invitrogen). Posteriormente, foi realizada a digestão da proteína de fusão com trombina para liberação da cauda de histidinas. O painel D da Figura 14 mostra os resultados obtidos em cada hora durante as 4 horas de digestão com trombina. Em todas as canaletas observa-se a formação de uma banda adicional. A análise por western blot utilizando anticorpo anti-Lia1 mostrou que ambas as bandas eram Lia1 (dados não apresentados). Entretanto, a tentativa de eliminar uma das bandas utilizando coluna de afinidade NiNTA ou coluna de troca iônica não foi bem sucedida. Desta forma, optou-se por partir para os ensaios de cristalização com a proteína Lia1 contendo a cauda de histidinas.

Na tentativa de encontrar uma condição de cristalização, a proteína purificada His-Lia1 foi utilizada no rastreamento de cristalização utilizando “kits” fatoriais da Hampton Research (Crystal Screen I e II), Jena Bioscience (1 a 10) e Wizard (I e II) a 18°C. Após 15 dias foi observada a formação de esferolitos em uma única condição: WIZARD I (48) - 20% PEG1000; 0,1M Acetato pH 4,5; 0,2M Zn(OAc)₂. Foi então realizado o refinamento dessas condições, com variações nos seus

constituintes, na tentativa de determinar a condição ideal de cristalização da proteína. Utilizando uma solução a 30mg/mL da proteína purificada, concentração utilizada no rastreamento inicial, foram feitos testes de cristalização a 18°C nas seguintes combinações de condições:

- PEG1000(10-25%) X pH (4,0-6,5) com 0,2M ZnCl_2 – 24 condições
- PEG1000(10-25%) X pH (4,0-6,5) – 24 condições

No entanto, o refinamento não contribuiu para a obtenção de cristais de Lia1. Diante da inexistência de outras condições que pudessem ser refinadas, optou-se por realizar um novo rastreamento utilizando, para tanto, a proteína Lia1 sem “tags”. Como mostrado anteriormente, a digestão com trombina para a remoção da cauda de histidinas gera uma banda adicional, que não é possível ser eliminada por cromatografia de afinidade ou troca iônica. Sendo assim, optou-se por obter a proteína Lia1 livre de “tags” a partir da proteína de fusão com GST. A construção plasmidil pGEX-4T-1-*LIA1* (pSV356) já estava disponível e as condições ideais para a purificação da proteína de fusão GST-Lia1 já estavam determinadas, uma vez que esta proteína de fusão foi utilizada na produção do anticorpo policlonal anti-Lia1. Desta forma, após cromatografia de afinidade em coluna de glutationa-sepharose para a purificação de GST-Lia1 foi realizada a digestão da proteína de fusão com trombina para liberação de GST. As condições de clivagem foram analisadas por SDS-PAGE e o gel corado por Coomassie. O painel E da Figura 14 mostra os resultados obtidos em cada hora durante 4 horas de digestão. Como pode ser observado a proteína de fusão foi totalmente digerida com apenas uma hora de incubação com trombina (canaleta 3), liberando GST (27kDa) e Lia1 (36kDa) que estão identificadas por setas. A canaleta 1 contém o padrão de massa molecular 10KDa (Invitrogen). Da mesma forma que para His-Lia1, a mesma banda adicional pode ser visualizada. Finalmente, o produto de digestão foi submetido a uma nova cromatografia de afinidade para a remoção de GST. O painel F da Figura 14 mostra os resultados da obtenção da proteína Lia1 pura. A canaleta 1 contém alíquota da amostra injetada na coluna após a digestão com trombina, enquanto que a canaleta 2, por sua vez, apresenta a proteína Lia1 na fração não-ligada à coluna. Na canaleta 4 é possível observar a proteína GST eluída da coluna de afinidade. As canaletas 3

e 5 apresentam, respectivamente, amostra referente a etapa de lavagem e o padrão de massa molecular 10kDa (Invitrogen).

Uma vez determinada a metodologia de purificação, Lia1 foi produzida e purificada em larga escala. Na tentativa de encontrar uma condição de cristalização, a proteína purificada, na concentração de 10mg/mL, foi utilizada no rastreamento de cristalização utilizando “kits” fatoriais da Hampton Research (Crystal Screen I e II; PEG/Ion), Jena Bioscience (1 a 10) e Wizard (1 e 2) a 18°C. Em contraste com o rastreamento utilizando a proteína de fusão His-Lia1, foi observada a formação de esferolitos em uma série de condições. Foi então realizado o refinamento dessas condições, com variações nos seus constituintes, na tentativa de determinar a condição ideal de cristalização da proteína. Ainda, os testes de cristalização foram realizados em duplicatas para incubação a 4°C e 18°C. Novamente, na maioria das condições foi observada a formação de esferolitos. Com a incubação das placas contendo as diferentes condições refinadas a 18°C, a formação de poucos esferolitos foi observada. Em contraste, a 4°C, os esferolitos apresentavam-se menores, porém mais numerosos. No entanto, apesar de todas as possíveis tentativas de refinamento, não foi possível determinar as condições de cristalização da proteína Lia1.

Os ensaios de cristalização foram realizados no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – LNLS, Campinas, em colaboração com o Dr. Francisco Javier Medrano.

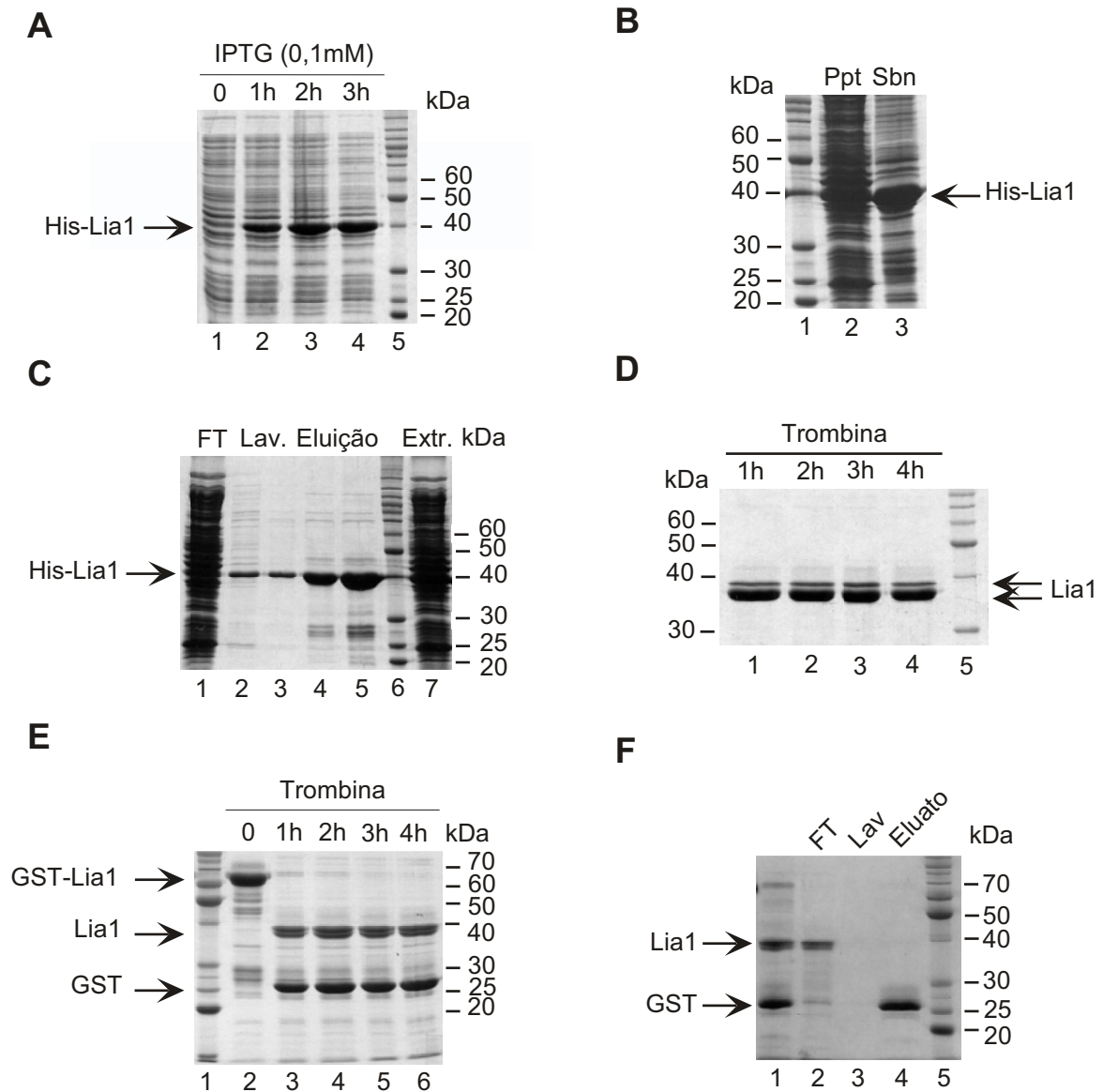


Figura 14- Produção e purificação de Lia1. **A:** Indução da produção da proteína His-Lia1. Aliquotas da cultura antes (1) e após indução com IPTG (2 a 4). **B:** Teste de solubidade da proteína His-Lia1. Amostras do precipitado e do sobrenadante, respectivamente (2 e 3). **C:** Purificação de His-Lia1. Análise das frações coletadas durante a etapa de purificação de His-Lia1 por cromatografia de afinidade: FT=Flowthrough (1); amostras referentes à lavagem da coluna (2 e 3); amostras coletadas durante a eluição (4 e 5) e extrato celular (7). **D:** Análise da digestão de His-Lia1 com trombina para obtenção de Lia1. Aliquotas da digestão realizada durante 1, 2, 3 e 4 horas, respectivamente (1 a 4). **E:** Análise da digestão de GST-Lia1 com trombina para obtenção de Lia1. Aliquotas da digestão realizada por 1, 2, 3 ou 4 horas, respectivamente (3 a 6) e amostra da proteína GST-Lia1 antes da digestão (2). **F:** Purificação da proteína Lia1 após digestão com trombina. FT= Flowthrough (2) contém amostra não ligada à coluna e, conseqüentemente, a proteína Lia1 purificada. Amostra obtida na etapa de lavagem da coluna (3); amostra coletada durante a eluição com glutationa (4) e alíquota da amostra injetada na coluna após a digestão com trombina (1). As setas indicam as proteínas Lia1 (36kDa), His-Lia1 (40kDa), GST (27kDa) e GST-Lia1 (63kDa).

4.8.2- Lia1 é uma metaloenzima constituída por ferro

Baseado nos dados obtidos com a proteína humana (Kim *et al.*, 2006), a proteína recombinante de levedura Lia1, purificada por afinidade à resina de glutationa-sepharose a partir de extratos de *E. coli*, foi submetida à cromatografia de exclusão molecular com a finalidade de avaliar a sua pureza. O perfil da eluição da proteína Lia1 obtido na cromatografia por gel filtração em coluna Superdex 200 está apresentado no painel A da Figura 15 e revelou um pequeno ombro correspondente às primeiras quatro frações eluídas da coluna, em adição a um pico correspondente às últimas cinco frações.

A análise das frações coletadas foi realizada por SDS-PAGE e por eletroforese em condições não-desnaturantes e está apresentada nos painéis B e C da Figura 15, respectivamente. Como pode ser observado no SDS-PAGE (painel B), a proteína Lia1 foi eluída em todas as frações correspondentes ao pico gerado, e apresentou uma banda predominante de aproximadamente 36kDa, tamanho esperado para a proteína em estudo. No entanto, quando as mesmas amostras foram avaliadas por eletroforese não-desnaturante (painel C), duas bandas distintas foram claramente visualizadas, uma banda difusa de migração mais lenta (seta pontilhada) presente em praticamente todas as frações, e uma banda resolvida de migração mais rápida (seta sólida), presente somente nas últimas cinco frações (frações 32 a 36). Desta forma, os dados obtidos em gel nativo revelaram a heterogeneidade da amostra contendo a proteína selvagem Lia1. De acordo com o padrão exibido na eletroforese nativa, as frações obtidas na cromatografia por gel filtração foram agrupadas em diferentes pools: Grupo 1, frações 28 a 31, apresentando principalmente a banda difusa; grupo 2, frações 32 e 33, com uma mistura das duas bandas observadas; e grupo 3, frações 34 a 36, composto basicamente pela banda de migração mais rápida.

Com a finalidade de caracterizar a enzima recombinante, análise da atividade hidroxilásica foi realizada utilizando, para tanto, os três grupos de frações obtidas (painel D). Enquanto que a atividade enzimática apresentada pelo grupo 1 foi drasticamente reduzida, hidroxilação do intermediário eIF5A marcado radioativamente, eIF5A-Dhp, pelo grupo 2 ocorreu moderadamente (35% de conversão de desoxihipusina a hipusina). Por outro lado, a enzima purificada

presente no grupo 3 catalisou eficientemente a conversão de eIF5A-Dhp para sua forma madura eIF5A-Hpu (70% de eficiência na atividade enzimática).

Na tentativa de compreender o que pode estar causando os diferentes comportamentos da proteína de levedura frente à eletroforese em condições não-desnaturantes e ao ensaio de hidroxilação, as mesmas amostras foram encaminhadas para a análise do conteúdo de metal. Ferro, entre nove metais analisados (cádmio, cobalto, cromo, cobre, ferro, magnésio, níquel e zinco) foi o único metal associado com Lia1 nas amostras. Para avaliar a proporção de ferro presente em cada molécula de Lia1, a relação entre as concentrações de ferro obtidas pela espectrometria de massas e a concentração de proteína em cada amostra foi utilizada. Os resultados estão apresentados no painel E da Figura 15. As medidas obtidas para os grupos 1 e 2 revelaram os conteúdos de 0,1 e 0,3 mol de ferro por mol de enzima, respectivamente, enquanto que o grupo 3 apresentou alto conteúdo de ferro (1,2 mol/mol). Diante desses dados, a natureza essencial do ferro para a atividade desempenhada por Lia1 tornou-se evidente uma vez que a perda do metal de seus sítios de coordenação resultou na inativação da enzima Lia1 (comparar os dados obtidos para os grupos 1 e 2 com os do grupo 3).

Em conjunto, os dados revelam que a banda de migração mais rápida na eletroforese em gel não desnaturante representa a forma da enzima ligada ao metal (holoenzima), enquanto que a banda difusa de migração lenta corresponde à forma livre do metal, a apoenzima. A identificação de uma mistura de ambas as formas apo e holo em uma mesma amostra pode indicar que a enzima recombinante sofre dissociação gradual do metal a partir de seus sítios de coordenação ou ainda não é capaz de obter na sua estrutura o conteúdo total de ferro. Interessantemente, a gel filtração foi capaz de separar a apoenzima da holoenzima, sendo a forma apo eluída primeiro da coluna cromatográfica. Este dado é condizente com a migração mais lenta em gel nativo, provavelmente devido a um raio hidrodinâmico maior na forma apo da enzima. Além disso, os dados demonstram que a proteína recombinante de levedura está se comportando da mesma forma que a proteína humana DOHH (Kim *et al.*, 2006), o que já era esperado uma vez que estas proteínas compartilham um alto grau de identidade. Adicionalmente, as formas apo e holo das duas enzimas Lia1, de levedura, e DOHH, de humanos, foram utilizadas em novos ensaios de cristalização. Novamente rastreamentos exaustivos foram realizados, porém a condição ideal de cristalização da hidroxilase de eIF5A não foi encontrada.

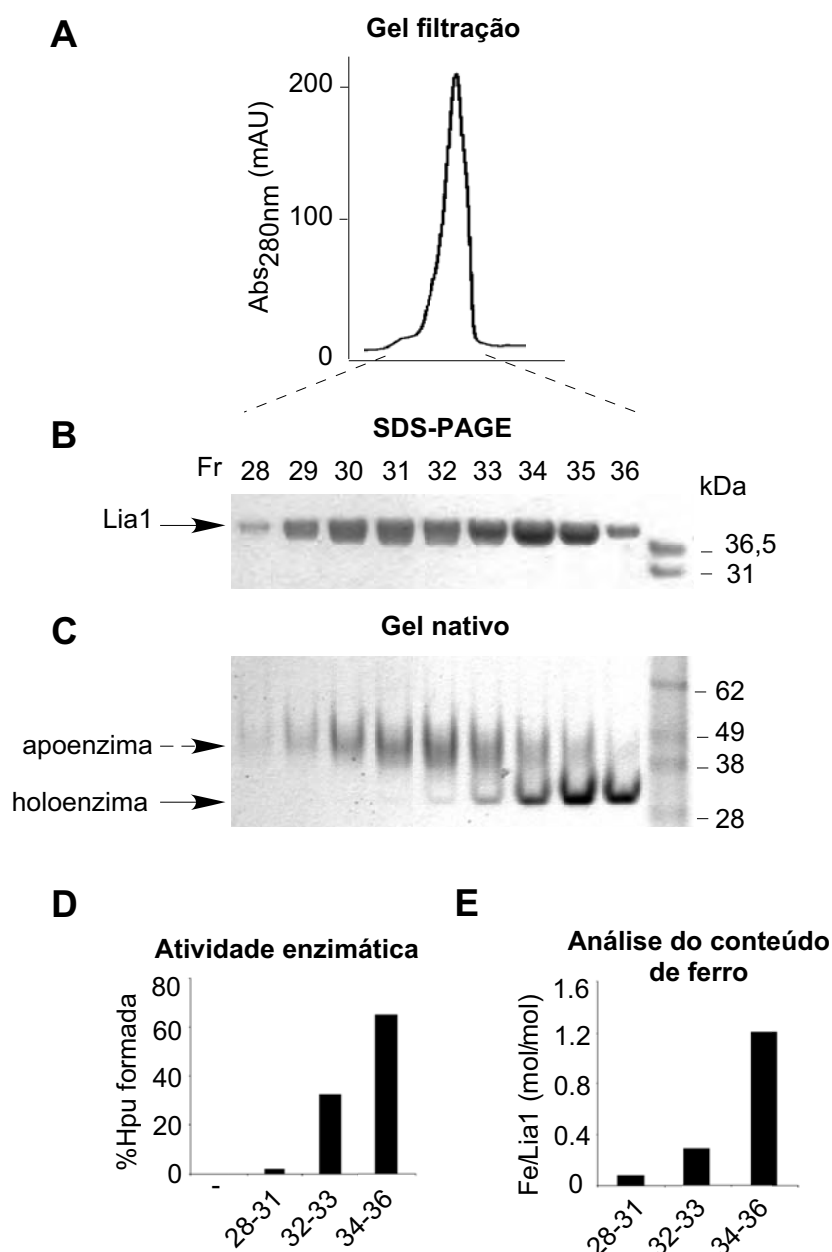


Figura 15- Análise da purificação da proteína Lia1 recombinante selvagem por gel filtração. **A:** Gráfico gerado com a eluição da proteína Lia1 (leitura 280nm) na cromatografia por exclusão molecular em resina Superdex 200. **B:** Todas as frações correspondentes ao pico gerado no passo cromatográfico foram avaliadas por SDS-PAGE. **C:** Eletroforese em condições não-desnaturantes. A proteína Lia1 selvagem foi resolvida como duas espécies: uma banda compacta de migração rápida (seta contínua) e uma segunda banda mais difusa de migração lenta (seta pontilhada). **D:** Monitoramento da atividade hidroxilásica in vitro. As frações purificadas foram agrupadas em três diferentes grupos: grupo 1 (28-31), grupo 2 (32-33) e grupo 3 (34-36). Cada grupo foi submetido à uma reação in vitro contendo o substrato radioativo eIF5A-Dhp. **E:** Análise do conteúdo de ferro de cada grupo de frações. mAU, unidades de miliabsorbância; Hpu, hipusina; Fr, frações.

4.8.3- Identificação de resíduos de aminoácidos de Lia1 requeridos para a atividade hidroxilásica, coordenação do metal e formação do complexo enzima-substrato

Através do rastreamento de uma biblioteca de expressão de *S. cerevisiae* para a atividade hidroxilásica, o gene *LIA1* foi identificado como o gene codificador da segunda enzima modificadora de eIF5A, a desoxihipusina hidroxilase (Park *et al.*, 2006). Isto levou à clonagem do gene humano *HLRC1*, codificador da proteína humana DOHH. Ao longo da sequência primária dos produtos codificados pelos genes *LIA1* e DOHH, quatro pares dos aminoácidos histidina e glutamato apresentam-se altamente conservados (Figura 16). Desta forma, com o intuito de avaliar a contribuição das repetições dos pares HE (histidina e glutamato), assim como de outros aminoácidos conservados, para a formação do sítio de coordenação do metal e para a catálise enzimática em Lia1, 10 mutantes foram gerados através da técnica de mutagenese sítio-dirigida a partir da construção plasmidial pGEX-4T-1 (pSV356): H79A, E80A, H112A, E113A, E116A/D, H237A, E238A, H270A e E271A. Os sítios alvo da mutagenese, bem como a posição do aminoácido na proteína Lia1, estão apontados por setas no diagrama apresentado na Figura 16, o qual mostra o alinhamento entre as sequências primárias das proteínas Lia1 e DOHH.

Interessantemente, em contraste com a enzima selvagem (WT), os mutantes com substituições para alanina nos resíduos HE conservados (H79A, E80A, H112A, E113A, H237A, E238A, H270A e E271A) foram desprovidos de atividade, confirmando que este conjunto de aminoácidos exerce um papel importante para a catálise enzimática de Lia1 (painel A, Figura 17). Em contraste com o mutante E116A, o qual foi totalmente inativo, níveis baixos de atividade (3%) foram observados quando o mesmo aminoácido foi substituído por aspartato (painel A, Figura 17).

Como mostrado anteriormente, foi possível determinar que a apoenzima migra difusamente e é a forma inativa da enzima, uma vez que o ferro não está ligado aos seus sítios de coordenação. Em contrapartida, a holoenzima, forma ligada ao metal e, portanto ativa, migra mais rapidamente apresentando-se como uma banda totalmente resolvida. Dentro desse contexto, o padrão de migração dos mutantes em eletroforese não-desnaturante foi avaliado com o intuito de determinar se a ausência de atividade, observada especialmente nos mutantes com

substituições em um dos aminoácidos dos pares HE, correlaciona-se com a dissociação do metal de seus sítios de ligação.

Os resultados da eletroforese em condições não-desnaturantes estão apresentados no painel B da Figura 17. O comportamento dos mutantes de Lia1 frente à eletroforese nativa acabou tornando-se interessante. Como pode ser visto, os mutantes H79A, H112A e E113A, pertencentes ao primeiro e segundo pares HE (Figura 16), apresentam uma banda predominante a qual, apesar de migrar em uma região próxima a da forma apo da proteína selvagem, é bem resolvida. Em contrapartida, o mutante H270A, em adição a banda difusa, apresenta uma banda definida e de migração mais rápida que, por sua vez, assemelha-se à fração holo. H237A e E271A mostram um padrão semelhante ao mutante H270A, porém com predominância da banda difusa. Os dois últimos mutantes dos pares HE, E80A e E238A, por sua vez, possuem uma mistura de ambas as formas apo e holo, sendo que na amostra correspondente ao mutante E238A há um predomínio da holoenzima. Os mutantes E116A/D comportam-se como a proteína selvagem, ou seja, contendo ambas as formas apo e holo da enzima. WT1 corresponde à mistura da apoenzima e holoenzima, enquanto que WT2 consiste apenas da forma apo.

Pelo exposto, esperava-se que a análise do padrão gerado na eletroforese nativa fosse suficiente para caracterizar os mutantes de levedura quanto à presença do metal. No entanto, não é totalmente claro se mutantes inativos, como por exemplo H237A ou H270A, correspondem de fato à forma não ligada ao metal. Sendo assim, na tentativa de compreender o que pode estar causando os diferentes comportamentos da proteína de levedura frente à eletroforese em condições não-desnaturantes, as amostras foram encaminhadas para a análise do conteúdo de ferro. Os resultados estão apresentados no painel C da Figura 17. Dos oito mutantes nos resíduos HE conservados, seis (H79A, H112A, E113A, H237A, H270A e E271A) apresentaram conteúdo de ferro bem reduzido (0,02-0,23mol/mol). Diante das concentrações reduzidas de ferro e da ausência de atividade enzimática, as bandas observadas para esses mutantes na eletroforese nativa tratam-se da forma apo. Desta forma, os seis resíduos mencionados estão envolvidos na coordenação do ferro no sítio ativo da enzima de levedura. E80A e E238A, por sua vez, apresentaram a relação 0,6 e 1,2mol/mol, respectivamente. Esses dados estão de acordo com a maior predominância da banda referente à holoenzima no mutante H238A em relação ao mutante E80A, como pode ser visto no painel B da Figura 17.

No entanto, os altos conteúdos de ferro demonstram que os resíduos E80 e E238 não contribuem para a ligação do ferro à enzima. Ainda, os níveis de ferro nos mutantes E116A/D foram de 0,4mol/mol. A presença do metal nestes mutantes está condizente com o padrão observado na eletroforese em condições nativas.

Por fim, a ligação dos mutantes de Lia1 ao seu substrato protéico eIF5A-Dhp foi avaliada. Optou-se por gerar, através da técnica de mutagênese sítio-dirigida, os mesmos mutantes de Lia1 descritos acima a partir da construção plasmidial pBTM116-*LIA1* (pSV492). Desta forma, o sistema de duplo-híbrido foi utilizado para avaliar a capacidade dos mutantes de Lia1, em fusão com a proteína ligante de DNA LexA, de associarem-se com eIF5A, por sua vez, em fusão com o domínio de ativação de Gal4 (pSV285). Novamente, a expressão dos genes repórteres do duplo-híbrido, *HIS3* e *LacZ*, foram utilizados como indicadores da interação entre as proteínas em estudo. Os dados gerados estão apresentados na Figura 18.

Como pode ser observado, os mutantes H79A, E80A, H112A e H237A interagiram com eIF5A uma vez que induziram a expressão dos genes repórteres *HIS3* e *LacZ*. Em contraste, os mutantes E113A, E238A, H270A, E271A não cresceram em meio desprovido de histidina e foram negativos para o ensaio de β -galactosidase, sugerindo a perda de interação com a proteína eIF5A. Interessantemente, enquanto que a substituição para aspartato no resíduo E116 resultou no enfraquecimento da ligação entre Lia1 e eIF5A, a alteração para alanina impediu por completo a formação do complexo estas proteínas.

Em geral, pode-se concluir que H270 e os resíduos de ácido glutâmico E113, E116, E238 e E271 são importantes para ancorar eIF5A na enzima, enquanto que os resíduos H79, H112, E113, H237, H270 e E271 compreendem o sítio de coordenação do metal.

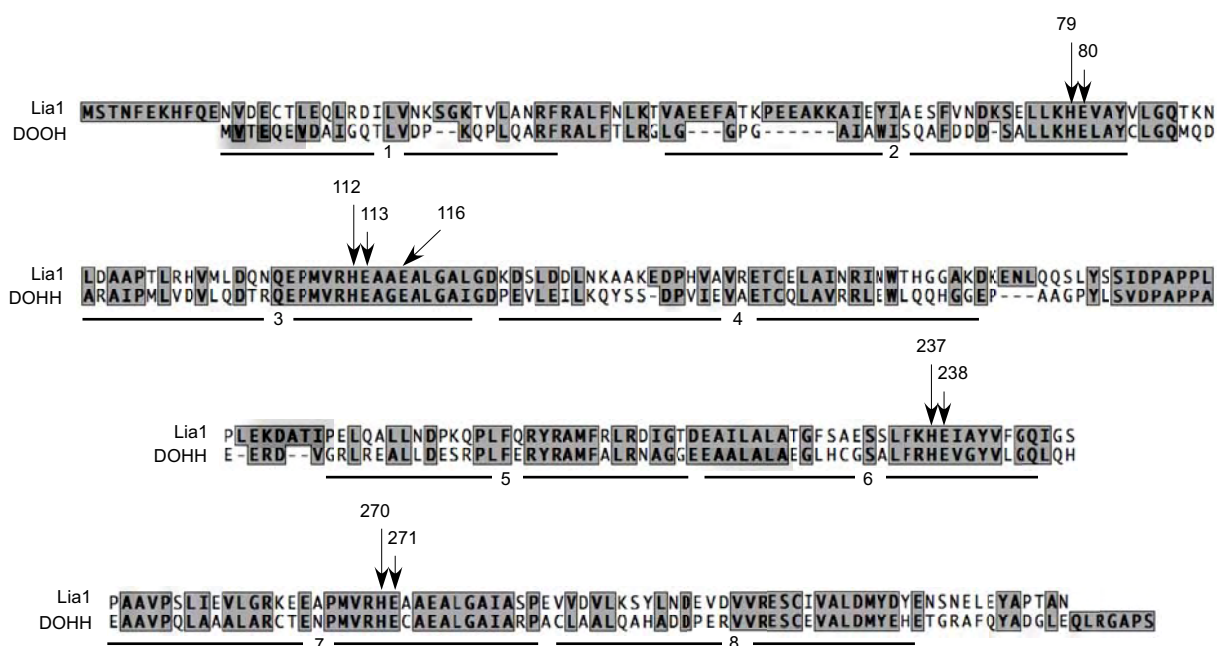


Figura 16- Alinhamento entre as sequências primárias das proteínas Lia1 e DOHH. Os sítios alvo da mutagênese, escolhidos com base no grau de conservação com DOHH e na probabilidade de contribuir para a coordenação do átomo de ferro, estão apontados por setas no diagrama apresentado. A região compreendida por cada uma das oito “HEAT-repeats”, conforme o modelo computacional gerado para a proteína humana DOHH, está delimitada no diagrama (Park *et al.*, 2006). As “HEAT-repeats” 1-4 e 5-8 compreendem o primeiro e o segundo domínios da díade simétrica.

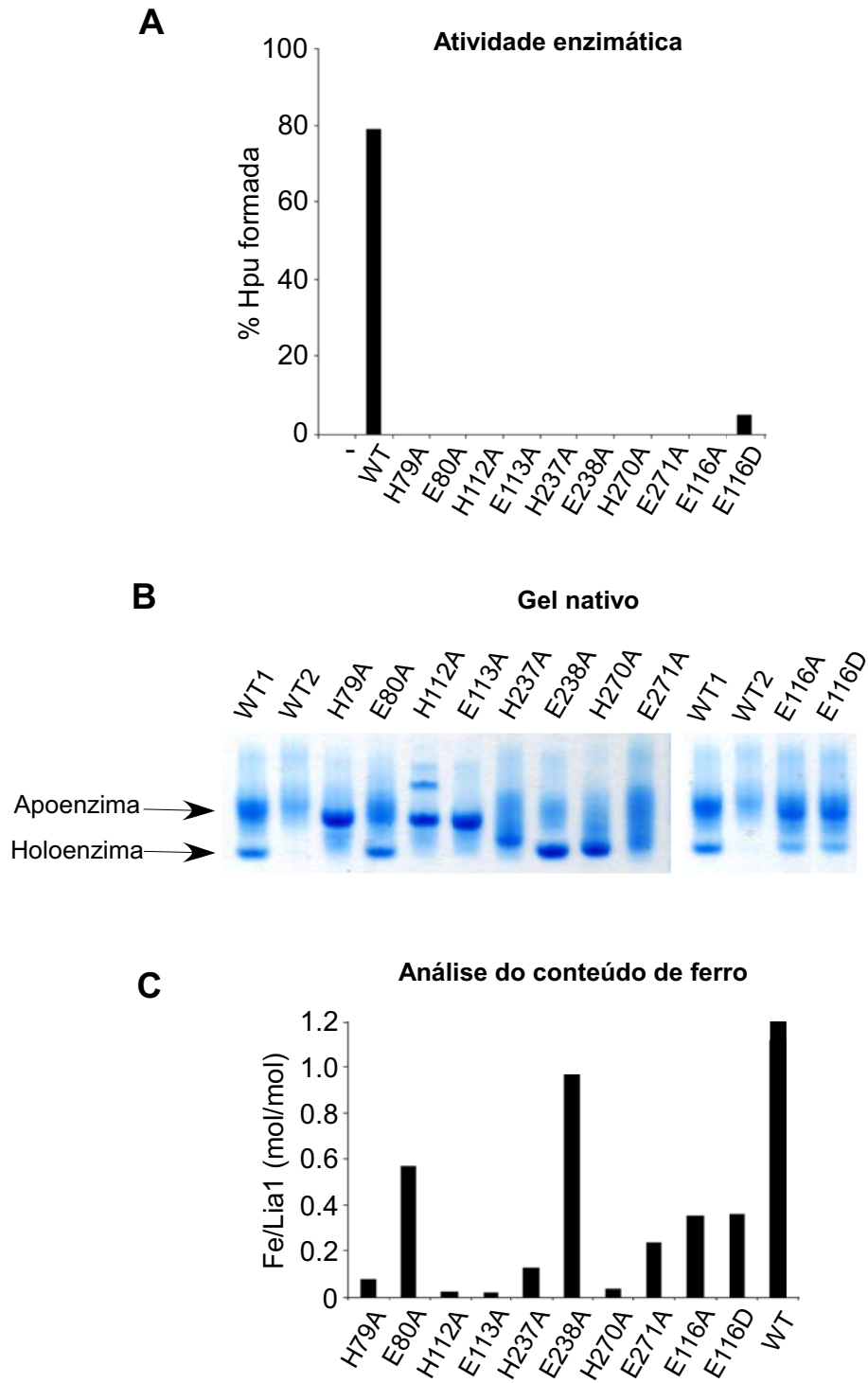


Figura 17- Análise mutacional da proteína Lia1. **A:** Ensaio da atividade hidroxilásica in vitro das proteínas recombinante Lia1 selvagem e mutadas. **B:** Avaliação do padrão de migração das proteínas após eletroforese em condições não-desnaturantes. **C:** Análise do conteúdo de metal das proteínas recombinante Lia1 selvagem e mutadas.

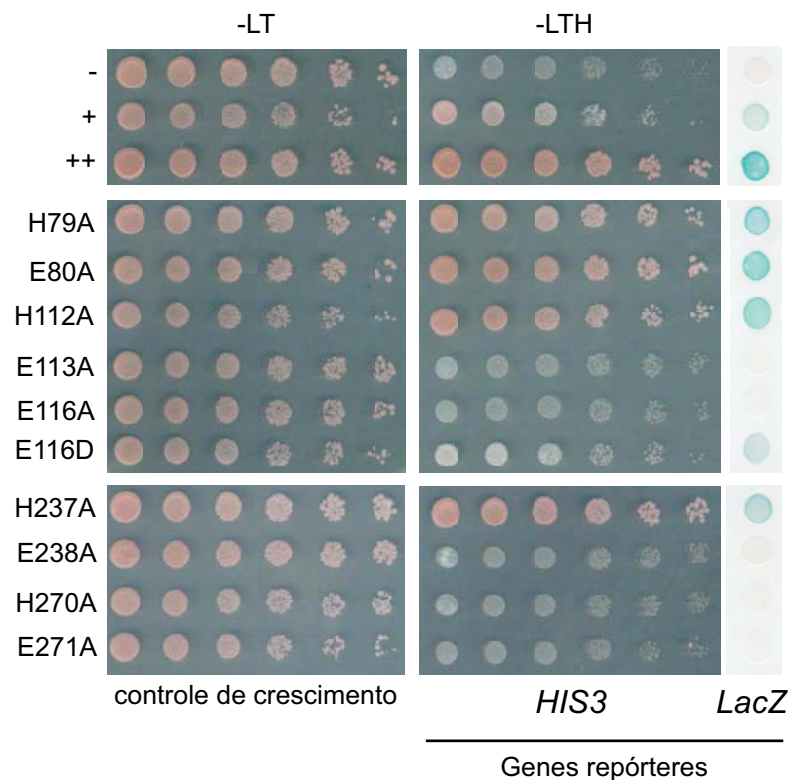


Figura 18- Avaliação da ligação dos mutantes de Lia1 ao substrato eIF5A por duplo-híbrido. Diluições seriadas (1:10) das culturas das linhagens produzindo as diferentes proteínas LexA-Lia1 selvagem e mutadas, assim como a proteína eIF5A em fusão com o domínio de ativação de Gal4, foram plaqueadas em meio SC - Leu/Trp e SC -Leu/Trp/His para avaliação do controle de crescimento e do gene repórter *HIS3*, respectivamente. O crescimento foi avaliado após 2 a 3 dias de incubação a 30°C. O fenótipo β -gal⁺ foi avaliado através do ensaio de β -galactosidase realizado em membrana de nitrocelulose.

4.8.4- Caracterização estrutural de Lia1 por meio de ensaios espectroscópicos

A dificuldade em se obter cristais de Lia1 pode ser decorrente de uma possível flexibilidade existente na proteína. Isto pode ser devido à estrutura secundária característica das “HEAT-like repeats”, das quais, como descrito anteriormente, acredita-se que Lia1 é composta. Sendo assim, para avaliar a estrutura secundária de Lia1 foi realizado o dicroísmo circular (CD) no espectropolarímetro Jasco J-810 na região de UV distante (190-250nm). Uma vez que a estrutura adquirida por Lia1 é desconhecida, este ensaio é de fundamental importância para a caracterização desta proteína. A detecção sucessiva em vários comprimentos de onda leva à geração do espectro completo do CD. O painel A da Figura 19 mostra os resultados obtidos para Lia1. Como pode ser observado, o formato da curva gerada é típico de proteínas ricas em α -hélices, apresentando dois sinais mínimos característicos deste espectro a 208nm e 222nm e um sinal positivo ao redor de 192nm. Desta forma, os dados gerados por dicroísmo estão condizentes com a predição da estrutura de Lia1 e com a presença dos “HEAT-like repeats”.

Para dar continuidade à caracterização da proteína Lia1, um outro método espectroscópico foi utilizado, a espectroscopia de fluorescência. A fluorescência intrínseca das proteínas é devida aos aminoácidos aromáticos, principalmente triptofano e tirosina, uma vez que o rendimento quântico da fenilalanina é muito baixo. A fluorescência gerada somente por resíduos de triptofano pode ser seletivamente excitada a 295nm, pois neste comprimento de onda não ocorre absorção pelas tirosinas. A contribuição dos resíduos de tirosina para a fluorescência, por sua vez, pode ser avaliada após excitação a 280nm. A fluorescência do triptofano é altamente sensível à polaridade do ambiente ao redor do anel indol e, desta forma, pode fornecer informações importantes a respeito da localização tridimensional do único resíduo de triptofano presente na proteína Lia1 e do quanto este resíduo pode ou não estar exposto na sua estrutura terciária. O comprimento de onda em que ocorre a emissão máxima de fluorescência ($\lambda_{\text{máx.}}$) dos resíduos de triptofano em diferentes proteínas comumente varia, sendo observado uma correlação direta entre os valores de $\lambda_{\text{máx.}}$ e a exposição do triptofano nas proteínas (Eftink e Ghiron, 1976). Desta forma, com a finalidade de monitorar o

ambiente de resíduos de tirosina e, mais especificamente, do único resíduo de triptofano dentro da estrutura protéica de Lia1, os espectros de emissão foram obtidos entre 310 e 400nm nos comprimentos de onda de excitação ($\lambda_{exc.}$) de 280nm e 295nm, respectivamente, e estão apresentados no painel B da Figura 19. A partir dos espectros de emissão, os comprimentos de onda de emissão máxima ($\lambda_{máx.}$) foram determinados. Após a excitação a 280nm e 295nm, os $\lambda_{máx.}$ observados para Lia1 foram, respectivamente, de 339nm e 342nm, sendo o último valor característico de um resíduo de triptofano situado em um ambiente relativamente apolar, isto é, parcialmente exposto ao solvente.

Com a finalidade de melhor compreender a localização do triptofano na proteína Lia1, o acesso do solvente à cadeia lateral deste aminoácido foi estimado por estudos de “quenching” por acrilamida. A acrilamida é capaz de promover uma diminuição da fluorescência do triptofano por contato físico com o anel indol deste aminoácido (quenching colisional), o qual tende a doar seus elétrons durante o estado excitado. Desta forma, a facilidade com a qual o triptofano é apagado depende da sua exposição à acrilamida. O acesso dos resíduos, por sua vez, é refletido pela constante de Stern-Volmer (K_{SV}), que pode ser facilmente calculada através da equação de Stern-Volmer $F_0/F=1+K_{SV} \cdot [Q]$, em que F_0 e F representam as intensidades de fluorescência na ausência e presença de acrilamida, respectivamente, K_{SV} é a constante de Stern-Volmer e $[Q]$ é a concentração de acrilamida. Desta forma, a intensidade da fluorescência no comprimento de onda de emissão máxima ($\lambda_{máx.}$) é medida em função da concentração de acrilamida.

O painel A da Figura 20 apresenta os espectros de emissão obtidos entre 310 e 400nm no $\lambda_{exc.}$ de 295nm, específico para o triptofano, em cada concentração de acrilamida utilizada. Como pode ser observado, o aumento da concentração de acrilamida acarretou em uma redução significativa na intensidade da fluorescência do único resíduo de triptofano em Lia1. A partir dos dados gerados neste comprimento de onda, o gráfico de Stern-Volmer para o “quenching” com acrilamida foi gerado e a K_{SV} pôde ser calculada (painel B, Figura 20, Tabela 5). O valor de 2,45 para esta constante indica que o resíduo de triptofano em Lia1 apresenta pequena exposição à acrilamida o que realmente comprova um ambiente relativamente hidrofóbico, condizente com o $\lambda_{máx.}$ observado.

Adicionalmente, para melhor mapear a localização do único resíduo de triptofano na estrutura terciária de Lia1, outros aspectos do ambiente ao redor deste aminoácido foram obtidos por experimentos de “quenching” de fluorescência a partir da utilização de iodeto de potássio. Enquanto que a acrilamida é um composto polar, não carregado e capaz de penetrar no interior de proteínas, KI é polar e, desta forma, seu acesso ao triptofano vai depender não somente de quanto o resíduo de triptofano está exposto, mas também das cargas existentes ao redor deste resíduo. Diante das diferenças de tamanho e carga entre estes compostos, este experimento de “quenching” da fluorescência intrínseca de Lia1 será usado para diferenciar a localização de seu único resíduo de triptofano. Da mesma forma que para o “quenching” por acrilamida, o grau de exposição do triptofano ao iodeto será refletido pela constante de Stern-Volmer (K_{SV}). Para tanto, a fluorescência do triptofano foi avaliada frente a concentrações crescentes desse agente. Os resultados obtidos com o “quenching” por KI estão apresentados nos painéis C e D da Figura 20. Os espectros de emissão entre 310 e 400nm foram obtidos (painel C) e as intensidades de fluorescência no comprimento de onda correspondente à emissão máxima foram então analisadas para a obtenção das constantes de Stern-Volmer de acordo com a equação de Stern-Volmer. A eficiência do “quenching” por este composto iônico foi refletida pelo valor obtido para K_{SV} de 2,99 (painel D). Comparando o valor de K_{SV} obtido com o composto padrão N-Ac-Trp-NH₂, o qual mimetiza um fluoróforo completamente exposto ao solvente ($K_{SV} = 11,7$) (Parvanova *et al.*, 2003), é possível observar que o iodeto tem um menor acesso ao triptofano da proteína Lia1, como indicado por uma constante de Stern-Volmer que é aproximadamente 75% menor que a observada para N-acetiltryptofanamida. Como observado anteriormente através do “quenching” por acrilamida, o resíduo de triptofano não está extremamente enterrado na estrutura protéica, uma vez que a acrilamida ainda é capaz de apagar a fluorescência deste resíduo. Desta forma, o menor acesso do iodeto não deve ser devido a um impedimento estérico, mas sim pela maior presença de cargas negativas ao redor do triptofano, as quais estariam contribuindo para a repulsão dos ânions iodeto.

Tabela 5- Constantes de Stern-Volmer para o “quenching” da fluorescência de Lia1 por acrilamida

Proteína	condição	Ksv (M^{-1})
Lia1	Não tratada (pH7,5)	$2,45 \pm 0,04$
	2 mM EDTA	$5,60 \pm 0,06$
	10 mM EDTA – 1º estágio	$244,7 \pm 2,6$
	10 mM EDTA – 2º estágio	$10,50 \pm 0,30$
	2mM EGTA	$6,02 \pm 0,07$
	10mM EGTA	$6,17 \pm 0,12$
	pH 5,5 - 1º estágio	$17,08 \pm 2,45$
	pH 5,5 -2 estágio	$6,27 \pm 0,18$
	pH 3,0 - 1º estágio	$12,61 \pm 1,13$
	pH 3,0 - 2º estágio	$5,51 \pm 0,07$
N-Ac-Trp-NH ₂ *		20,8
ACTH		13,0
Azurina		0

*composto padrão que mimetiza um resíduo de triptofano exposto ao solvente.

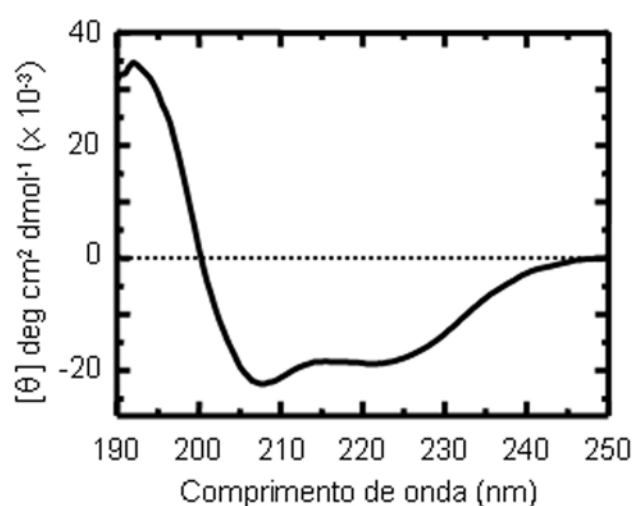
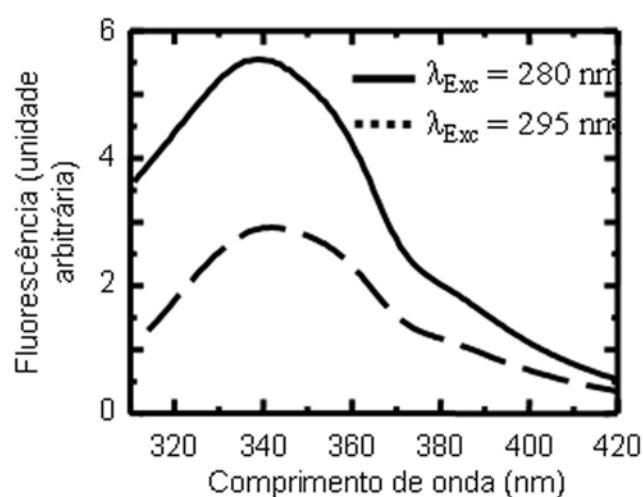
A**B**

Figura 19- Propriedades espectroscópicas da proteína Lia1 recombinante. A: Dicroísmo circular da região de UV distante (190-250nm). **B:** Características da fluorescência intrínseca da proteína Lia1. Os espectros de emissão (310-400nm) foram obtidos após excitação a 280nm (linha contínua) e 295nm (linha pontilhada).

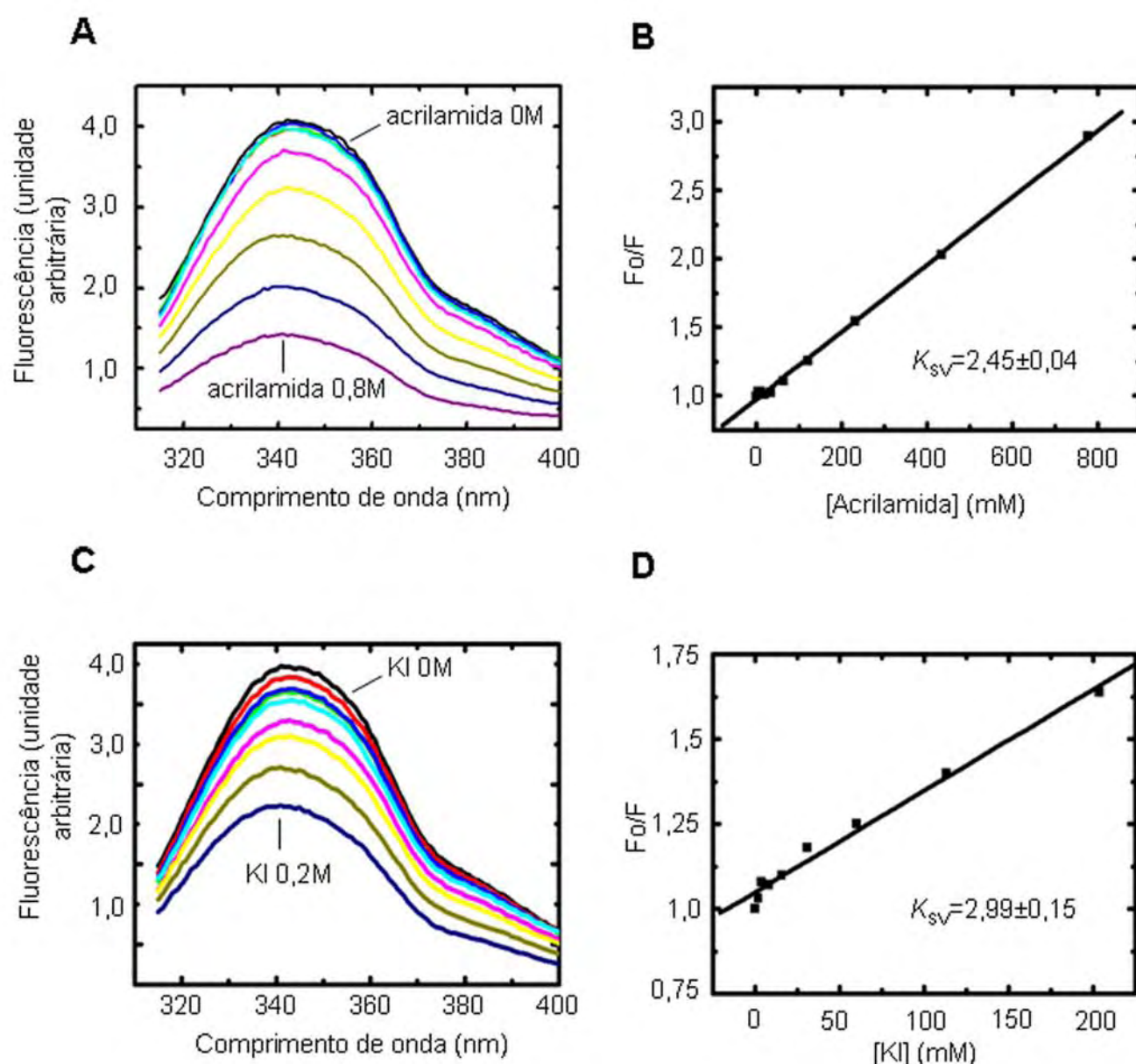


Figura 20- Ensaio de “quenching” da fluorescência intrínseca do triptofano da proteína Lia1. **A:** Espectros de emissão obtidos entre 310nm e 400nm no $\lambda_{exc.}$ de 295nm em cada concentração de acrilamida utilizada. **B:** O gráfico da razão F_0/F pela concentração de acrilamida resulta em uma reta cuja inclinação reflete a constante de Stern-Volmer. **C:** Espectros de emissão obtidos entre 310nm e 400nm no $\lambda_{exc.}$ de 295nm para o “quenching” com KI. **D:** Gráfico de Stern-Volmer para o “quenching” colisional utilizando as diferentes concentrações de KI.

4.8.5- Efeitos do pH na atividade catalítica e na estrutura terciária de Lia1

Uma vez que o estado de ionização dos aminoácidos pode ser alterado mediante variação de pH, afetando a reatividade de grupos cataliticamente ativos ou a conformação ativa da enzima, o efeito individual do pH na atividade hidroxilásica e na estrutura terciária de Lia1 foram avaliados. Os resultados obtidos nesta análise estão apresentados na Figura 21.

A proteína Lia1 recombinante foi capaz de catalisar a conversão *in vitro* de eIF5A-Dhp a eIF5A-Hpu no intervalo de pH de 6,0 a 10,0 (painel A). Embora a proteína tenha sido ativa em um intervalo grande de variação de pH, a atividade máxima foi observada no pH 7,5. Valores baixos de pH (<5,0) resultaram em completa perda de atividade, enquanto que em valores mais altos (>8,0) a enzima reteve parcialmente sua atividade. Para avaliar se a inativação da enzima correlaciona-se com a perda de ferro, eletroforese em gel nativo foi utilizada para detectar o estado conformacional adotado em cada pH. Como mostrado no painel B, nos pHs 2,0 e 3,0, a enzima apresentou somente a banda de migração mais lenta característica da apoenzima. Este dado está de acordo com a falta de atividade nestes valores de pH. Em contraste, a banda inferior foi predominantemente detectada acima de pH 7,0 provavelmente devido à presença de ferro no sítio ativo da holoenzima. Embora nos pHs 4,0 e 5,0 nenhuma atividade enzimática tenha sido detectada, as duas bandas representando as formas apo e holo da enzima estão presentes nestas condições. A falta de atividade enzimática neste caso pode ser uma consequência do baixo conteúdo de ferro combinado com a desprotonação dos resíduos do sítio ativo envolvidos na reação catalítica. Finalmente, em pH 6,0, ambas as formas coexistem e o pH não foi baixo o suficiente para prevenir que a reação ocorresse.

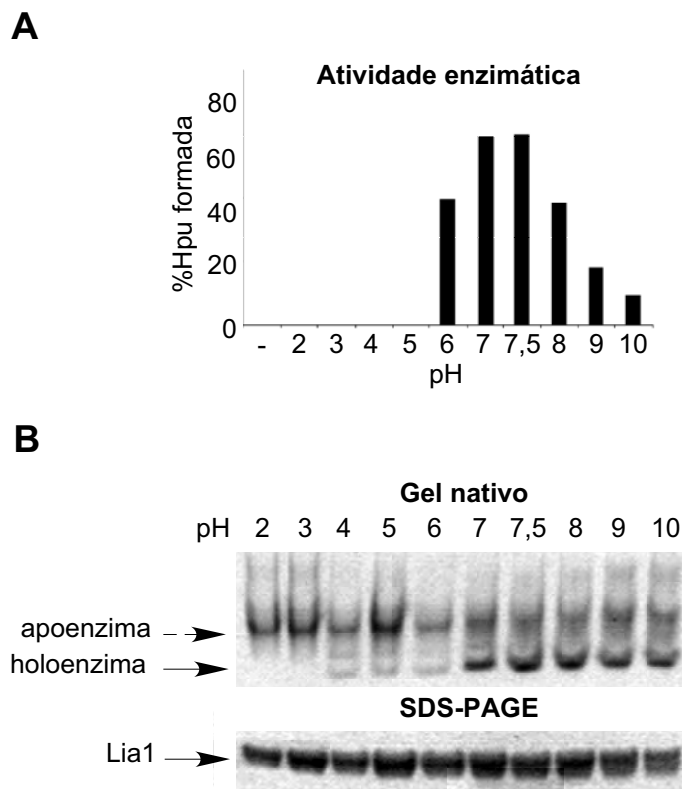


Figura 21- Efeitos do pH na atividade catalítica e na estrutura terciária de Lia1.
A: Análise da atividade enzimática de Lia1 em diferentes valores de pH através do ensaio de hidroxilação *in vitro*. **B:** Análise do estado conformacional adotado por Lia1 nos diferentes pHs por eletroforese não-desnaturante (painel superior) e SDS-PAGE (painel inferior).

4.8.6- Análise dos processos de desnaturação térmica e química da proteína Lia1

As propriedades espectroscópicas da proteína Lia1 apresentadas acima sugerem que os sinais monitorados por CD e fluorescência podem ser utilizados com confiança para caracterizar as mudanças globais que ocorrem durante a desnaturação desta proteína. O valor de pH 7,5, no qual a enzima mostrou seu máximo de atividade, foi inicialmente escolhido para avaliar a estabilidade da proteína recombinante Lia1.

A técnica de dicroísmo circular na região de UV distante foi inicialmente empregada para monitorar a estrutura secundária de Lia1 durante a desnaturação térmica. Como pode ser observado no painel A da Figura 22, com o aumento da temperatura até 95°C, Lia1 perdeu suas características de proteína helicoidal dando origem a um espectro de CD diferente nesta temperatura. Ambos os sinais a 222nm e 208nm foram alterados para 220nm e 204nm, respectivamente, enquanto que o valor máximo relativo à 192nm foi drasticamente reduzido a aproximadamente zero. No entanto, as mudanças nos valores de elipticidade a 222nm induzidas pela temperatura iniciaram em estágios iniciais da desnaturação, em torno de 30°C, e a desnaturação da proteína foi completa assim que a temperatura atingiu 65°C (painel B). É interessante notar que a curva gerada não se encaixa perfeitamente a uma sigmóide, o que seria esperado para um mecanismo de desnaturação unimolecular. No mecanismo de desnaturação denominado unimolecular a proteína adota somente dois estados estruturais: nativo (N) e desnaturado (D). Desta forma, o equilíbrio é descrito por $N \leftrightarrow D$. A detecção de um discreto ponto de inflexão ao redor de 45°C pode indicar a existência de um intermediário instável no decorrer do processo de desnaturação térmica da proteína Lia1. A presença adicional de ferro na amostra (100µM) parece alterar sutilmente este ponto (painel B).

Aliada à análise de estabilidade térmica da proteína Lia1, as técnicas espectroscópicas de dicroísmo circular e fluorescência foram utilizadas para, em conjunto, acompanhar as mudanças estruturais de Lia1 induzidas pelo aumento nas concentrações de cloreto de guanidina (GdnHCl). Para esta análise foram utilizadas ambas as formas da enzima. Com a finalidade de retirar os metais presentes na estrutura de Lia1, a holoenzima foi dialisada frente a 100mM de tampão citrato

pH4,5, gerando a apoenzima. O tratamento com citrato, garantindo a quelação do metal, foi demonstrado para a proteína humana (Kim *et al.*, 2006).

Como descrito anteriormente, o comprimento de onda de emissão máxima ($\lambda_{\text{máx.}}$) observado para a holoenzima foi de 342nm. Por outro lado, a proteína tratada com citrato evidenciou um $\lambda_{\text{máx.}}$ de 346nm na ausência de GdnHCl (dados não mostrados), comprovando que a retirada do metal promove uma abertura na estrutura de Lia1, expondo, desta forma, o resíduo de triptofano. Em ambas as séries o $\lambda_{\text{máx.}}$ observado no estado desnaturado foi de 350nm (dados não mostrados) e reflete, portanto, a mais alta exposição do único resíduo de triptofano, uma vez que nestas condições a conformação de Lia1 está totalmente prejudicada. Além da mudança no $\lambda_{\text{máx.}}$, o processo de desnaturação induzido pela utilização de 6,0M de GdnHCl foi acompanhado pela diminuição da intensidade de fluorescência, resultado também esperado para o aumento da exposição do triptofano ao solvente.

Como se espera comparar os dados entre os dois experimentos, os sinais gerados no $\lambda_{\text{máx.}}$ foram escolhidos como parâmetro para a análise da estabilidade de Lia1, pois a intensidade de fluorescência é uma função da concentração de proteína sendo sensível, portanto, a erros volumétricos. O painel A da Figura 23 mostra as curvas de transição monitoradas por fluorescência. Da mesma forma, a desnaturação química foi acompanhada por CD e os dados estão apresentados no painel B da Figura 23. Os dados gerados revelam que a forma apo da enzima Lia1 é mais instável. Em ambos os parâmetros utilizados, a concentração de GdnHCl em que se observa 50% de desnaturação foi mais baixa para a apoenzima do que para holoenzima. Ainda, a desnaturação da forma não ligada ao metal foi iniciada em valores de GdnHCl anteriores àqueles observados para a forma ligada ao metal.

Como já observado na desnaturação térmica, a reação de desnaturação química de Lia1 também não é cooperativa. No entanto, as curvas de transição obtidas com o composto GdnHCl, revelam uma via de desnaturação mais complexa (comparar painel B da Figura 22 com painéis A e B da Figura 23), comprovando o acúmulo de espécies intermediárias em equilíbrio com os estados nativo e desnaturado da proteína. Ainda, as curvas de desnaturação da holoenzima não se encaixam no ajuste global dos dados (linha preta em ambos os gráficos). Apesar dos dados obtidos utilizando a apoenzima enquadrarem-se mais adequadamente ao ajuste dos dados, a curva obtida não se trata de uma sigmóide e, desta forma, a

desnaturação da forma apo de Lia1 também não é cooperativa. Por fim, uma outra característica importante que comprova o mecanismo $N \leftrightarrow D$ é a observação das mesmas transições cooperativas quando se utiliza diferentes sinais. Como pode ser observado no painel C da Figura 23, não foi possível sobrepor os sinais gerados pelas duas técnicas espectroscópicas utilizadas para cada um dos valores de pH, confirmando que a desnaturação de Lia1 não segue o mecanismo unimolecular.

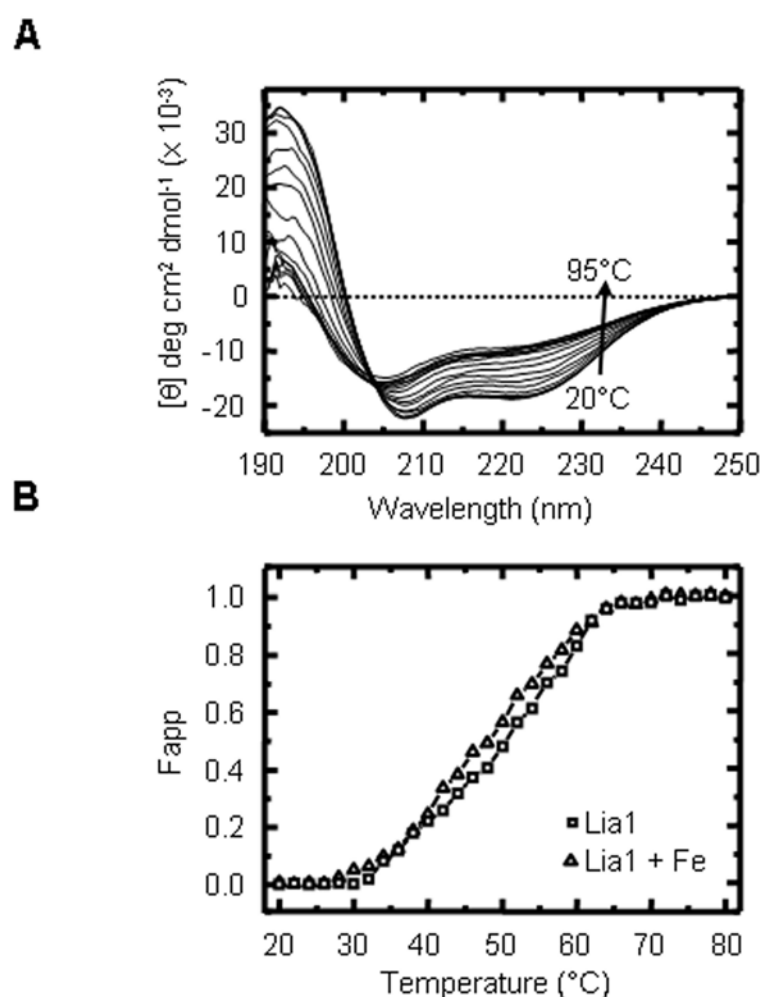


Figura 22- Avaliação da estabilidade da estrutura secundária da proteína Lia1 por dicroísmo circular mediante estresse térmico. A: Espectro de dicroísmo circular da proteína recombinante Lia1 em pH7,5 durante desnaturação térmica (20°C a 95°C) na região de UV distante (190-250nm). **B:** A estabilidade estrutural também foi acompanhada por mudanças na elipticidade a 222nm a cada variação de 0,2°C.

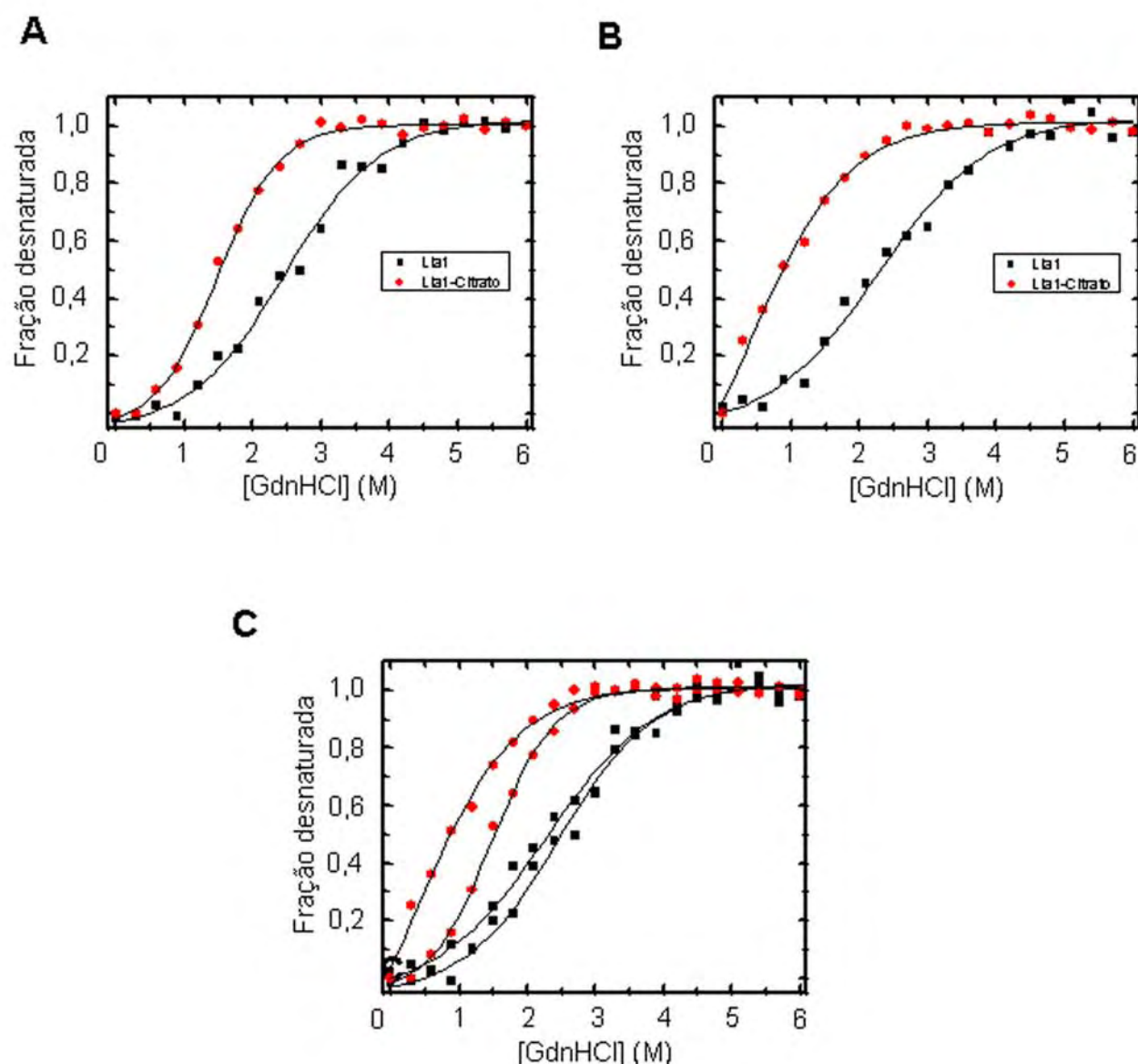


Figura 23- Curvas de titulação com GdnHCl para avaliar o processo de desnaturação química da proteína Lia1. **A:** Gráfico da razão F_0/F pela [GdnHCl] obtido a partir das intensidades da fluorescência no comprimento de onda de emissão máxima ($\lambda_{\text{máx.}}$) utilizando o $\lambda_{\text{exc.}}$ de 295nm para avaliar as alterações na estrutura terciária de Lia1. **B:** Alternativamente o processo de desnaturação química foi monitorado por dicroísmo circular. O sinal gerado em cada concentração de GdnHCl utilizada foi monitorado a 222nm para acompanhar alterações na estrutura secundária de Lia1. **C:** Sobreposição dos gráficos obtidos por fluorescência e dicroísmo circular. As séries de desnaturações foram realizadas com a proteína Lia1 contendo ferro (■) e tratada com citrato para a retirada do metal (●).

4.8.7- Análise da estabilidade térmica da proteína Lia1 frente a variação de pH e compostos quelantes

A técnica de dicroísmo circular foi utilizada para verificar em que extensão a presença de compostos quelantes e a variação de pH atingem a estrutura secundária da proteína Lia1 e, portanto, afetam a sua estabilidade mediante a variação da temperatura.

Inicialmente, os ensaios de desnaturação térmica foram realizados com a proteína Lia1 em tampão 10mM Tris-HCl pH7,5 na presença de EDTA e EGTA 2mM. O comprimento de onda 222nm foi também utilizado para monitorar alterações na constituição de α -hélices, sendo o sinal registrado a cada variação de 0,2°C. Uma das informações disponíveis a partir dos estudos de desnaturação térmica foi a temperatura na qual ocorreram 50% de desnaturação (T_m). Esse parâmetro foi então utilizado para fornecer medidas comparativas da estabilidade de Lia1 diante das mudanças idealizadas neste experimento. Os dados obtidos nesta análise estão apresentados no painel A da Figura 24. Em todas as condições a proteína Lia1 perde sua estrutura secundária conforme a temperatura é aumentada, refletido pela diminuição no valor modular da elipticidade. O processo de desnaturação na presença de EDTA e EGTA iniciou-se em temperaturas um pouco mais baixas que na ausência destes compostos. No entanto, o valor encontrado para a T_m na presença de EDTA 2mM de 39,43°C mostra que a proteína tornou-se mais rapidamente suscetível à desnaturação térmica que na presença de EGTA 2mM cujo valor foi de 43,85°C. Por outro lado, na ausência desses compostos a T_m foi de 49,62°C. Enquanto EDTA parece eliminar o ponto de inflexão observado a 45°C, a presença de EGTA parece tornar este ponto mais proeminente. Os resultados indicam provavelmente efeitos diferentes desses agentes quelantes na estrutura de Lia1.

Os ensaios de desnaturação térmica foram também realizados com a proteína Lia1 em diferentes valores de pH. Os resultados estão apresentados no painel B da Figura 24. Enquanto que no pH 9,6 o valor de T_m (49,68°C) equiparou-se com o obtido a pH 7,5 (49,62°C), nos pHs 5,5 e 3,0 foi observado um decréscimo da ordem de 10°C e 15°C neste parâmetro, respectivamente. A cooperatividade do processo de desnaturação da proteína Lia1 tornou-se evidente nos pHs 3,0 e 5,5, revelando a maior instabilidade da proteína nestes valores de pH. Por outro lado, no pH 9,6 o

ponto de inflexão a 45°C é mais pronunciado que no pH 7,5, reforçando a hipótese da existência de intermediário(s) estável(is) no processo de desnaturação térmica da proteína Lia1 em valores mais altos de pH.

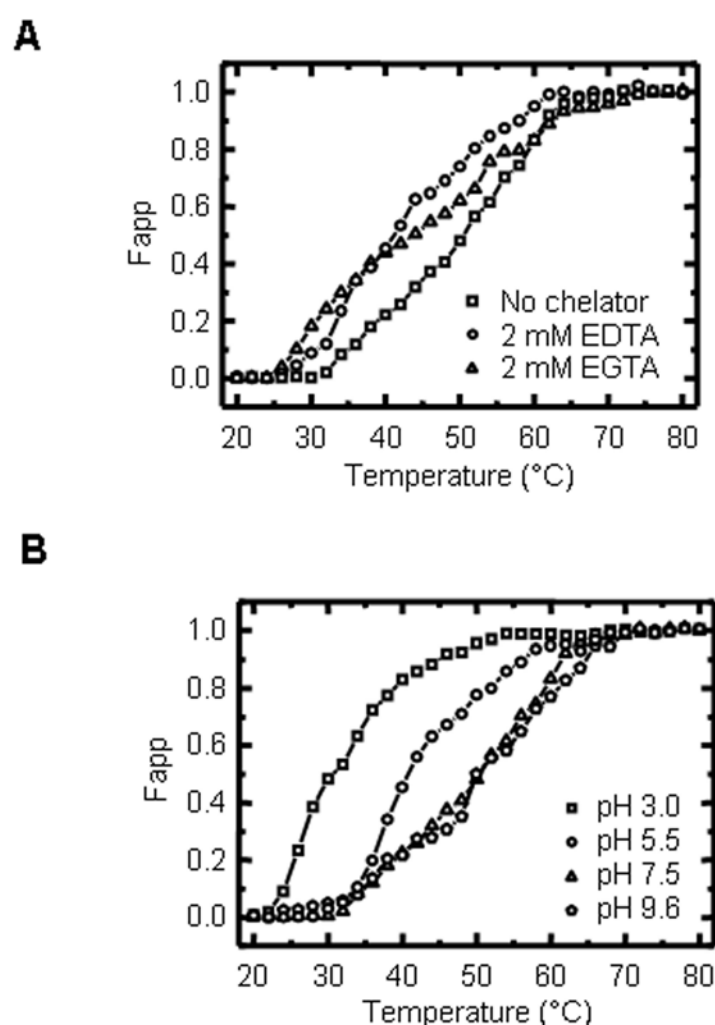


Figura 24- Análise da estabilidade térmica de Lia1 monitorada por dicroísmo circular na região de UV distante (190-250nm). A estabilidade estrutural de Lia1 na presença dos agentes quelantes EDTA e EGTA (painel A) e frente a diferentes valores de pH (painel B) foi acompanhada por mudanças na elipticidade a 222nm a cada variação de 0,2°C durante a desnaturação térmica (20°C a 95°C).

4.8.8- Análise das alterações na estrutura terciária de Lia1 promovidas pela presença de agentes quelantes e variação de pH

Ensaio de “quenching” por acrilamida foram inicialmente desenvolvidos na presença de 2mM de EDTA ou EGTA e de diferentes valores de pH, com o intuito de verificar se alguma alteração na estrutura terciária de Lia1 ocorre, permitindo com isto, um maior contato da acrilamida com esta proteína.

A Figura 25 apresenta os gráficos de Stern-Volmer com os valores para K_{SV} do “quenching” por acrilamida listados na Tabela 5. A adição de EDTA ou EGTA em uma concentração final de 2mM aumentou o valor da constante de Stern-Volmer em 2,3 e 2,5 vezes, respectivamente (painel A, Figura 25, Tabela 5). Esses resultados indicam que a acessibilidade ao triptofano, a qual estava relativamente prejudicada na enzima não tratada, como refletido pelo mais baixo valor de K_{SV} , aumentou durante o tratamento com os compostos quelantes. Adição de concentrações maiores de EGTA (10mM) não resultou em nenhuma diferença em comparação à concentração de 2mM (Tabela 5). Em contraste, adição de EDTA a uma concentração final de 10mM resultou em um “quenching” bifásico da fluorescência intrínseca do único resíduo de triptofano de Lia1. Os valores calculados de K_{SV} para o primeiro e segundo estágios do processo foram aproximadamente 12 e 6 vezes maiores dos que aqueles obtidos para o composto N-Ac-Trp-NH₂ (Tabela 5).

Em valores baixos de pH, 5,5 e 3,0, nos quais acredita-se que o ferro tenha se dissociado de seus sítios de coordenação, o “quenching” da fluorescência do triptofano também se revelou como um processo bifásico (painel B, Figura 25). Para ambos os valores de pH, a primeira fase não apresentou aumento significativo uma vez que os valores das constantes aproximaram-se daqueles para o triptofano livre (Tabela 5). Por sua vez, as K_{SV} calculadas para a segunda fase foram comparáveis aos valores obtidos para as concentrações de 2mM dos agentes quelantes (Tabela 5).

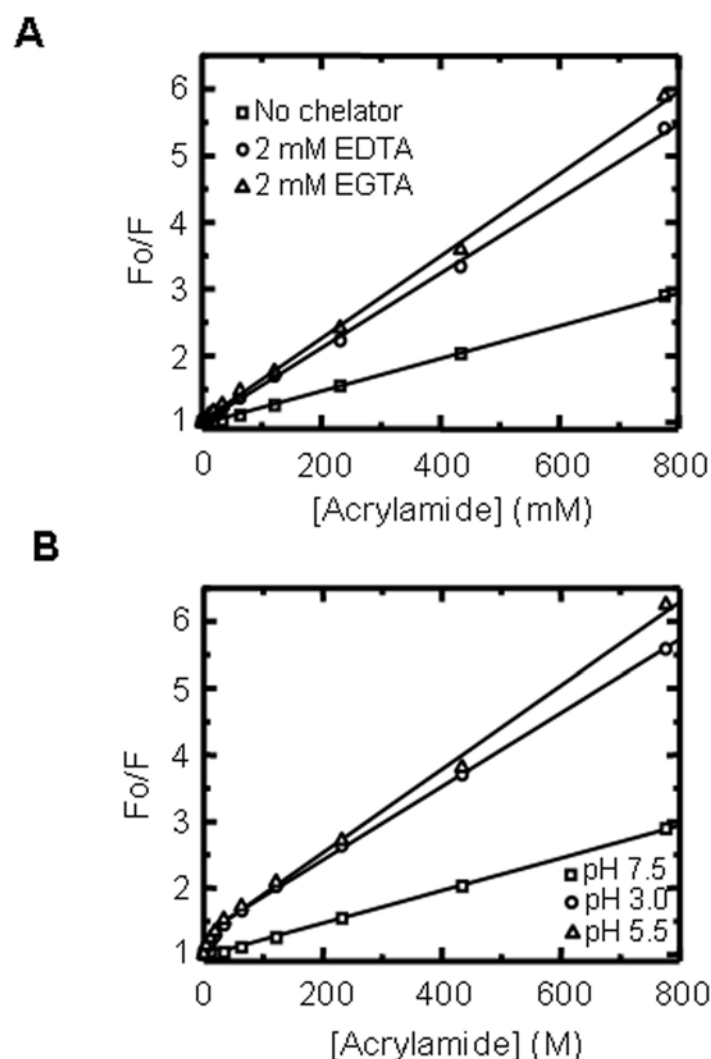


Figura 25- Alterações conformacionais na proteína Lia1 induzidas por agentes quelantes e pH. **A:** Os ensaios de quenching da fluorescência intrínseca do triptofano foi realizado através da titulação de soluções da proteína Lia1, não tratada ($\square$) ou previamente tratadas com EDTA 2mM ($\circ$) ou EGTA 2mM (Δ), com concentrações crescentes de acrilamida. Após excitação a 295nm, os valores da intensidade de fluorescência no $\lambda_{\text{máx}}$ foram utilizados para obter os gráficos de Stern-Volmer. **B:** Gráficos de Stern-Volmer para o "quenching" por acrilamida nos valores de pH 3,0 ($\circ$), 5,5 (Δ) e 7,5 ($\square$).

4.8.9- Determinação estrutural de Lia1 nas formas ligada e livre de metal por SAXS

Inicialmente, a técnica de espalhamento dinâmico de luz foi utilizada em conjunto com a finalidade de avaliar o estado de oligomerização desta proteína. As medidas obtidas revelaram um raio hidrodinâmico de 2,8nm, correspondente a uma massa molecular de 36,0kDa (dados não mostrados). Este valor está de acordo com a massa molecular e 36,16kDa calculada a partir da sequência primária de Lia1. Os resultados indicam que a proteína purificada está presente como monômero em solução e confirma o pico único obtido na cromatografia por exclusão molecular em coluna Superdex 200 (painel A, Figura 15).

Para melhor avaliar os raios de giro das formas apo e holo e por vez confirmar as alterações observadas nos ensaios espectroscópicos, o presente estudo lançou mão da técnica de espalhamento de raios-X em baixo ângulo (SAXS). Através deste método, informações estruturais de macromoléculas presentes em solução podem ser obtidas e então utilizadas para validar estruturas protéicas modeladas, como, por exemplo, o modelo de DOHH (Park *et al.*, 2006). Os dados de SAXS foram coletados utilizando a proteína Lia1 selvagem em tampão pH 7,5 tratada diferencialmente com os agentes quelantes, EDTA ou EGTA na concentração de 2mM, ou dialisada frente a tampão citrato pH 4,5. Adicionalmente, os mutantes H270A e E113A foram submetidos à difração por raios-X em baixo ângulo. As curvas experimentais processadas a partir dos dados coletados na linha de luz estão apresentadas na Figura 26. A partir da transformação Fourier, as funções de distribuição par, a qual fornece informação direta sobre a forma e o tamanho das moléculas em solução, foram calculadas (painel A). No painel B estão apresentados os gráficos Kratky para o espalhamento obtido em cada uma das amostras. A partir dos gráficos gerados foi possível determinar os raios de giro de cada uma das espécies analisadas. Enquanto o raio de giro da proteína Lia1 selvagem em pH 7,5 foi $24,17 \pm 0,01 \text{ \AA}$, em pH 4,5 este parâmetro foi de $27,07 \pm 0,04 \text{ \AA}$. Na presença de EDTA e EGTA 2mM, os valores calculados foram de $27,49 \pm 0,01 \text{ \AA}$ e $29,37 \pm 0,01 \text{ \AA}$, respectivamente. Por fim, as proteínas mutadas E113A e H270A apresentaram os raios de giro de $25,80 \pm 0,02 \text{ \AA}$ e $26,74 \pm 0,04 \text{ \AA}$, respectivamente. Em conjunto, os dados mostram que os diferentes tratamentos aos quais Lia1 foi submetida, assim

como a presença das mutações E113A e H270A, levam à valores de raio de giro de maior magnitude em relação à proteína selvagem em pH 7,5.

Em contraste com o arranjo ordenado das moléculas em uma rede cristalina, as proteínas em solução apresentam distribuição totalmente randômica, o que permite a livre rotação das moléculas. Diante disto, o conteúdo de informação gerado pelo SAXS é de baixa resolução. No entanto, a análise por SAXS pode revelar a conformação adotada pela proteína dando uma idéia de sua topologia. Para tanto, modelos de baixa resolução foram construídos a partir dos dados corrigidos para se ter uma idéia da forma de Lia1. Os modelos apresentados na Figura 27 foram gerados com base na proteína Yiba de *E. coli* (PDB 1OYZ), cuja estrutura terciária é conhecida. Esta proteína, assim como Lia1, pertence à classe das proteínas que contém as repetições “HEAT”. Estão sendo apresentadas três diferentes vistas de cada um dos modelos. Como pode ser observado na Figura 27, nos diferentes tratamentos recebidos por Lia1, assim como nos mutantes, a proteína adota uma forma mais alongada ao longo do eixo de sua superhélice (formada pela combinação das repetições “HEAT”), em contraste com a forma mais compacta apresentada pela enzima no pH 7,5. Desta forma, os dados de SAXS confirmam que a superhélice adota duas conformações globalmente diferentes dependendo de seu estado ligado ou não ligado ao metal, confirmando o modelo computacional gerado para DOHH na sua forma ligada ao ferro (Park *et al.*, 2006).

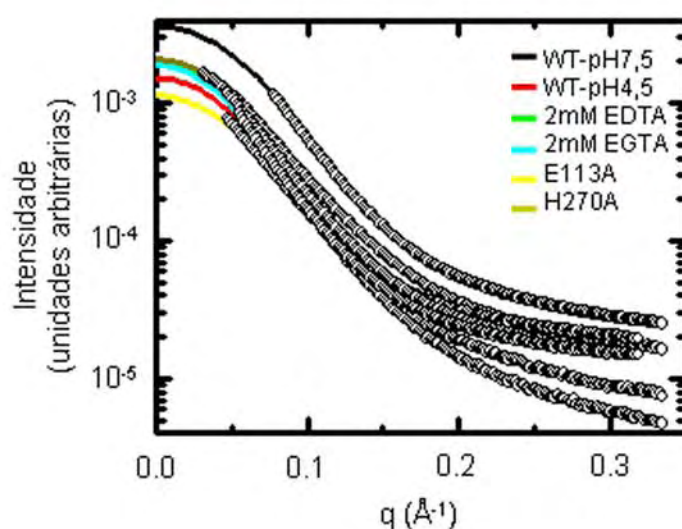
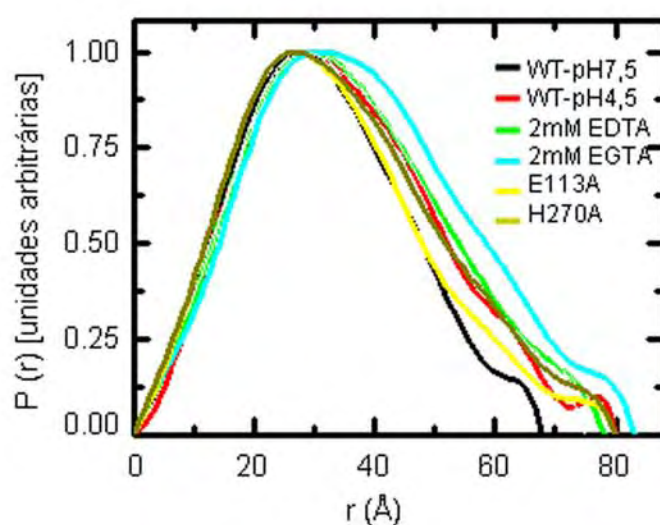
A**B**

Figura 26- Curvas experimentais processadas a partir dos dados coletados nos experimentos de espalhamento de raios-X em baixo ângulo – SAXS. A: Funções de distribuição par de distância, obtidas a partir da transformação Fourier. **B:** Gráficos Kratky para o espalhamento obtido em cada uma das amostras.

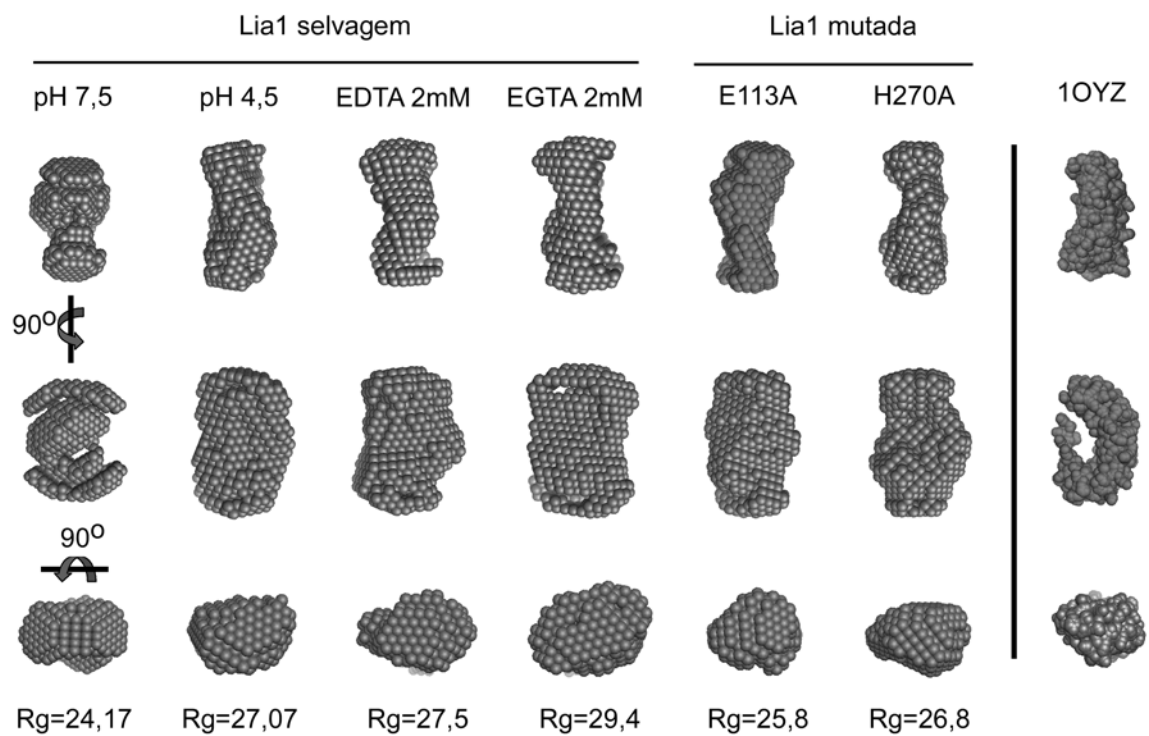


Figura 27- Determinação da estrutura de Lia1 por SAXS. Reconstrução tridimensional da proteína Lia1 a partir das medidas obtidas por SAXS. A proteína Lia1 selvagem mantida em tampão pH 7,5 foi inicialmente dialisada frente a tampão citrato pH 4,5 para garantir a retirada do ferro de sua estrutura. Foram utilizadas também amostras da proteína Lia1 em tampão pH 7,5 diferencialmente tratadas com EDTA ou EGTA 2mM. Por fim, os mutantes E113A e H270A, representando a forma não ligada ao metal, foram utilizados. A estrutura cristalizada da proteína YIBA de *E. coli* (PDB 1OYZ) está sendo mostrada para comparação.

4.9- Identificação de fatores celulares que interagem fisicamente com as enzimas Dys1 e Lia1 por meio de rastreamentos por duplo-híbrido

Dois rastreamentos por duplo-híbrido foram realizados na tentativa de identificar proteínas que interagem fisicamente com ambas as enzimas do processo de hipusinação, desoxihipusina sintase (Dys1) e desoxihipusina hidrolase (Lia1). Espera-se que o encontro dos parceiros físicos destas proteínas auxilie não apenas para a demonstração de que o processo de hipusinação é regulado *in vivo*, mas também para o próprio entendimento desta modificação pós-traducional de eIF5A, essencial para sua função.

4.9.1- Rastreamento por duplo-híbrido utilizando a proteína Dys1 como isca

Para o rastreamento de Dys1, o gene codificador desta proteína (*DYS1*) foi clonado no vetor pBTM116 para formar um híbrido entre Dys1 e a proteína de ligação ao DNA LeA (pS549). Para que o rastreamento por duplo-híbrido pudesse ser iniciado a correta produção da proteína de fusão LeA-Dys1 e a ausência de auto-ativação dos genes repórteres *HIS3* e *lacZ* por LeA-Dys1 foram avaliadas. A expressão da proteína de fusão LeA-Dys1 em três diferentes transformantes foi analisada por Western blot utilizando o anticorpo policlonal anti-Dys1. No painel A da Figura 28, as analetas 2 a 4 correspondem aos lisados obtidos dos transformantes A-C, respectivamente. Na analeta 1 a linhaagem L40 transformada com o vetor plasmidial pBTM116 foi utilizada como controle negativo. As bandas correspondentes à proteínas Dys1 endógena (43Da) e à proteína de fusão LeA-Dys1 (67Da) estão indicadas por setas. Esses resultados confirmam a produção da proteína de fusão LeA-Dys1 pelos transformantes selecionados.

A etapa subsequente à verificação da produção da proteína de fusão LeA-Dys1 consistiu na análise da expressão dos genes repórteres deste sistema de duplo-híbrido. Para tanto, os três clones contendo o plasmídeo pS549 (A-C) foram transformados com o vetor pACT visando a testar a capacidade de crescer em meio SC⁻Leu⁻Trp⁻His e a atividade da enzima β -galactosidase. Essas leveduras foram comparadas ao controle negativo L40/pBTM116-*DYS1* + pACT^{his} (-) e ao controle positivo L40/pBTM116-*TIF51A* + pACT.*DYS1* (+). No painel B da Figura 28

é possível observar que não houve crescimento dos transformantes A a C em meio SC -Leu⁻Trp⁻His e nem houve desenvolvimento de coloração azul no ensaio de β-galactosidase. O painel da esquerda apresenta o controle de crescimento em SC -Leu⁻Trp⁻.

Os três transformantes analisados expressaram a proteína de fusão LexA-Dys1 e não foram capazes de desenvolver a expressão dos genes repórteres do sistema. Desta forma, o rastreamento por duplo-híbrido foi iniciado.

No total foram rastreados aproximadamente $1,93 \times 10^5$ transformantes, dos quais 2888 foram inicialmente positivos para histidina, pois induziram, a princípio, a transcrição do gene *HIS3*. Após seleção para a marca His⁺ com a finalidade de eliminar possíveis falso-positivos, 863 transformantes foram testados para β-galactosidase. Destes, apenas 77 permaneceram sob investigação por serem capazes de induzir a expressão do gene repórter *lacZ*. A etapa seguinte consistiu em confirmar a ligação dos plasmídeos com os sítios dos repórteres observados (plasmid linkage). Entretanto, foi possível o isolamento do DNA plasmidial de apenas 48 clones, sendo os clones restantes abandonados. Somente 10 clones confirmaram a ligação dos marcadores His⁺ e β-gl⁺ com a presença do plasmídeo *LEU2*. O sequenciamento das extremidades 5' e 3' do plasmídeo *LEU2* dos candidatos levou à identificação de três genes, *TIF51A* (#421 e #423), *DYS1* (#420 e #424) e *NIS1* (#2). Os resultados da etapa de "plasmid linkage" dos candidatos positivos estão apresentados na Figura 29. Finalmente, os resultados do rastreamento por duplo-híbrido utilizando Dys1 como isca estão resumidos na Tabela 6.

Tabela 6- Rastreamento por duplo-híbrido de Dys1

NÚMERO DE TRANSFORMANTES ANALISADOS				LIGAÇÃO COM O PLASMÍDEO			CLONES SEQUENCIADOS	GENES IDENTIFICADOS
TOTAL	HIS ⁺	CONFIRMADOS HIS ⁺	B-GAL ⁺	TESTADOS	HIS ⁺	B-GAL ⁺		
1,93x10 ⁵	2888	863	77	48	5	5	5	2# = DYS1 2# = TIF51A 1# = NIS1

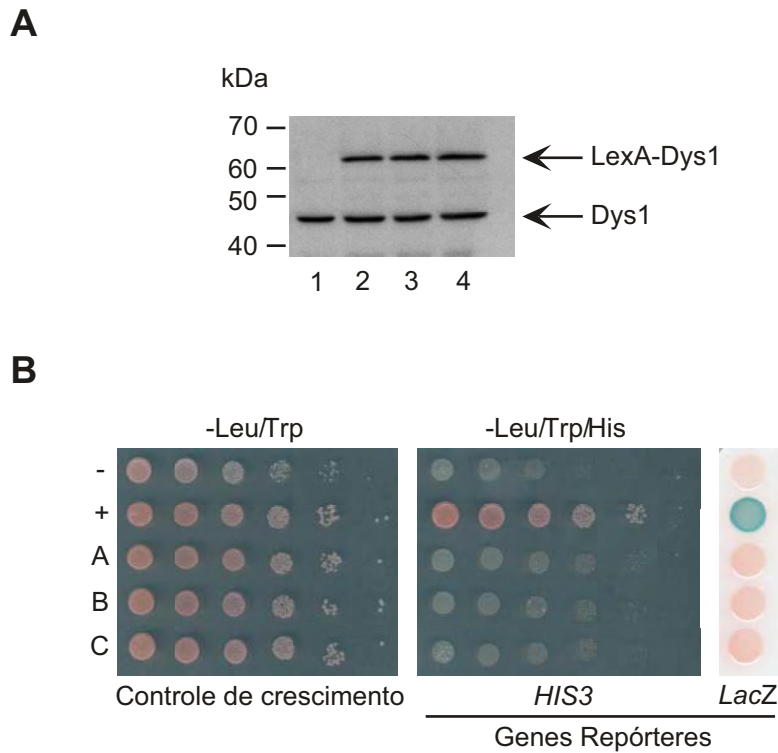


Figura 28- Avaliação da produção da proteína de fusão LexA-Dys1 e teste de auto-ativação dos genes repórteres *HIS3* e *lacZ* pela proteína de fusão. **A:** Lisados da linhagem L40 transformadas com os plasmídeos pBTM116-*DYS1* (canaletas 2 a 4) ou pBTM116 (canaleta 1) foram submetidos a SDS-PAGE 12% e western blot utilizando anticorpo policlonal anti-Dys1 (1:5.000). **B:** Linhagens L40 contendo concomitantemente a construção plasmidial pBTM116-*DYS1* e o vetor plasmidial pACT vazio (transformantes A a C) foram plaqueadas em meio SC - Leu/Trp, SC -Leu/Trp/His e ensaiadas para β -galactosidase em membrana de nitrocelulose. L40/pBTM-*TIF51A*+pACT-*DYS1* (+) e L40/pBTM-*DYS1*+pACT (-) foram utilizadas como controles. A proteína de fusão LexA-Dys1, assim como Dys1 endógena estão indicadas por setas.

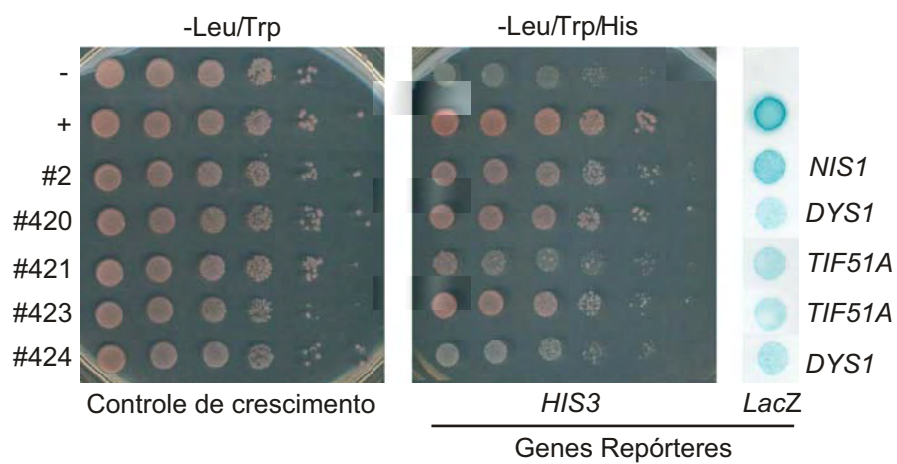


Figura 29- Confirmação da ligação do plasmídeo LEU2 com os marcadores do sistema de duplo-híbrido His⁺ e β -gal⁺ dos clones verdadeiros revelados no rastreamento de Dys1 (“plasmid linkage”). Diluições seriadas (1:10) das culturas da linhagem L40 contendo concomitantemente as diferentes construções plasmidiais foram cultivadas em meio SC -Leu/-Trp e SC -Leu/Trp/His e ensaiadas para a atividade enzimática de β -galactosidase em membrana de nitrocelulose. As linhagens L40 contendo os plasmídeos pBTM116-DYS1 + pACT e pBTM116-TIF51A + pACT-DYS1 foram utilizadas como controles negativo e positivo, respectivamente.

4.9.2- Rastreamento por duplo-híbrido utilizando a proteína Lia1 como isca

Assim como para *Dys1*, a correta produção da proteína de isca com LexA e a ativação dos genes repórteres *HIS3* e *lacZ* foram avaliadas. A expressão da proteína de isca LexA-Lia1 por Western blot utilizando o antisorpo policonal anti-Lia1 de ovelha está apresentada no painel A da Figura 30. As lanes 2 a 4 correspondem aos lisados obtidos de três transformantes A- C, respectivamente. Na lane 1 encontra-se o lisado da levedura L40 transformada com o vetor plasmidial pBTM116, utilizada como controle negativo. As bandas correspondentes à proteínas Lia1 endógena (66Da) e à proteína de isca LexA-Lia1 (60Da) estão indicadas por setas. No painel B da Figura 30, por sua vez, é possível observar que não houve crescimento dos transformantes A a C em meio SC -LeuTrpHis e nem houve desenvolvimento de coloração azul no ensaio de β-galactosidase. Diante destes dados, o rastreamento por duplo-híbrido utilizando LexA-Lia1 como isca pode ser iniciado.

Foram rastreados $7,7 \times 10^4$ transformantes. Destes transformantes, 1670 foram considerados inicialmente positivos devido à capacidade de crescer em meio SC -LeuTrpHis, quando submetidos ao teste de expressão para o gene repórter *HIS3*. 452 transformantes confirmaram a marca His⁺ e, dentre estes, 35 clones foram positivos para o ensaio de β-galactosidase. A etapa seguinte consistiu em confirmar a ligação entre os plasmídeos e os marcos do sistema duplo-híbrido plasmid link. Os resultados obtidos nesta etapa estão apresentados na Figura 31. Entre os 35 clones testados somente um candidato (#) apresentou fenótipos His⁺ e β-gl⁺, confirmando a ligação dos marcadores His⁺ e β-gl⁺ com a presença do plasmídeo *LEU2* e sendo, portanto, clone verdadeiro. Como controle positivo foi utilizada a linhagem L40 contendo os plasmídeos pBTM-*TIF51A*pACT-*LIA1* (+) ou pBTM-*TIF51A*pACT-*DYS1* (++) A linhagem L40 contendo pBTM-*LIA1*pACT foi utilizada como controle negativo. A utilização dos controles descritos acima pode ser explicada pelo diferente comportamento em meio contendo aminoácidos e no ensaio de β-gl, permitindo, desta forma, uma comparação com o clone identificado no rastreamento. O crescimento do # na presença de 1mM de aminoácidos foi bastante semelhante ao do controle positivo (++) O sequenciamento das

extremidades 5'e 3'do plasmídeo *LEU2* obtido do candidato ~~#~~ levou à identificação do gene *MRS4*, o qual codifica um membro da família de transportadores mitoondriais. Os dados gerados no rastreamento por duplo-híbrido de Lia1 estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7- Rastreamento por duplo-híbrido de Lia1

NÚMERO DE TRANSFORMANTES ANALISADOS				LIGAÇÃO COM O PLASMÍDEO			CLONES SEQUENCIADOS	GENES IDENTIFICADOS
TOTAL	HIS ⁺	CONFIRMADOS HIS ⁺	B-GAL ⁺	TESTADOS	HIS ⁺	B-GAL ⁺		
7,7x10 ⁴	1670	452	35	35	1	1	1	MRS4

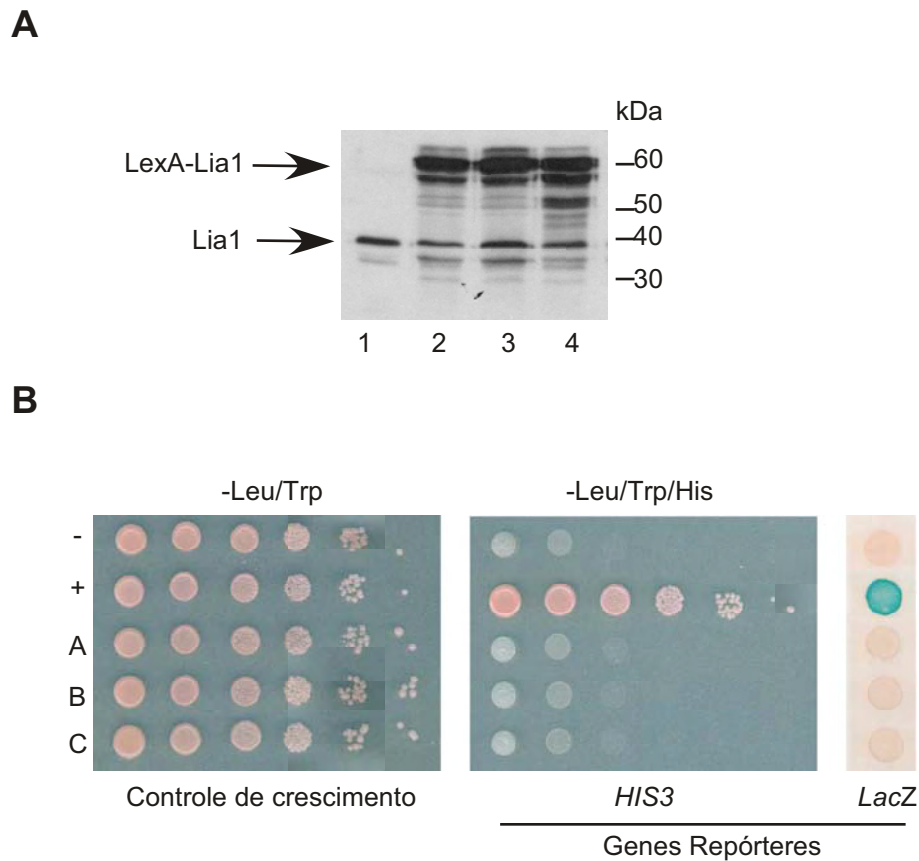


Figura 30- Avaliação da produção da proteína de fusão LexA-Lia1 e teste de auto-ativação dos genes repórteres *HIS3* e *lacZ* pela proteína de fusão. **A:** Lisados da linhagem L40 transformadas com os plasmídeos pBTM116-*LIA1* (canaletas 2 a 4) ou pBTM116 (canaleta 1) foram submetidos a SDS-PAGE 12% e western blot utilizando anticorpo policlonal anti-Lia1 (1:10.000). **B:** As linhagens L40 contendo concomitantemente a construção plasmidial pBTM116-*LIA1* e o vetor plasmidial pACT vazio (transformantes A a C) foram plaqueadas em meio SC -Leu/Trp, SC -Leu/Trp/His e ensaiadas para β -galactosidase em membrana de nitrocelulose. A linhagem L40 contendo pBTM-*TIF51A*+pACT-*DYS1* (+) e L40/pBTM-*LIA1*+pACT (-) foram utilizadas como controles. A proteína de fusão LexA-Lia1, assim como Lia1 endógena, estão indicadas por setas.

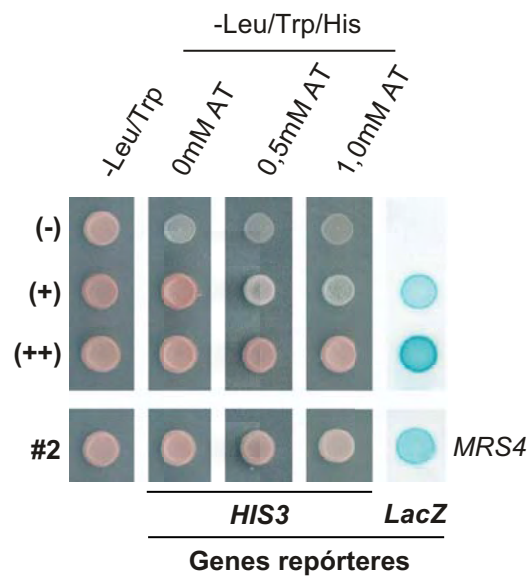


Figura 31- Confirmação da ligação do plasmídeo *LEU2* com os marcadores do sistema de duplo-híbrido His⁺ e β-gal⁺ dos clones verdadeiros revelados no rastreamento de *Lia1* (“plasmid linkage”). Diluições seriadas (1:10) das culturas da linhagem L40 contendo concomitantemente as diferentes construções plasmidiais foram cultivadas nos meios SC -Leu/-Trp, SC -Leu/Trp/His e SC -Leu/Trp/His contendo diferentes concentração de 3-aminotriazol, e ensaiadas para a atividade enzimática de β-galactosidase em membrana de nitrocelulose. As linhagens L40 contendo os plasmídeos pBTM116-*LIA1* + pACT (-), pBTM116-*TIF51A* + pACT-*DYS1* (++) ou pBTM116-*TIF51A* + pACT-*LIA1* (+) foram utilizadas como controles.

4.10- Análise mutacional da proteína eIF5A de humanos em *S. cerevisiae*

4.10.1- Identificação de resíduos de aminoácidos críticos para a atividade da proteína eIF5A humana

Estudos da relação estrutura-função foram realizados utilizando a proteína eIF5A de humanos com o objetivo de investigar as características estruturais de eIF5A requeridas para sua atividade e consequente modificação pós-traducional. A Dra. Park já dispunha em seu laboratório de um grande painel de mutantes da proteína eIF5A humana. Apesar de terem sido gerados anteriormente por outros membros do seu laboratório, os mutantes não haviam sido estudados por completo. Como muitos restavam ser confirmados e caracterizados, a minha contribuição (durante o período do estágio de Doutorado Sanduíche) consistiu no estudo desses alelos já clonados no vetor p414GAL1 (*TRP1*). Desta forma, após sequenciamento e confirmação de todas as mutações, a caracterização de cada mutante foi iniciada.

Inicialmente, a habilidade de cada mutante complementar a linhagem de *S. cerevisiae* nocaute para ambos os genes *TIF51A* e *TIF51B*, HHY13a, foi avaliada em meio de cultura contendo 5-FOA. Como o gene *TIF51A* é essencial em condições aeróbicas, esta linhagem está coberta com o plasmídeo pBM-*TIF51A* (*URA3*). O 5-FOA é uma substância capaz de ser assimilada pela célula e ser metabolizada até a etapa de formação de 2'-deoxi-uridina-trifosfato (dUTP), formando, então, 5-flúor-uracila, que é um potente inibidor da enzima timidilato sintase. Desta forma, a célula que possuir a enzima orotidina-5'-fosfato descarboxilase (Ura3p), necessária para que o 5-FOA torne-se tóxico, não sobreviverá na presença deste composto. Esta situação acontecerá caso o plasmídeo pBM-*TIF51A* seja essencial para a manutenção da viabilidade celular. Por outro lado, leveduras não possuindo o gene *URA3* funcional, e portanto que eliminaram o plasmídeo contendo o gene *URA3*, sobrevivem normalmente na presença de 5-FOA.

Uma vez que a maioria dos mutantes foi capaz de complementar o duplo nocaute, estão sendo mostrados no painel A da Figura 32 apenas os mutantes que revelaram fenótipo de crescimento irregular (K47A, H51A, P74A, L91A e L101A) ou inibição do crescimento celular na ausência de eIF5A selvagem. Somente oito substituições em cinco resíduos (K47D, G49A, K50A, K50I, K50D, K50R, G52A e

K55A) causaram total inativação de eIF5A, como visto pela falta de crescimento na presença de 5-FOA. Interessantemente, todos os resíduos identificados como essenciais para a função de eIF5A estão localizados ao redor do sítio de formação do aminoácido hipusina (K50 na proteína humana). Nenhum outro resíduo avaliado, o qual sofreu substituição para alanina, aboliu a capacidade de eIF5A de garantir a viabilidade celular. Notavelmente, três diferentes substituições no resíduo de lisina 47 resultaram em fenótipos de crescimento distintos: K47R apresentou crescimento similar ao selvagem, K47A, crescimento reduzido, enquanto que nenhum crescimento foi observado com o mutante K47D. As diferenças observadas nas taxas de crescimento celular dos mutantes viáveis em meio contendo 5-FOA foram ainda confirmadas através da obtenção das curvas de crescimento (Figura 32, painel B). A partir de três experimentos independentes, os tempos de duplicação das linhagens produzindo os genes mutados puderam ser estimados em minutos: $234,4 \pm 5,2$ (K47A), $113,8 \pm 10,8$ (K47R), $238,7 \pm 11,3$ (H51A), $144,5 \pm 14,2$ (P74A), $150,1 \pm 12,5$ (L91A), $444,0 \pm 32,6$ (L101A) e $112,3 \pm 6,8$ (WT).

4.10.2- Análise da estabilidade das proteínas eIF5A mutadas

A incapacidade das formas mutadas de eIF5A em garantir o crescimento de células nocauteadas para os genes codificadores de eIF5A pode ser devido à instabilidade das proteínas mutadas. Desta forma, os níveis de ambas as proteínas humana (aqui identificada por heIF5A) e de levedura (identificada por yeIF5A) foram avaliados por western blot antes (Figura 32, painel C, linhagem HHY212d) e depois da seleção em 5-FOA (Figura 32, painel D, linhagem HHY212s), utilizando, para tanto, anticorpos específicos contra eIF5A das duas espécies. Não há reatividade cruzada entre os anticorpos gerados contra a proteína de humano e a de levedura (comparar canaletas 17 e 18 no painel C com as canaletas 8 e 9 no painel D). Como poder ser observado no painel C, as duas proteínas presentes nas linhagens HHY212d foram prontamente detectadas por seus respectivos anticorpos antes da seleção em 5-FOA. Somente os níveis dos mutantes L91A e L101A mostraram-se substancialmente reduzidos no equilíbrio sugerindo a instabilidade destas formas mutadas. Nas linhagens viáveis após a seleção em 5-FOA (painel D), por sua vez, somente as proteínas heIF5A (WT, K47A, K47R, H51A, P74A, L91A e L101A), mas não yeIF5A foram detectadas como esperado. Embora o sinal do mutante L101A

tenha sido mais intenso após a perda de yelF5A (comparar painéis D e C), seu nível foi ainda comparadamente menor que o observado para as outras proteínas helF5A. Desta forma, o fenótipo de crescimento reduzido da linhagem HHY212s carregando o mutante L101A pode ser devido a uma diminuição nos níveis desta proteína assim como de sua atividade. Por outro lado, as taxas reduzidas de crescimento das outras linhagens produzindo os mutantes aparentemente estáveis (K47A, H51A e P74A) sugerem que a atividade destas proteínas mutadas está comprometida.

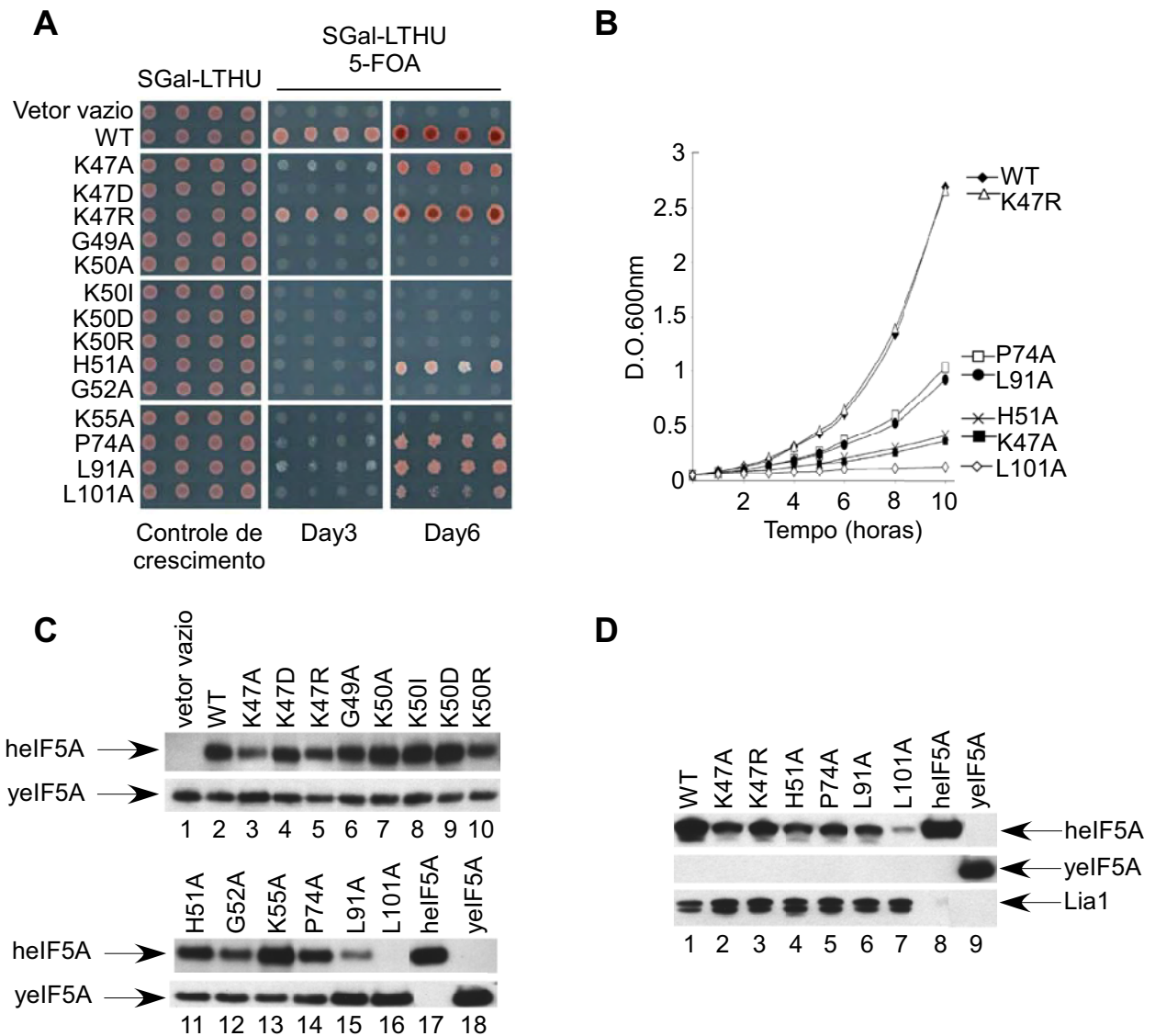


Figura 32- Análise do crescimento de linhagens de *S. cerevisiae* produzindo as proteínas eIF5A humana selvagem e mutadas e estabilidade das proteínas. A: Colônias individuais da linhagem HHY212d, contendo os plasmídeos pBM-*TIF51A* (*URA3*) e p414GAL1 codificando *helF5A*-1 selvagem ou mutada (*TRP1*), foram semeadas em meio mínimo SGal -His/Leu/Trp/Ura contendo 5-FOA. Como controle de crescimento as células foram semeadas em meio mínimo SGal -His/Leu/Trp/Ura. As placas foram fotografadas após incubação a 30 C por dois dias na ausência de 5-FOA (painel esquerdo), ou 3 e 6 dias na presença de 5-FOA (painéis do meio e da direita, respectivamente). **B:** Curvas de crescimento das linhagens HHY212s, resultante da perda do plasmídeo pBM-*TIF51A*, carregando somente as proteínas *helF5A*-1 mutadas em meio YPGal. **C:** Análise por western blot dos níveis das proteínas eIF5A humana e de levedura nas linhagens HHY212d. **D:** Análise por western blot dos níveis das proteínas eIF5A humana e de levedura nas linhagens HHY212s. Proteínas recombinantes purificadas foram utilizadas para mostrar que não ocorre reatividade cruzada entre os anticorpos anti-*helF5A* e anti-*yelF5A*. A proteína Lia1 identificada pelo anticorpo anti-Lia1 foi utilizada no painel D como controle de carregamento.

4.10.3- Análise das proteínas humanas mutadas como substratos para as enzimas desoxihipusina sintase e desoxihipusina hidroxilase

O fato da síntese de hipusina ocorrer somente em eIF5A denota a estreita especificidade de ambas as enzimas modificadoras pelo seu substrato protéico. Uma vez que para garantir o caráter restrito do processo de hipusinação é necessário o reconhecimento de aminoácidos específicos em eIF5A por suas enzimas, as proteínas humanas mutadas foram testadas como substratos para ambas as enzimas DHS e DOHH utilizando, para tanto, um ensaio combinado *in vitro*. Como pelo menos a primeira etapa da síntese de hipusina, a formação de desoxihipusina, é essencial em *S. cerevisiae*, os resultados obtidos nesta análise podem contribuir para o entendimento da incapacidade de certas proteínas mutadas de complementar a linhagem nocaute de eIF5A. Todas as proteínas mutadas foram produzidas em células de *E. coli* da linhagem BL21(DE3). No entanto, os níveis de K50D, L91A e L101A foram bastante reduzidos, provavelmente devido à maior degradação destas proteínas. Após reação dos lisados na presença das enzimas recombinantes e de H³-espermidina, uma radioatividade marcante foi observada nas proteínas WT, K47A, K47D, G49A, H51A, P74A, L91A e L101A (painel A, Figura 33), indicando que estas proteínas atuaram como ótimos substratos para pelo menos a enzima DHS. Desta forma, crescimento reduzido ou ausência de crescimento das linhagens HHY212s carregando esses mutantes não pode ser atribuída à incapacidade desses mutantes de serem modificados. Como esperado, nenhuma marcação radioativa foi observada para os mutantes com substituição na lisina 50, local em que a hipusinação ocorre. Os mutantes G52A e K55A, por sua vez, foram pouco modificados pelas enzimas, como julgado pela fraca marcação radioativa obtida.

Com o intuito de avaliar qual enzima foi capaz de modificar os substratos, a cromatografia de troca iônica foi empregada. Esta técnica permite a distinção entre os aminoácidos desoxihipusina e hipusina, e desta forma, a capacidade das proteínas mutadas atuarem seletivamente como substratos para apenas DHS ou para ambas enzimas. Como pode ser visto no painel B da Figura 33, hipusina radioativa foi formada nos mutantes K47A, K47R, G49A, P74A, L91A e L101A, indicando que estas proteínas atuaram como substrato tanto para DHS quanto para DOHH. Em contraste, somente desoxihipusina radioativa, mas não hipusina, foi

detectada nos mutantes K47D e H51A, sugerindo a importância das cargas básicas provenientes dos aminoácidos Lis47 e His51 para a reação catalisada por DOHH. Embora as enzimas DHS e DOHH sejam totalmente específicas para eIF5A, e provavelmente reconheçam a estrutura adquirida pelas folhas- β no domínio N-terminal de eIF5A, existem diferenças finas entre as duas enzimas em termos de requerimentos específicos em relação à sequência de aminoácidos de seus substratos (Tabela 8), como revelado pelos mutantes K47D e H51A.

Embora a modificação ineficiente dos mutantes G52A e K55A por DHS possa ser parcialmente responsável pela falta de complementação da linhagem nocaute, não se pode excluir que os aminoácidos Gli52 e Lis55 tenham um papel adicional para a atividade desempenhada por eIF5A. Isto pode ser especialmente verdadeiro para Gli52, uma vez que substituição deste resíduo na proteína de levedura para alanina ou aspartato abole totalmente a atividade de eIF5A (Dias *et al.*, manuscrito submetido). Duas outras proteínas, K47D e G49A, falharam em complementar a linhagem nocaute (Figura 32) apesar de terem atuado como substratos efetivos para DHS. Esses dados indicam que Lis47 e Gli49 são requeridos para a atividade de eIF5A independentemente da desoxihipusina/hipusina. P74A, por sua vez, também demonstrou atividade prejudicada (Figura 32), sem aparente perda de estabilidade (painel C, Figura 32) ou de sua modificação por DHS (Figura 33).

Tabela 8- Resumo das características das proteínas eIF5A mutadas de humanos

eIF5A	<u>Substrato para</u>		Crescimento	Síntese protéica
	DHS	DOHH		
WT	+++	+	+	+
K47A	+++	+	Lento	ND
K47D	+++	-	-	-
K47R	+++	+	+	+
G49A	++	+	-	ND
K50A	-	-	-	ND
K50D	-	-	-	ND
K50I	-	-	-	ND
K50R	-	-	-	-
H51A	+++	-	Lento	ND
G52A	+	+	-	ND
K55A	+	+	-	ND
P74A	++	+	Lento	ND
L91A*	++	+	Lento	ND
L101A*	++	+	Lento	ND

*Essas proteínas parecem ser instáveis e seus níveis celulares são baixos.

ND, não determinada

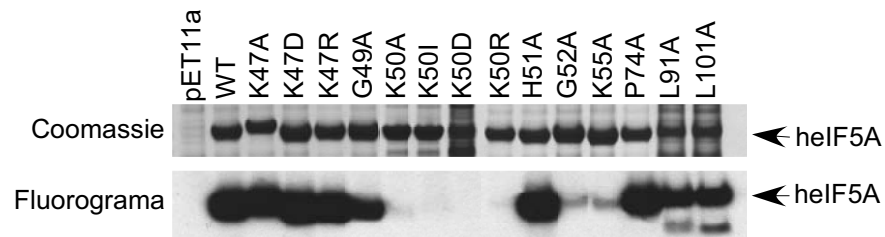
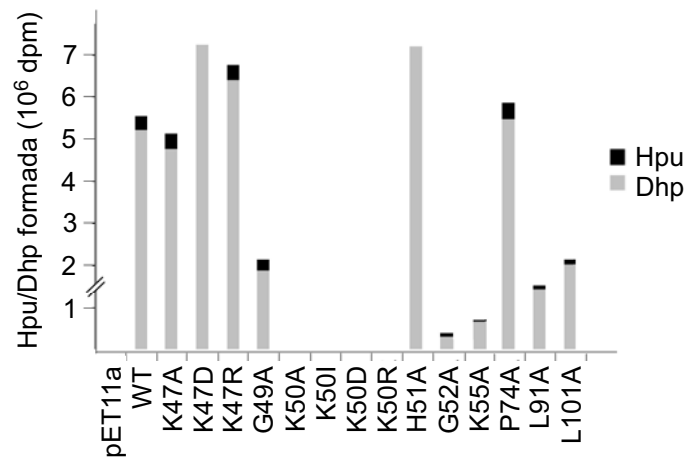
A**B**

Figura 33- Análise das proteínas humanas mutadas como substratos para as enzimas desoxihipusina sintase e desoxihipusina hidroxilase *in vitro*. **A:** Coloração por Coomassie-Blue dos lisados de *E. coli* BL21(DE3) produzindo as proteínas humanas recombinantes selvagem e mutadas (painel superior). Lisados contendo as proteínas recombinantes foram utilizados no ensaio *in vitro* combinado contendo as enzimas DHS e DOHH e espemidina radioativa. Aliquotas de cada mistura reacional foram submetidas à SDS-PAGE. O painel inferior refere-se ao fluorograma do gel mostrando as proteínas heIF5A que incorporaram a radioatividade. **B:** Metade das misturas reacionais foram analisadas para o conteúdo dos aminoácidos desoxihipusina e hipusina presentes nos produtos por cromatografia de troca iônica.

4.10.4- Efeito das deleções nos domínios N- ou C-terminal de eIF5A na estabilidade e atividade da proteína

eIF5A possui a extremidade N-terminal mais extensa e a extremidade C-terminal diferente em relação aos seus homólogos em arqueatéria e EF-P (Hanawa-Suetsugu *et al.*, 2004). Com a finalidade de determinar se as extensões N e C-terminais são funcionalmente significantes, oito formas truncadas de eIF5A foram geradas: $\Delta 2-6$, $\Delta 2-13$, $\Delta 2-21$, $\Delta 2-83$, $\Delta 150-154$, $\Delta 145-154$, $\Delta 135-154$ e $\Delta 84-154$. Novamente, a capacidade destas proteínas de complementar a linhagem de *S. cerevisiae* nocaute para eIF5A foi avaliada. Como pode ser observado no painel A da Figura 34, apenas deleção de seis ou treze aminoácidos da extremidade N-terminal, ou cinco aminoácidos da extremidade C-terminal conferiu crescimento à linhagem HHY212s. As formas truncadas $\Delta 2-6$, $\Delta 2-13$, $\Delta 2-21$, $\Delta 150-154$ e $\Delta 135-154$ foram estavelmente produzidas nas linhagens HHY212d, como detectado por western blot empregando o anticorpo monoclonal gerado contra a porção compreendida entre os aminoácidos 58 e 154 da proteína eIF5A-1 humana (painel B). Três outros peptídeos, o domínio N-terminal ($\Delta 84-154$), o domínio C-terminal ($\Delta 2-83$) e $\Delta 145-154$, por sua vez, não foram detectados no ensaio de western blot. Essas formas truncadas podem não ter sido reconhecidas pelo anticorpo utilizado ou ainda ser instáveis. Desta forma, nenhuma conclusão pode ser feita em relação às suas atividades. Ao contrário das deleções $\Delta 2-6$, $\Delta 2-13$ e $\Delta 150-154$, as duas formas truncadas $\Delta 2-21$ e $\Delta 135-154$ (painéis A e B) não garantiram o crescimento da linhagem HHY212s mesmo sendo estavelmente produzidas e atuando como substratos efetivos para DHS e DOHH. Esses dados fornecem evidência de que ambos os domínios de eIF5A sejam requeridos para a atividade biológica de eIF5A nas células.

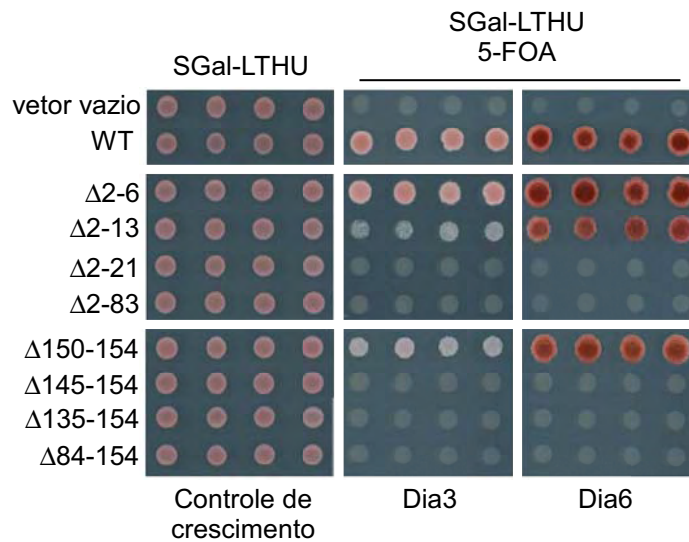
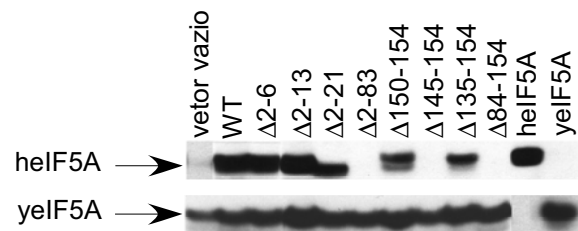
A**B**

Figura 34- Análise das proteínas eIF5A humanas truncadas. **A:** Colônias individuais da linhagem HHY212d, contendo os plasmídeos pBM-*TIF51A* (*URA3*) e p414GAL1 codificando heIF5A-1 selvagem ou suas formas truncadas (*TRP1*), foram semeadas em meio mínimo SGal -His/Leu/Trp/Ura contendo 5-FOA. Como controle de crescimento as células foram semeadas em meio mínimo SGal -His/Leu/Trp/Ura. As placas foram fotografadas após incubação a 30 C por dois dias na ausência de 5-FOA (painel esquerdo), ou 3 e 6 dias na presença de 5-FOA (painéis do meio e da direita, respectivamente). **B:** Análise por western blot dos níveis das proteínas eIF5A humana e de levedura nas linhagens HHY212d.

4.10.5- Efeitos da depleção de eIF5A no crescimento e síntese de DNA, RNA e proteínas em *S. cerevisiae*

A linhagem UBHY-R possuindo a proteína de fusão instável Arg-eIF5A (UBR5A) foi anteriormente gerada para determinar os efeitos da depleção de eIF5A em *S. cerevisiae* (Kang e Hershey, 1994). Após transferência desta linhagem para meio contendo glicose, como YPD, transcrição a partir do promotor de GAL é desligada, levando à rápida degradação e depleção de UBR5A. Como apresentado na Introdução, a depleção de eIF5A em levedura causou somente uma modesta inibição da síntese protéica (Kang e Hershey, 1994). No entanto, esta análise foi realizada em meio mínimo. Quando o mesmo experimento foi realizado em meio rico, uma inibição maior, mas ainda incompleta, da síntese protéica foi observada (Henderson & Hershey, dados não publicados). Diante desses dados, não se pode excluir a possibilidade de que a inibição observada na síntese protéica é secundária a outros efeitos causados pela depleção de eIF5A. Desta forma, os efeitos da depleção de eIF5A no crescimento e na síntese de DNA, RNA e proteínas foram comparados. Os dados estão apresentados na Figura 35. No caso da linhagem selvagem W303-1A, a síntese de todas as macromoléculas testadas aumentou após a transferência para meio contendo glicose, provavelmente devido à utilização mais eficiente da glicose como fonte de energia em comparação à galactose. Em contraste, na linhagem UBHY-R, as taxas de síntese de todas as macromoléculas foram reduzidas após 3 horas de crescimento em meio contendo glicose, consistente com a inibição do crescimento desta linhagem (painel A). Das três macromoléculas testadas, a síntese de proteínas foi consistentemente inibida com 1 hora de transferência para YPD, enquanto que a síntese de DNA não foi afetada e a de RNA até aumentou (provavelmente dirigida pelo efeito da glicose). Com 3 a 4 horas de crescimento em YPD, as taxas de síntese protéica da linhagem UBHY-R foram reduzidas em 70%, enquanto que as taxas de síntese de DNA e RNA corresponderam a 70% e 60% dos valores iniciais, respectivamente. Esses dados sugerem que o efeito primário da depleção de eIF5A reside na síntese protéica e que a redução na síntese protéica leva ao descréscimo na síntese de DNA e RNA e, consequentemente, inibição do crescimento.

Finalmente, as atividades das proteínas selvagem e mutadas no crescimento e na síntese protéica foram testadas. Os dados estão apresentados nos painéis A e

B da Figura 36, respectivamente. A rápida redução nos níveis de UBR5A (painel C) foi acompanhada pela diminuição nas taxas de crescimento (painel A). A taxa de síntese protéica na linhagem UBHY-R foi reduzida em 70% após 5 horas de transferência para meio contendo glicose, enquanto que a mesma aumentou na linhagem selvagem W303-1A. Embora uma inibição maior tenha sido observada na síntese protéica em meio YPD em relação aos dados previamente publicados, uma incorporação basal de leucina radioativa (aproximadamente 30% do controle) foi ainda detectada. Essa inibição incompleta pode ser devido à pequena quantidade da proteína UBR5A ainda detectada após 5 horas de crescimento em YPD (UBHY-R, painel C).

Produção da proteína humana eIF5A selvagem, ou do mutante funcional K47R, garantiu o crescimento da linhagem UBHY-R após a passagem para glicose com taxas aproximadas às obtidas para a linhagem selvagem W303-1A (painel A). Como pode ser observado no painel C, ao contrário da proteína UBR5A (aproximadamente 26kDa), a proteína selvagem humana eIF5A (18kDa), tem uma meia-vida longa e, desta forma, não degrada rapidamente após a passagem para o meio com glicose. Nas linhagens UBHY-R produzindo heIF5A selvagem ou K47R, as taxas de síntese protéica foram mantidas nas 3 primeiras horas e diminuiu apenas modestamente com 5 horas de crescimento em YPD, provavelmente como resultado da diminuição dos níveis das proteínas humanas (painel B). Em contraste, os mutantes inviáveis K47D e K50R não causaram nenhuma melhora no crescimento da linhagem UBHY-R ou na síntese protéica, além dos efeitos já observados para a linhagem UBHY-R possuindo apenas UBR5A. Em conjunto, os dados confirmam um papel essencial de eIF5A na proliferação celular de *S. cerevisiae* e no controle traducional.

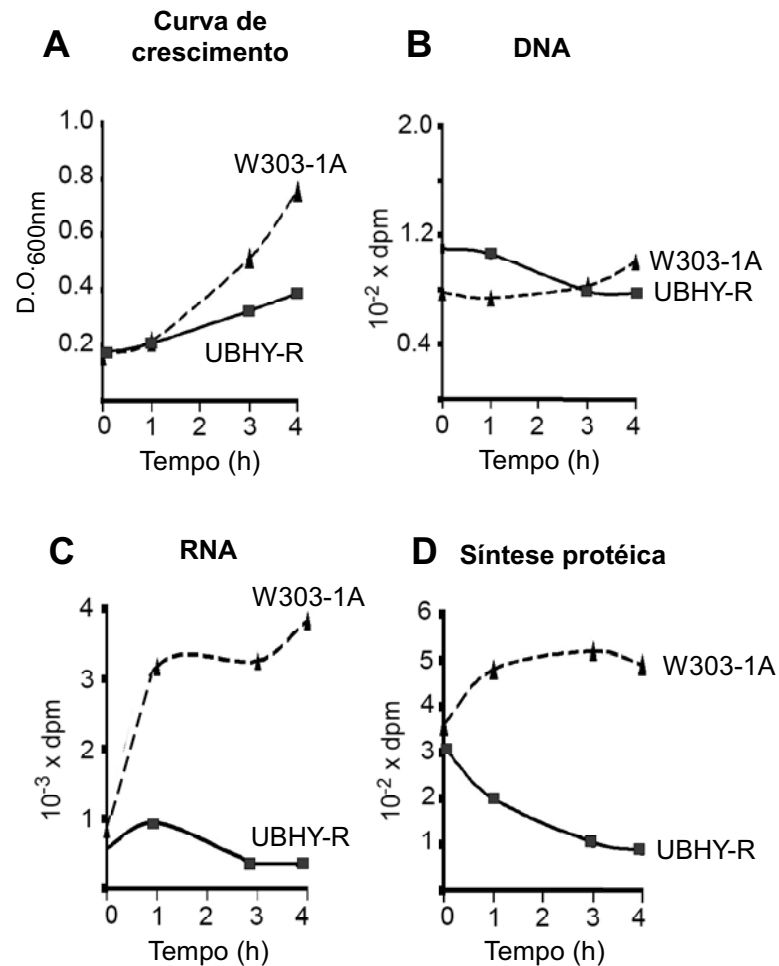


Figura 35- Efeitos da depleção de eIF5A nas taxas de crescimento celular e síntese de macromoléculas (DNA, RNA e proteína). A síntese de macromoléculas foi avaliada em duplicatas utilizando culturas exponenciais das linhagens W303-1A e UBHY-R após transferência das células para meio contendo glicose (YPD). **A:** Curva de crescimento. **B:** Síntese de DNA. **C:** Síntese de RNA. **D:** Ensaio de síntese protéica. A taxa de síntese destas macromoléculas foi calculada como dpm/ g de proteína/20 min, utilizando os valores médios de duplicatas dentro da margem de erro experimental de 10%.

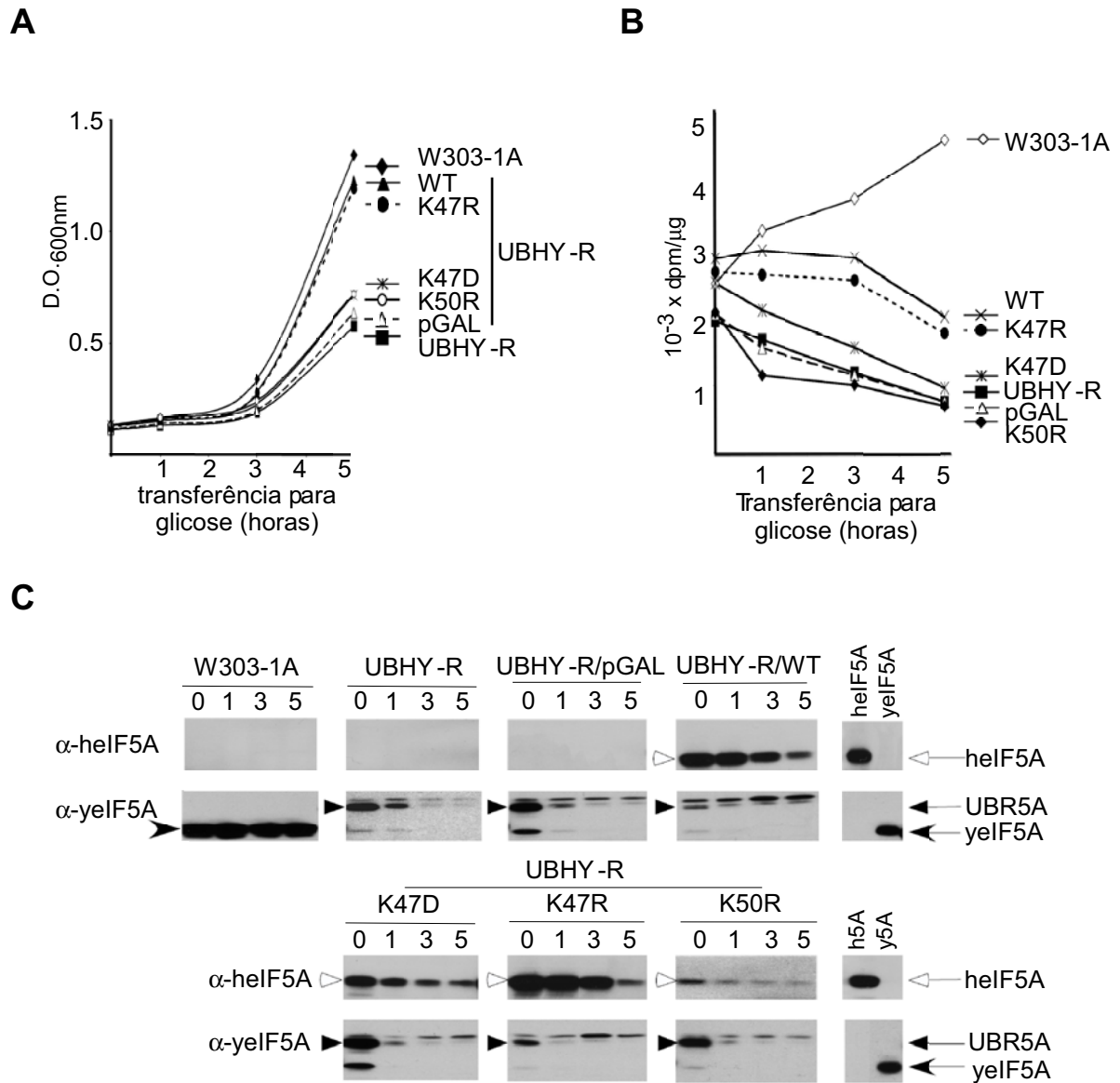


Figura 36- Efeitos da depleção de eIF5A no crescimento celular e síntese de proteínas em *S. cerevisiae*. Os experimentos foram realizados utilizando-se as linhagens W303-1A, UBHY-R e UBHY-R produzindo hIF5A-1 selvagem ou as formas mutadas selecionadas K47A, K47R e K50R. **A:** Curvas de crescimento das linhagens citadas acima. **B:** Ensaio de síntese protéica. Ataxa de síntese protéica foi calculada como dpm/ g de proteína/20 min. **C:** Os níveis das proteínas hIF5A, yIF5A e UBR5A foram analisados por western blot.

5- DISCUSSÃO

5.1- Caracterização funcional da interação física entre eIF5A e suas enzimas modificadoras, Dys1 e Lia1

Através de diferentes estudos, eIF5A foi relacionado com diversas etapas do metabolismo celular (Zanelli e Valentini, 2007). Os fenótipos pleiotrópicos observados para os diferentes mutantes temperatura-sensíveis de eIF5A, sugerem o envolvimento direto ou indireto desta proteína na integridade da parede celular, decaimento de mRNAs, polarização de actina e progressão do ciclo celular. No entanto, apesar de mais de trinta anos de estudo, questões desafiadoras ainda permanecem sem resposta; entre elas, qual o verdadeiro papel biológico exercido por esta proteína e como a modificação pós-traducional ativa eIF5A para que esta proteína possa desempenhar sua função. Dentro desse contexto, a busca por fatores celulares que interagem fisicamente com eIF5A tem sido um objetivo comum perseguido por muitos pesquisadores que estudam esta proteína (Ruhl *et al.*, 1993; Schatz *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1999; Lipowsky *et al.*, 2000; Hofmann *et al.*, 2001; Jao e Chen, 2006; Zanelli *et al.*, 2006).

O nosso laboratório lançou mão de duas técnicas na tentativa de encontrar um parceiro físico de eIF5A. Em uma delas, o ensaio de copurificação seguido de identificação das proteínas por espectrometria de massas revelou essencialmente componentes da maquinaria de síntese protéica, reforçando o envolvimento deste fator na tradução (Zanelli *et al.*, 2006). Por outro lado, como uma segunda estratégia, o rastreamento por duplo-híbrido realizado neste estudo de doutorado, revelou as proteínas Dys1 e Yjr070c, esta última então denominada Lia1 por codificar um ligante de eIF5A (Figura 6). Embora a associação entre eIF5A e Dys1 fosse esperada, esta interação ainda não havia sido descrita em levedura, somente *in vitro* para as proteínas humanas (Lee *et al.*, 1999). Ainda, a confirmação da associação de eIF5A ao novo fator celular Lia1 por copurificação revelou que a interação evidenciada entre estas proteínas por duplo-híbrido era de fato verdadeira (painéis C e D, Figura 8). No entanto, a função exercida por Lia1 permaneceu indeterminada até a recente identificação desta proteína como a enzima desoxihipusina hidroxilase (Park *et al.*, 2006).

É de grande consenso que o resíduo de desoxihipusina ou hipusina deva

servir como local de contato para efetores atuando abaixo de eIF5A. Isto pode ser exemplificado pela ligação entre eIF5A e Lia1, a qual mostrou ser dependente de desoxihipusina, uma vez que Lia1 foi copurificada por GST-eIF5A, mas não por GST-eIF5A^{K51R} (painel D, Figura 8). Ainda, foi demonstrado que a ligação entre eIF5A e eEF2, P0 ou L11 é fortemente dependente de hipusina, pois a interação de eEF2 com o mutante não funcional GST-eIF5A^{K51R} foi totalmente abolida e a de P0 ou L11 foi substancialmente enfraquecida (Zanelli *et al.*, 2006). Como já discutido na Introdução, o mutante K51R não é funcional, pois não sofre hipusinação (Schnier *et al.*, 1991). No entanto, os dados obtidos demonstram que apesar de comprometer a catálise, a substituição do resíduo de lisina a sofrer a modificação para arginina não impede a ligação de Dys1 ao substrato mutado (painel A, Figura 8).

O fato de a hipusinação ocorrer somente em eIF5A denota a estreita especificidade de ambas as enzimas modificadoras pelo seu substrato protéico. Por exemplo, a proteína humana DOHH não é capaz de hidroxilar o aminoácido desoxihipusina na sua forma livre, da mesma forma que este aminoácido livre não é capaz de inibir a hidroxilação de eIF5A (Kang *et al.*, 2007). Similarmente, DHS não modifica o aminoácido lisina livre ou peptídeos curtos cuja sequência de aminoácidos corresponde ao sítio de modificação (Wolff *et al.*, 2007). Estes dados revelam, portanto, a necessidade de reconhecimento de aminoácidos específicos em eIF5A para garantir o caráter restrito do processo de hipusinação. Foi demonstrado para a proteína humana eIF5A que deleção dos resíduos 1-34 ou 71-154 resulta na perda completa da síntese pós-traducional de desoxihipusina (Joe e Park, 1994). No entanto, um domínio mínimo compreendido pelos aminoácidos Phe30-Asp80 foram suficientes para a modificação por DHS, porém em taxas menores comparadas à proteína íntegra. Desta forma, os dados sugerem que Dys1 deve reconhecer elementos estruturais em ambos os domínios de eIF5A para garantir que a catálise enzimática seja eficiente e, desta forma, completa. Isto foi de fato verdadeiro apenas quando a forma truncada de Dys1, Dys1(K29), foi utilizada no mapeamento do sítio de ligação à eIF5A. Esta forma truncada demonstrou a interação mais forte com eIF5A (painel A, Figura 10) e foi capaz de interagir, ainda que em diferentes extensões, com todas as deleções de eIF5A testadas (painel C, Figura 9). Curiosamente, a proteína Dys1(M1), que não apresenta nenhuma deleção, revelou a interação mais fraca com eIF5A (painel A, Figura 10), sendo esta totalmente abolida quando o domínio N-terminal de eIF5A, mas não o domínio C-

terminal, foi utilizado no ensaio (painel C, Figura 10). Além de mostrarem que a interação com Dys1(K29) provavelmente reflete a capacidade total de ligação de eIF5A à sua enzima modificadora, os dados em conjunto sugerem que cada domínio de eIF5A tem um sítio de ligação independente na enzima.

Como apresentado na Introdução, a enzima desoxihipusina sintase catalisa uma sequência complexa de reações envolvendo dois substratos (espermidina e o precursor eIF5A) e um cofator (NAD) (Figura 1). O cristal da proteína humana recombinante complexada com NAD revelou que a enzima existe como um homotetrâmero (painel A, Figura 5). Duas subunidades idênticas complexam-se fortemente resultando em um dímero, no qual dois sítios ativos são formados, um em cada interface. Desta forma, o tetrâmero constituído pela interação entre um par de dímeros contém quatro sítios ativos (Liao *et al.*, 1998). Uma característica marcante desta enzima é a natureza enterrada do sítio ativo, cuja entrada é bloqueada pela extremidade N-terminal de cada subunidade, na qual reside uma pequena α -hélice (painel A, Figura 5). Este dado explica, portanto, a perda de interação de Dys1(M1) com o domínio N-terminal de eIF5A (Figura 10). Uma vez que em Dys1(K29) a α -hélice N-terminal foi deletada, a entrada para o sítio ativo da enzima não mais se apresenta obstruída, permitindo, desta forma, que o domínio N-terminal de eIF5A acesse o sítio ativo. Pelo exposto, os dados obtidos no mapeamento do sítio de ligação de eIF5A a Dys1 demonstram pela primeira vez o mecanismo inibitório da α -hélice N-terminal na ligação do substrato *in vivo*, sugerindo um papel desta estrutura no controle da atividade enzimática. No entanto, é intrigante especular como ocorre o controle do acesso ao sítio ativo dessa enzima. Um impedimento estérico similar é observado na enzima glicogênio fosforilase. Nesta enzima, a entrada do sítio ativo é liberada pela fosforilação de um resíduo de treonina (Lin *et al.*, 1996). Embora a fosforilação de Dys1 por Pkc1 e da enzima humana DHS por Pkc1 e CK2 tenham sido demonstradas (Kang e Chung, 1999; Kang *et al.*, 2002; Kang e Chung, 2003), até o momento, nenhum evento específico de ativação por fosforilação foi descrito para a enzima modificadora de eIF5A.

Em contraste com os dados obtidos com Dys1, a deleção do domínio C-terminal de eIF5A prejudicou completamente a interação com a segunda enzima modificadora da via de biossíntese de hipusina, a hidroxilase Lia1 (painel D, Figura 9). Este dado sugere que eIF5A deve ser ancorado nesta enzima por meio de

aminoácidos presentes no domínio C-terminal, ainda que a modificação ocorra no domínio N-terminal.

Apesar de estudos de inativação gênica terem demonstrado a natureza essencial de eIF5A e Dys1 em levedura (Schnier *et al.*, 1991; Wohl *et al.*, 1993; Sasaki *et al.*, 1996; Park *et al.*, 1998; Valentini *et al.*, 2002), o mesmo não foi observado para *LIA1*, uma vez que a linhagem nocaute para este gene cresce indistinguível da linhagem selvagem (painel A, Figura 11). Este dado indica que a forma contendo desoxihipusina pode realizar a função celular de eIF5A necessária para a sobrevivência de *S. cerevisiae* e explica, portanto, a falta de interação genética, seja por letalidade sintética ou supressão do fenótipo temperatura-sensível, entre *lia1Δ::HIS3* e os mutantes *tif51A-1*, *tif51A-2* e *tif51A-3* (Figura 12). Ainda, como os mutantes condicionais de *TIF51A* demonstram perda de função na temperatura não-permissiva devido à rápida degradação da proteína eIF5A mutada (Valentini *et al.*, 2002) (Dias *et al.*, manuscrito submetido), não adianta superexpressar a enzima se o substrato não está disponível na célula para ser modificado. Baseado em estudos de inibição do crescimento celular por inibidores da enzima desoxihipusina hidroxilase em mamíferos, acreditava-se que a segunda etapa da via de formação da hipusina em eIF5A também fosse essencial. Por esta razão a atividade hidroxilásica de Lia1 não foi investigada quando do encontro desta proteína no rastreamento por duplo-híbrido de eIF5A.

Em contraste com os dados obtidos em levedura, a hidroxilação de eIF5A parece ser funcionalmente mais significativa em *S. pombe*, em que o homólogo *MMD1* foi isolado. Mutações neste gene causam sensibilidade à temperatura e defeito na morfologia e na distribuição de mitocôndria durante a divisão por fissão desta levedura. A proteína Lia1, por sua vez, é capaz de complementar os defeitos ocasionados pela mutação em *MMD1* (Weir e Yaffe, 2004). Adicionalmente, inativação do gene *LIA1* é recessivamente letal em *C. elegans* (Sugimoto, 2004) and *D. melanogaster* (Spradling *et al.*, 1999), um indicativo do requerimento da forma completamente modificada de eIF5A em organismos multicelulares. Finalmente, o bloqueio da etapa de hidroxilação da desoxihipusina em células eucarióticas correlaciona-se com a parada no ciclo celular na transição G1/S (Hanauske-Abel *et al.*, 1994; Hanauske-Abel *et al.*, 1995). Tratamento de células CHO com diferentes quelantes de metal, tais como mimosina (Hanauske-Abel *et al.*, 1994), α,α' -dipiridil (Park *et al.*, 1982) ou hidralazina (Paz *et al.*, 1984), resulta em potente inibição da

enzima desoxihipusina hidroxilase *in vivo*. Nos extratos provenientes de células tratadas com tais compostos, o conteúdo de hipusina foi significativamente diminuído, enquanto que a quantidade de desoxihipusina mostrou-se aumentada. Os dados em conjunto sugerem, portanto, que a etapa final da síntese de hipusina evoluiu gradualmente, tendo atingido sua essencialidade somente em organismos superiores multicelulares (Figura 3).

Interessantemente, ao contrário do que se observa na etapa mediada por Dys1, nenhuma reversão, de eIF5A-hipusina a eIF5A-desoxihipusina, é observada na reação catalisada por DOHH. Aliado a este dado, nenhum complexo foi identificado entre as proteínas humanas em gel nativo, demonstrando que o complexo deve sofrer rápida dissociação assim que eIF5A é modificado (Park, 2006). Desta forma, os dados sugerem que a hidroxilação do resíduo de desoxihipusina em eIF5A é o evento responsável pelo caráter irreversível do processo de hipusinação. A síntese de hipusina é extremamente conservada de levedura a mamífero e, mesmo diante do fato de Lia1 não ser essencial para a viabilidade celular em *S. cerevisiae*, os dados demonstram a conservação das características deste processo ao longo da evolução, importante talvez para uma função específica de eIF5A em eucariotos superiores ou para um mecanismo de regulação dependente da hidroxilação. Entretanto, ainda permanece a possibilidade de existir uma função básica exercida por eIF5A independentemente da hidroxilação do resíduo de desoxihipusina, que seja comum em levedura e humanos.

Os dados gerados na análise da interação física entre eIF5A e suas duas enzimas modificadoras foram reunidos na publicação “Mapping eIF5A binding sites for Dys1 and Lia1: in vivo evidence for regulation of eIF5A hypusination” (Anexo I).

5.2- Análise estrutural e funcional da proteína Lia1

A recente clonagem de *LIA1* como o gene codificador da enzima desoxihipusina hidroxilase culminou na completa identificação das enzimas da via de síntese de hipusina no precursor de eIF5A. No entanto, o mecanismo pelo qual eIF5A contendo desoxihipusina é hidroxilado e a estrutura da enzima responsável por este processo são totalmente desconhecidos. Dentro desse contexto, o conhecimento da estrutura tridimensional de Lia1 é imprescindível não somente para a compreensão do modo como esta proteína interage com o seu substrato, mas

também para a elucidação do mecanismo pelo qual o resíduo de desoxihipusina é prontamente convertido a hipusina. Uma vez que a condição ideal de cristalização de Lia1 não foi encontrada, estudos espectroscópicos foram largamente utilizados na tentativa de avaliar os aspectos estruturais desta proteína.

Durante o curso da análise estrutural de Lia1, o modelo computacional predito para a proteína humana DOHH foi também publicado (painel B, Figura 5) (Park *et al.*, 2006). A estrutura tridimensional modelada revelou a formação de uma díade simétrica, com quatro “HEAT-repeats” em cada um dos domínios N-terminal (“HEATs” 1-4) e C-terminal (“HEATs” 5-8). Estes domínios são conectados por uma alça flexível e formam uma estrutura que se assemelha com uma ferradura. Dois sítios de quelação de metal, compostos por quatro pares dos aminoácidos histidina e glutamato, residem no interior desta estrutura côncava, sendo sugerido que a cavidade formada fosse responsável por acomodar o substrato protéico, isto é, a forma intermediária de eIF5A (Park *et al.*, 2006).

Assim como para a proteína humana, a identificação e separação das formas ligada (holoenzima) e não ligada ao metal (apoenzima) por gel filtração e eletroforese em gel nativo revelou diferenças na estrutura terciária adquirida por Lia1 dependendo da presença ou ausência do metal (painéis A e C, Figura 15). O fato de a apoenzima ser eluída primeiro na cromatografia de exclusão molecular e migrar mais lentamente em gel nativo sugerem um raio hidrodinâmico maior que aquele demonstrado para a holoenzima. Ainda, a presença de uma banda difusa em gel nativo indica uma mistura heterogênea constituída por diferentes conformações da enzima. Neste caso, acredita-se que a apoenzima pode estar apresentando diferentes distâncias entre cada um dos domínios como resultado da flexibilidade permitida pela alça que conecta ambas as metades simétricas da proteína. Como a holoenzima revelou uma banda definida de migração mais rápida que a apoenzima em gel nativo (painel C, Figura 15), provavelmente a ligação do metal no sítio ativo da enzima não somente aproxima, mas também estabiliza os domínios N- e C-terminal em uma estrutura mais compacta e, portanto, com um raio hidrodinâmico menor.

Interessantemente, de acordo com o modelo da proteína humana, o único resíduo de triptofano presente em Lia1 (W155) estaria posicionado na vizinhança da alça flexível (painel B, Figura 5). Por se tratar de uma região de alta mobilidade, a fluorescência do triptofano 155 foi utilizada como um parâmetro importante para

monitorar as alterações que ocorrem na estrutura terciária de Lia1, em especial aquelas induzidas pela dissociação do metal de seus sítios de coordenação.

O valor de $\lambda_{\text{máx}}$ observado após a excitação a 295nm (342nm) e a obtenção de uma constante de Stern-Volmer (K_{SV}) de 2,45 para o “quenching” por acrilamida (Tabela 5) indicam que o resíduo de triptofano está em um local relativamente hidrofóbico e cujo acesso à acrilamida é restrito. O valor obtido para o “quenching” por acrilamida de Lia1 é substancialmente menor que a K_{SV} de 20,8 do composto padrão N-acetiltryptofanamida (N-Ac-Trp-NH₂), o qual mimetiza um resíduo de triptofano exposto ao solvente e que, portanto, apresenta um alto grau de contato com a acrilamida (Kolev e Dolashka-Angelova, 2001). Ainda, um estudo de “quenching” por acrilamida utilizando uma série de proteínas, revelou valores extremos para ambos K_{SV} e $\lambda_{\text{máx}}$ para as proteínas ACTH (13,0 e 352nm) e azurina (0 e 308nm). Neste estudo, foi demonstrado que o triptofano presente na proteína ACTH está muito exposto ao solvente e, portanto, extremamente acessível à acrilamida, uma vez que 57% da sua fluorescência são prontamente apagadas pela utilização de apenas 0,1M de acrilamida. Em outro extremo, nenhum decréscimo na fluorescência da azurina foi detectado à medida que a concentração de acrilamida foi aumentada, revelando que este aminoácido está totalmente enterrado na estrutura desta proteína (Eftink e Ghiron, 1976). Estes dados permitem, portanto, uma comparação com os valores apresentados por Lia1, confirmando que o triptofano está de fato pouco acessível na estrutura tridimensional de Lia1. Desta forma, os resultados estão condizentes com a localização deste resíduo no modelo da proteína humana DOHH (painel B, Figura 5), ou seja, na cavidade delimitada pela aproximação de ambos os domínios pela quelação do metal.

Interessantemente, a utilização de agentes quelantes, como EDTA e EGTA, promoveram um aumento significativo nos valores de K_{sv} (painel A, Figura 25; Tabela 5), revelando o maior acesso da acrilamida ao resíduo de triptofano de Lia1 na presença destes compostos. Diante da capacidade de EDTA e EGTA quelar diferentes metais, o aumento da eficiência do “quenching” pela acrilamida pode estar sendo determinado pela abertura da proteína suficiente para acomodar a acrilamida. Este dado é ainda reforçado pela análise do “quenching” por acrilamida frente a diferentes valores de pH (painel B, Figura 25; Tabela 5), a qual revelou que a acrilamida tem um maior acesso ao triptofano quando a proteína Lia1 encontra-se em baixos pHs (3.0 e 5.5). Nestas condições, a enzima é totalmente inativa e

comporta-se exclusivamente como apoenzima em gel nativo (Figura 21). Adicionalmente, um valor de $\lambda_{\text{máx}}$ de 346nm foi observado após a excitação a 295nm da proteína dialisada contra tampão citrato pH 4,5, demonstrando a maior exposição do triptofano ao solvente aquoso neste pH (dados não mostrados).

Uma vez que os resíduos H79, H112, E113, H237, H270 e E271 estão intimamente envolvidos na coordenação do ferro (Figura 17), os dados sugerem que a alteração no estado de ionização destes aminoácidos, provocada pela alteração do pH, resulte na dissociação do ferro do sítio ativo da enzima. A perda do ferro, por sua vez, parece causar o enfraquecimento de interações intraproteína importantes para aproximar os dois domínios, resultando, portanto, na abertura da cavidade antes delimitada pela proximidade de ambos os domínios.

Para melhor avaliar os raios de giro de ambas as formas ligada e não ligada ao metal, e por vez confirmar as alterações conformacionais observadas, medidas de SAXS foram realizadas (Figura 26). Os dados obtidos revelaram raios de giro maiores quando a proteína foi diferencialmente tratada com agentes quelantes, dialisada em tampão pH 4,5 ou contendo as mutações E113A e H270A. Uma vez que os mutantes E113A e H270A possuem conteúdos reduzidos de ferro, são inativos e caracterizam-se pela presença da apoenzima em gel nativo, os modelos de baixa resolução gerados a partir dos dados de espalhamento confirmam que a proteína Lia1 adquiriu uma conformação mais alongada com a perda do metal, em contraste com a forma mais compacta apresentada pela enzima em pH 7,5 (Figura 27). Os dados obtidos com a proteína em pH 4,5 ainda fortalecem a hipótese da abertura da díade simétrica com a perda do metal, já que nesta condição Lia1 também se apresenta na forma dissociada do metal. Pelo exposto, os dados confirmam que Lia1 adota duas conformações diferentes dependendo da ligação ou dissociação do ferro.

Análises por SAXS de membros do grupo das karioferinas β , proteínas transportadoras nucleocitoplasmáticas também conhecidas por serem constituídas pelas repetições “HEAT”, revelaram que estas proteínas sofrem grandes alterações conformacionais com a ligação de seus cargos ou cofatores (Fukuhara *et al.*, 2004). Por exemplo, associação do cargo IBB ou Ran-GTP na importina- β envolve uma considerável movimentação dos dois domínios da proteína, os quais são aproximados em uma conformação fechada, em contraste com a estrutura

superhelicoidal alongada semelhante a um S aberto adotado no estado não ligado. Interessantemente, Lia1 apresentou uma conformação similar nas condições que levaram à perda do ferro de sua estrutura (Figura 27), sugerindo que essa pode ser a forma adotada pela enzima no seu estado inativo. No entanto, como os dados de SAXS são de baixa resolução, estudos adicionais são necessários para confirmar que a topologia da apoenzima apresenta esta característica.

Uma vez que a proteína é inativa no seu estado livre de metal, os dados em conjunto sugerem que a importância do ferro para a catálise enzimática reside não somente na coordenação do oxigênio molecular para que a reação de hidroxilação ocorra, mas também para a aquisição da conformação ativa da enzima, a qual permite que grupos reativos no sítio ativo sejam posicionados corretamente para garantir a catálise enzimática.

A retirada do metal de seus sítios de coordenação não somente induz alterações conformacionais que tornam a enzima inativa, mas também traz prejuízos para a estabilidade da proteína Lia1, como julgado por CD e fluorescência. Em ambos os processos de desnaturação química e térmica (Figuras 23 e 24, respectivamente), a proteína Lia1 revelou-se mais instável nas condições avaliadas anteriormente, ou seja, valores baixos de pH e após tratamento com agentes quelantes.

Durante o processo de desnaturação, algumas proteínas adotam somente dois estados estruturais: nativo (N) e desnaturado (D). Este mecanismo é denominado unimolecular e corresponde ao simples equilíbrio descrito por $N \leftrightarrow D$. Um exemplo é dado a seguir através do acompanhamento do sinal de CD a 222nm. Em baixas temperaturas em que o estado nativo (N) predomina, a elipticidade da proteína aumenta leve e linearmente com o aumento da temperatura, até que seja atingido o ponto em que toda a população N é rapidamente convertida a D. Isto significa que a transição ocorre dentro de uma estreita faixa de variação nas condições do ambiente. Neste caso, a desnaturação é uma reação cooperativa e a curva gerada resulta em uma sigmóide. É interessante notar que os processos de desnaturação térmica da forma holo de Lia1 (pH 7,5 e pH 9,6, painel B, Figura 24) apesar de se aproximarem de uma sigmóide, não se encaixam perfeitamente a esta curva, sugerindo a presença de espécie(s) intermediária(s) estável(s) na transição entre o estado nativo da proteína e o estado desnaturado. Por outro lado, as curvas geradas na desnaturação química para a holoenzima são muito mais complexas,

confirmando a existência de intermediário(s) estável(s) na via de desnaturação de Lia1 (Figura 23). Interessantemente, diante de valores baixos de pH, os quais sabidamente retiram o metal da estrutura de Lia1, as curvas de transição revelaram um caráter cooperativo (Figura 23 e painel B, Figura 24), refletindo a maior instabilidade da enzima na ausência do metal. Desta forma, a diferença nas curvas de desnaturação obtidas para apoenzima e holoenzima demonstra que as mudanças conformacionais induzidas pelo GdnHCl na holoenzima envolvem uma etapa adicional, por exemplo a abertura da cavidade mantida pelos metais, como discutido anteriormente. No entanto, isto não ocorre com a apoenzima, uma vez que esta provavelmente é a conformação inicialmente adquirida por esta espécie. Desta forma, os dados obtidos podem estar mostrando que a abertura da cavidade formada entre as díades precede a perda da estrutura secundária característica de Lia1. Por fim, uma outra característica do mecanismo unimolecular reside na observação das mesmas transições cooperativas quando se utiliza diferentes sinais. No caso de Lia1 não foi possível sobrepor os sinais gerados pelas diferentes técnicas (painel C, Figura 23). Desta forma, os dados não justificam o mecanismo unimolecular para a desnaturação desta proteína.

Os dados em conjunto fornecem evidência para o importante papel estrutural do ferro, além da sua função essencial para a catálise enzimática. Além de manter a estabilidade da proteína, a reatividade do substrato no sítio ativo é determinada pela arquitetura da proteína, ou seja, uma estrutura globular compacta formada como resultado da quelação do metal.

Interessantemente, um rastreamento por duplo-híbrido utilizando Lia1 como isca revelou a proteína Mrs4 (Figura 31). A maioria das proteínas desta família é integral e funciona no transporte de diversos metabólitos e cofatores entre o citoplasma e a mitocôndria. *MRS4* compartilha alta similaridade com *MRS3* (87%) e ambos os genes foram inicialmente identificados como supressores em alto número de cópias de um defeito no processo de splicing de RNA mitocondrial (Wiesenberger *et al.*, 1991). No entanto, a utilização de microarranjos de DNA para avaliar o perfil de expressão gênica indicou que *MRS4* é co-induzido com diversos genes responsáveis pela importação de ferro em um mutante *AFT2-1^{up}*, sugerindo um papel deste transportador no transporte mitocondrial deste metal (Muhlenhoff *et al.*, 2003). Como discutido acima, a proteína Lia1 apresenta sítios de coordenação de ferro, os quais não somente contribuem para a manutenção de sua estrutura

terciária, como também são essenciais para sua catálise enzimática. Uma vez que a retirada do metal da enzima torna-a inativa e Mrs4 parece fazer parte de um sistema de captação de ferro, esta interação física pode estar representando um possível mecanismo de regulação para a manutenção deste metal na proteína Lia1. No entanto, apesar do rastreamento ter revelado Mrs4 como um possível ligante de Lia1, esta interação física deverá ser confirmada por um segundo método para excluir a possibilidade de um artefato gerado pela técnica de duplo-híbrido.

Os dados gerados na análise estrutural de Lia1 estão sendo reunidos no manuscrito intitulado, “Structural analysis of Lia1 from *S. cerevisiae*: evidences for conformational changes induced by iron displacement from its active site”, o qual se encontra em fase final de redação.

5.3- Análise mutacional da proteína eIF5A de humanos em *S. cerevisiae*

eIF5A é uma proteína singular por vários fatores, mas dentre todos os mencionados, ressalta-se o fato de ser a única proteína na célula a ser ativada pela adição do aminoácido hipusina. No entanto, uma questão importante em aberto até o presente momento é até que ponto a conservação na sequência de aminoácidos e na estrutura tridimensional de eIF5A reflete os requerimentos estruturais necessários para a sua interação com as enzimas modificadoras, desoxihipusina sintase e desoxihipusina hidroxilase, os efetores que atuam abaixo de eIF5A na célula ou ambos. Dentro desse contexto, uma análise mutacional da proteína humana eIF5A-1 foi realizada em *S. cerevisiae* com a finalidade de dissecar os elementos estruturais requeridos para a atividade biológica desta proteína, assim como para sua modificação pós-traducional e, com isto, obter informações a respeito da função desempenhada por esta intrigante proteína. Os dados gerados neste trabalho foram reunidos no artigo publicado recentemente na revista FEBS Journal “Mutational analyses of human eIF5A-1 - Identification of amino acid residues critical for eIF5A activity and hypusine modification” (Anexo II).

Apesar do alto grau de conservação da sequência de aminoácidos de eIF5A, a maioria dos mutantes com substituições únicas para alanina foi totalmente funcional. No entanto, uma série de resíduos de aminoácidos localizados na alça de hipusinação foi revelada como locais críticos para a atividade da proteína eIF5A humana (Figura 4, Tabela 8). Apesar de alguns mutantes não terem sido capazes de

complementar a linhagem nocaute (painel A, Figura 32), todos, com exceção das substituições no resíduo de lisina 50, atuaram, em diferentes extensões, como substratos para DHS (Tabela 8, Figura 33), sugerindo que a conservação dos aminoácidos presentes na alça de hipusinação foi importante em grande parte para a manutenção da atividade exercida por eIF5A na célula, mais possivelmente através da interação com efetores, do que propriamente com suas enzimas modificadoras. No entanto, isto não é totalmente verdadeiro para os mutantes inviáveis G52A e K55A, nos quais a modificação para hipusina demonstrou-se fortemente prejudicada (Figura 33). Interessantemente, uma análise mutacional independente utilizando a proteína eIF5A de levedura, mostrou que o mutante K56A, cujo correspondente em humanos é K55A, atuou como substrato para DHS e complementou a linhagem nocaute para *TIF51A* (Dias *et al.*, manuscrito submetido). No entanto, a linhagem nula carregando este alelo exibiu o fenótipo de sensibilidade a temperatura mesmo diante do fato da proteína K56A ser estável na temperatura não permissiva. Diante do fenótipo temperatura-sensível do mutante K56A de levedura e do fato desta lisina compor o último resíduo da alça de hipusinação, Lis55 provavelmente não está diretamente envolvida na ligação de um efector de eIF5A. Ao invés disto, este resíduo pode estar afetando indiretamente a correta orientação da alça de hipusinação como será discutido adiante.

A perda de função de diversos mutantes pode ser resultado de defeitos em interações físicas estabelecidas com outras proteínas do metabolismo celular, instabilidade e/ou incapacidade de sofrer a modificação por DHS, já que a etapa de hidroxilação não é essencial em levedura. A análise das propriedades das proteínas eIF5A mutadas, as quais foram resumidas na Tabela 8, revela que existem requerimentos específicos em relação à sequência de aminoácidos para a atividade de eIF5A no crescimento celular e para que esta proteína atue como substrato para ambas as suas enzimas modificadoras. Uma vez que todos os mutantes testados no ensaio enzimático *in vitro*, com exceção das substituições na lisina 50, foram substratos, mesmo que em diferentes extensões, para DHS (Figura 33), pode-se afirmar que as substituições únicas para alanina em eIF5A, incluindo as da alça de hipusinação, não prejudicam a sua interação com DHS. No entanto, foi verificado um requerimento mais estridente da sequência de aminoácidos de eIF5A, especialmente ao redor do resíduo de hipusina, para a sua atividade biológica, já que diversos mutantes (K47D, G49A, G52A e K55A) causaram inativação total de eIF5A

(painel A, Figura 32). Deste modo, além do resíduo de desoxihipusina ou hipusina, Lis47, Gli49, Gli52 e Lis55 são vitais para o papel exercido pela proteína humana eIF5A na célula (Figura 32, Tabela 8). Esses resíduos devem ser críticos para a correta orientação do resíduo de desoxihipusina/hipusina ou da alça de hipusinação como um todo. O papel dos resíduos 49 e 52 merece atenção especial em vista da propriedade rígida conferida pela glicina à estrutura do peptídeo. Sendo adjacente ao resíduo de lisina 50, as duas glicinas provavelmente contribuem para a aquisição da estrutura secundária conhecida por “ β -turn” a partir da sequência de aminoácidos – Gli-Dhp/Hpu-His-Gli– presente na alça exposta de eIF5A. Desta forma, esta estrutura estaria contribuindo para a orientação adequada da cadeia lateral da desoxihipusina/hipusina e para a configuração precisa da alça de hipusinação que tende ser uma estrutura flexível. Os dados obtidos são ainda fortalecidos pela análise mutacional da proteína eIF5A de levedura, uma vez que os mutantes correspondentes G50A/D, G53A/D e K56D são inviáveis (Dias *et al.*, manuscrito submetido). Apesar dos mutantes G50A e K56A atuarem fraca e fortemente como substratos para DHS, respectivamente, a substituição de ambos os resíduos para aspartato resultou na inibição completa da síntese de hipusina em eIF5A. Assim, os defeitos observados nos mutantes da alça de hipusinação devem ser influenciados tanto por modificação estrutural da alça de hipusinação quanto por falta de cargas positivas em locais específicos.

A comparação dos três mutantes do resíduo Lis47, K47A, K47D e K47R, forneceu uma sugestão interessante a respeito do papel deste aminoácido. As três proteínas mutadas foram efetivamente modificadas pela desoxihipusina sintase (Figura 33), ainda que tenha diferido substancialmente na habilidade de complementar a linhagem nocaute (painel A, Figura 32). Lis47 foi previamente reportado como resíduo alvo de acetilação (Park 1988; Klier, 1995), uma modificação pós-traducional adicional a ocorrer em eIF5A. Ao contrário do caráter irreversível da hipusinação, a acetilação é reversível. No entanto, não foi mostrado se a atividade de eIF5A é regulada pela acetilação do resíduo 47. Desta forma, Lis47 foi substituída com três aminoácidos diferentes, um ácido, um neutro e outro básico. O fato da atividade de eIF5A ser parcialmente prejudicada pela substituição para alanina e totalmente pela substituição para aspártico, mas não para arginina, sugere que a carga básica de Lis47 seja importante para a atividade da proteína e que eIF5A seja negativamente regulado pela acetilação nas células. Enquanto que a acetilação de

eIF5A não afeta a modificação para desoxihipusina (Park, 1989), a carga básica nesta posição deve ser crítica para o estabelecimento de interação iônica com um parceiro físico.

Ao redor do aminoácido hipusina predominam resíduos básicos e hidrofílicos. Desta forma, é possível que a alça de hipusinação interaja com sequências específicas de nucleotídeos presentes em RNAs, proteínas acídicas ou complexos de ribonucleoproteínas. A estrutura adquirida pelas sucessivas folhas- β no domínio C-terminal de eIF5A é semelhante ao dobramento conhecido por “oligonucleotide binding fold” (Gough *et al.*, 2001), e também foi implicado na ligação a moléculas de RNA (Xu e Chen, 2001; Xu *et al.*, 2004). Ainda, esse domínio C-terminal também contém uma sequência conservada de aminoácidos hidrofóbicos (89-FQLIGIQDGYLSLL-102) considerada um domínio efetor potencial para interações proteína-proteína (Liu *et al.*, 1997). Interessantemente, substituição dos resíduos Leu91 ou Leu101 para alanina causou a redução nas taxas de crescimento (painéis A e B, Figura 32). Analisando a posição de ambos os aminoácidos no modelo da proteína eIF5A humana (Figura 4), Leu91 e Leu101 estão localizados no centro hidrofóbico do barril- β . Substituição para alanina pode facilmente desestabilizar esta estrutura terciária. Com o dobramento prejudicado da proteína, os mutantes são mais susceptíveis à degradação proteolítica. Isto explica o fato desses mutantes apresentarem níveis reduzidos na linhagem de levedura HHY212d e até mesmo na linhagem de bactéria BL21(DE3) utilizada na produção das proteínas recombinantes (painel C, Figura 32 e painel A, Figura 33, respectivamente). O defeito de crescimento do mutante L101A deve em grande parte ser acarretado pela instabilidade da proteína mutada, uma vez que seu nível é drasticamente reduzido (Figura 32). Similarmente, o resíduo L102 da proteína de levedura exibe fenótipo de sensibilidade à temperatura, sendo instável na temperatura não permissiva (Chatterjee *et al.*, 2006).

Apesar de ter sido proposto como fator de início de tradução, o papel de eIF5A nesta etapa do metabolismo de mRNA é um enigma. Apesar de estimular a síntese de metil-puomicina, sua depleção causou uma redução moderada na síntese protéica global (Kang e Hershey, 1994) argumentando contra a sua denominação como fator de tradução. No entanto, dados recentes mostrando a associação de eIF5A com ribossomos ativamente engajados no processo de tradução e a sensibilidade de mutantes condicionais a inibidores da síntese protéica trouxe este

fator de volta ao cenário da tradução (Jao e Chen, 2006; Zanelli *et al.*, 2006). Os dados obtidos utilizando a proteína humana em *S. cerevisiae* demonstram que eIF5A é de fato requerido para a síntese protéica, uma vez que produção da proteína humana funcional (selvagem ou K47R) no nocaute de eIF5A (UBHY-R em YPD) recupera o crescimento celular e a síntese protéica *in vivo* (Figura 36). O fato dos mutantes estáveis da proteína eIF5A de levedura Q22H/L93F e K56A exibirem defeitos na síntese protéica antes que os defeitos no crescimento celular sejam detectados reforçam que a função de eIF5A reside de fato na tradução (Dias *et al.*, manuscrito submetido). Além disso, adição de eIF5A modificado a desoxihipusina a um lisado da linhagem UBHY-R deletado de eIF5A tem um efeito estimulatório na síntese de proteínas *in vitro*, enquanto que com a adição do precursor não modificado o mesmo não é observado (Henderson e Hershey, dados não publicados). Todos esses achados são consistentes com um papel de eIF5A na tradução. Entretanto, uma vez que a inibição da síntese protéica foi incompleta diante da deleção de eIF5A (menor que 10% do nível normal), não está claro se eIF5A é requerido para a síntese protéica global ou para uma tradução mais eficiente e balanceada de um subgrupo de mRNAs. Como será discutido a seguir, uma série de estudos realizados em nosso laboratório vem fortalecendo a hipótese levantada em 1994 por Kang e Hershey, em que eIF5A seria responsável pela tradução de mensageiros envolvidos na progressão do ciclo celular (Kang e Hershey, 1994).

Em um rastreamento de supressores em alto número de cópias do mutante temperatura-sensível *tif51A-1* foram isolados genes envolvidos na polarização do citoesqueleto de actina, um processo essencialmente necessário para a transição G1/S do ciclo celular em levedura (Zanelli e Valentini, 2005). Dentre os supressores, destacaram-se *PKC1*, *GIC1* e *ZDS1*. Foi mostrado que Pkc1-Zds1-Gic1 constitui uma nova via de sinalização atuando abaixo de Pkc1 e, portanto, independente da via de MAP quinases. Essa via passou a conectar Pkc1 diretamente aos fatores de polaridade celular e é responsável pela supressão fenotípica observada. Estes dados são ainda reforçados pelo fato dos mutantes *tif51A-1* e *tif51A-3* apresentarem despolarização dos cabos de actina na temperatura não permissiva e sugerem a participação direta ou indireta de eIF5A com a organização do citoesqueleto de actina. Interessantemente, além de *PKC1*, outros genes supressores de *tif51A-1* (*WSC1*, *WSC2* e *WSC3*) foram relacionados ao correto funcionamento da via secretória (Gustin *et al.*, 1998). O gene essencial *YPT1*, cujo produto está envolvido

na via secretória, participando do transporte vesicular entre o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi, foi, por sua vez, revelado como letal sintético com *TIF51A* (Frigieri *et al.*, 2007). Esse resultado passa então a conectar eIF5A com a via secretória. A transição G1/S do ciclo celular é iniciada após a levedura ter se comprometido com um ciclo completo de divisão celular, e caracteriza-se, entre outros eventos, pelo crescimento polarizado na superfície da célula, isto é, o surgimento do broto. Uma vez que a secreção polarizada é a garantia de que todo o material necessário para o crescimento do broto seja entregue à célula-filha, a via secretória compreende um processo essencial para que a transição G1/S do ciclo celular ocorra.

Outros dados obtidos no presente estudo tornam as interações físicas e/ou genéticas até então evidenciadas muito mais interessantes. O rastreamento por duplo-híbrido utilizando Dys1 como isca revelou, além de Dys1 e eIF5A, a proteína Nis1 como um provável parceiro físico. O gene *NIS1* (Neck protein Interacting with Septins) codifica para uma proteína localizada no núcleo durante os estágios G1/S, e no “bud neck” no estágio G2/M do ciclo celular. Esta proteína está provavelmente envolvida na sinalização do ciclo celular e na formação do broto, já que foram demonstradas interações físicas de Nis1 com várias septinas, entre elas Sep7 (Iwase e Toh-E, 2001). As septinas possuem um papel conservado na citocinese e na formação do septo. Foi postulado que elas seriam responsáveis pelo direcionamento de proteínas envolvidas em diversos processos, dentre eles citocinese, seleção do local de brotamento e deposição de quitina para formação da parede celular (Longtine e Bi, 2003). É interessante notar que um estudo em larga escala para identificação de complexos protéicos por espectrometria de massas, revelou que a proteína Lia1 também interage fisicamente com a septina Sep7 (Ho *et al.*, 2002). Desta forma, Lia1 supostamente interage com Sep7, a qual, por sua vez, interage com Nis1, revelado como parceiro físico de Dys1 por duplo-híbrido. No entanto, resta ainda investigar as interações estabelecidas entre estas proteínas por um outro método para confirmar o envolvimento das enzimas modificadoras de eIF5A nos processos descritos acima.

Uma vez que o citoesqueleto de actina é essencial para o direcionamento de vesículas secretórias contendo o material necessário para o crescimento do broto, os dados obtidos em nosso laboratório sugerem que eIF5A e as proteínas mencionadas, trabalhem juntas na célula para garantir a síntese protéica apropriada

e a secreção das proteínas necessárias para a formação do novo broto durante a fase G1/S em levedura. A associação das enzimas modificadoras de eIF5A com fatores envolvidos na organização do citoesqueleto de actina e sinalização celular levam à possibilidade de que Dys1 e/ou Lia1 sejam importantes para mediar os efeitos de eIF5A nestes processos. No entanto, a relevância de muitas destas interações ainda precisa ser melhor estabelecida

6- CONCLUSÕES

- A proteína Lia1 é um ligante físico de eIF5A.
- A mutação da lisina 51 para arginina não prejudica a ligação de Dys1 a eIF5A.
- A interação de Lia1 a eIF5A é dependente do resíduo de desoxihipusina.
- A ligação de eIF5A à enzima Dys1 é bloqueada pela α -hélice da extremidade N-terminal da enzima modificadora.
- Os domínios N- e C-terminal de eIF5A apresentam sítios distintos de ligação em Dys1.
- O domínio C-terminal de eIF5A interage com Lia1.
- O gene *LIA1* não é essencial em *S. cerevisiae*.
- Os genes *LIA1* e *TIF51A* não são letais sintéticos.
- *LIA1* em alto número de cópias não suprime o fenótipo temperatura-sensível dos mutantes condicionais de *TIF51A*.
- A proteína Lia1 está localizada preferencialmente no citoplasma.
- A proteína Lia1 é uma metaloenzima constituída por ferro.
- A proteína Lia1 recombinante é composta por uma mistura de formas ligadas (holoenzima) e não ligadas ao metal (apoenzima).
- O ferro é essencial para a atividade hidroxilásica de Lia1.
- O sítio de coordenação de ferro de Lia1 é composto pelos resíduos de aminoácidos H79, H112, E113, H237, H270 e E271.
- Os resíduos E113, E116, E238, H270 e E271 de Lia1 são importantes para a ligação do substrato eIF5A-Dhp em Lia1.
- A via de desnaturação da proteína Lia1 não é unimolecular.
- A perda de ferro pela variação no pH ou a presença de agentes quelantes aumenta a instabilidade da proteína.
- A proteína Lia1 adota dois estados conformacionais dependendo da ligação ou dissociação do ferro de seus sítios de coordenação.
- As proteínas Nis1 e Mrs4 são possíveis ligantes de Dys1 e Lia1, respectivamente.
- Além da hipusina, os resíduos de aminoácidos G49, G52, K47 e K55 da proteína eIF5A humana são críticos para a sua atividade.
- A depleção de eIF5A ou a produção de formas mutadas não funcionais leva a uma inibição marcante da síntese protéica.

REFERÊNCIAS

ABBRUZZESE, A.; PARK, M. H.; FOLK, J. E. Deoxyhypusine hydroxylase from rat testis. Partial purification and characterization. **J. Biol. Chem.**, v. 261, n. 7, p. 3085-3089, 1986.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Current protocols in molecular biology**. New York: John Wiley, 2004.

BARTEL, P. L.; FIELDS, S. Analyzing protein-protein interactions using two-hybrid system. **Methods Enzymol.**, v. 254, p. 241-263, 1995.

BARTIG, D.; SCHÜMANN, H.; KLINK, F. The unique posttranslational modification leading to deoxyhypusine or hypusine is a general feature of the archebacterial kingdom. **System. Appl. Microbiol.**, v. 13, p. 112-116, 1990.

BAUDIN, A.; OZIER-KALOGEROPOULOS, O.; DENOUEL, A.; LACROUTE, F.; CULLIN, C. A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nucleic Acids Res.**, v. 21, n. 14, p. 3329-3330, 1993.

BENNE, R.; HERSHEY, J. W. The mechanism of action of protein synthesis initiation factors from rabbit reticulocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 253, n. 9, p. 3078-3087, 1978.

BEVEC, D.; HAUBER, J. Eukaryotic initiation factor 5A activity and HIV-1 Rev function. **Biol. Signals**, v. 6, n. 3, p. 124-133, 1997.

BEVEC, D.; Klier, H.; HOLTER, W.; TSCHACHLER, E.; VALENT, P.; LOTTSPEICH, F.; BAUMRUKER, T.; HAUBER, J. Induced gene expression of the hypusine-containing protein eukaryotic initiation factor 5A in activated human T lymphocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 91, n. 23, p. 10829-10833, 1994.

BEVEC, D.; JAKSCHE, H.; OFT, M.; WOHL, T.; HIMMELSPACH, M.; PACHER, A.; SCHEBESTA, M.; KOETTNITZ, K.; DOBROVNIK, M.; CSONGA, R.; LOTTSPEICH, F.; HAUBER, J. Inhibition of HIV-1 replication in lymphocytes by mutants of the Rev cofactor eIF-5A. **Science**, v. 271, n. 5257, p. 1858-1860, 1996.

BRACHMANN, R. K.; BOEKE, J. D. Tag games in yeast: the two-hybrid system and beyond. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 8, n. 5, p. 561-568, 1997.

CHATTERJEE, I.; GROSS, S. R.; KINZY, T. G.; CHEN, K. Y. Rapid depletion of mutant eukaryotic initiation factor 5A at restrictive temperature reveals connections to actin cytoskeleton and cell cycle progression. **Mol. Genet. Genomics**, v. 275, n. 3, p. 264-276, 2006.

CHEN, K. Y.; LIU, A. Y. Biochemistry and function of hypusine formation on eukaryotic initiation factor 5A. **Biol. Signals**, v. 6, n. 3, p. 105-109, 1997.

CHEN, Z. P.; YAN, Y. P.; DING, Q. J.; KNAPP, S.; POTENZA, J. A.; SCHUGAR, H. J.; CHEN, K. Y. Effects of inhibitors of deoxyhypusine synthase on the differentiation of mouse neuroblastoma and erythroleukemia cells. **Cancer Lett.**, v. 105, n. 2, p. 233-239, 1996.

CLEMENT, P. M.; HENDERSON, C. A.; JENKINS, Z. A.; SMIT-MCBRIDE, Z.; WOLFF, E. C.; HERSHEY, J. W.; PARK, M. H.; JOHANSSON, H. E. Identification and characterization of eukaryotic initiation factor 5A-2. **Eur. J. Biochem.**, v. 270, n. 21, p. 4254-4263, 2003.

COOPER, H. L.; PARK, M. H.; FOLK, J. E.; SAFER, B.; BRAVERMAN, R. Identification of the hypusine-containing protein hy⁺ as translation initiation factor eIF-4D. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 80, n. 7, p. 1854-1857, 1983.

CSONGA, R.; ETTMAYER, P.; AUER, M.; ECKERSKORN, C.; EDER, J.; KLIER, H. Evaluation of the metal ion requirement of the human deoxyhypusine hydroxylase from HeLa cells using a novel enzyme assay. **FEBS Lett.**, v. 380, n. 3, p. 209-214, 1996.

DELOCHE, O.; DE LA CRUZ, J.; KRESSLER, D.; DOERE, M.; LINDER, P. A membrane transport defect leads to a rapid attenuation of translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell**, v. 13, n. 3, p. 357-366, 2004.

EFTINK, M. R.; GHIRON, C. A. Exposure of tryptophanyl residues in proteins. Quantitative determination by fluorescence quenching studies. **Biochemistry**, v. 15, n. 3, p. 672-680, 1976.

ENENKEL, C.; SCHULKE, N.; BLOBEL, G. Expression in yeast of binding regions of karyopherins alpha and beta inhibits nuclear import and cell growth. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 93, n. 23, p. 12986-12991, 1996.

FACCHIANO, A. M.; STIUSO, P.; CHIUSANO, M. L.; CARAGLIA, M.; GIUBERTI, G.; MARRA, M.; ABBRUZZESE, A.; COLONNA, G. Homology modelling of the human eukaryotic initiation factor 5A (eIF-5A). **Protein Eng.**, v. 14, n. 11, p. 881-890, 2001.

FRIGIERI, M. C.; THOMPSON, G. M.; PANDOLFI, J. R.; ZANELLI, C. F.; VALENTINI, S. R. Use of a synthetic lethal screen to identify genes related to TIF51A in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genet. Mol. Res.**, v. 6, n. 1, p. 152-165, 2007.

FUKUHARA, N.; FERNANDEZ, E.; EBERT, J.; CONTI, E.; SVERGUN, D. Conformational variability of nucleocytoplasmic transport factors. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 3, p. 2176-2181, 2004.

GLICK, B. R.; GANOZA, M. C. Identification of a soluble protein that stimulates peptide bond synthesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 72, n. 11, p. 4257-4260, 1975.

GOUGH, J.; KARPLUS, K.; HUGHEY, R.; CHOTHIA, C. Assignment of homology to genome sequences using a library of hidden Markov models that represent all proteins of known structure. **J. Mol. Biol.**, v. 313, n. 4, p. 903-919, 2001.

GROVES, M. R.; HANLON, N.; TUROWSKI, P.; HEMMINGS, B. A.; BARFORD, D. The structure of the protein phosphatase 2A PR65/A subunit reveals the conformation of its 15 tandemly repeated HEAT motifs. **Cell**, v. 96, n. 1, p. 99-110, 1999.

GUAN, X. Y.; SHAM, J. S.; TANG, T. C.; FANG, Y.; HUO, K. K.; YANG, J. M. Isolation of a novel candidate oncogene within a frequently amplified region at 3q26 in ovarian cancer. **Cancer Res.**, v. 61, n. 9, p. 3806-3809, 2001.

GUSTIN, M. C.; ALBERTYN, J.; ALEXANDER, M.; DAVENPORT, K. MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 62, n. 4, p. 1264-1300, 1998.

GUTHRIE, C.; FINK, G. R. **Guide to yeast genetics**. New York: Academic Press, 1991.

HANAUSKE-ABEL, H. M.; PARK, M. H.; HANAUSKE, A. R.; POPOWICZ, A. M.; LALANDE, M.; FOLK, J. E. Inhibition of the G1-S transition of the cell cycle by inhibitors of deoxyhypusine hydroxylation. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1221, n. 2, p. 115-124, 1994.

HANAUSKE-ABEL, H. M.; SLOWINSKA, B.; ZAGULSKA, S.; WILSON, R. C.; STAIANO-COICO, L.; HANAUSKE, A. R.; MCCAFFREY, T.; SZABO, P. Detection of a sub-set of polysomal mRNAs associated with modulation of hypusine formation at the G1-S boundary. Proposal of a role for eIF-5A in onset of DNA replication. **FEBS Lett.**, v. 366, n. 2-3, p. 92-98, 1995.

HANAWA-SUETSUGU, K.; SEKINE, S.; SAKAI, H.; HORI-TAKEMOTO, C.; TERADA, T.; UNZAI, S.; TAME, J. R.; KURAMITSU, S.; SHIROUZU, M.; YOKOYAMA, S. Crystal structure of elongation factor P from *Thermus thermophilus* HB8. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 101, n. 26, p. 9595-9600, 2004.

HENDERSON, B. R.; PERCIPALLE, P. Interactions between HIV Rev and nuclear import and export factors: the Rev nuclear localisation signal mediates specific binding to human importin-beta. **J. Mol. Biol.**, v. 274, n. 5, p. 693-707, 1997.

HO, Y.; GRUHLER, A.; HEILBUT, A.; BADER, G. D.; MOORE, L.; ADAMS, S. L.; MILLAR, A.; TAYLOR, P.; BENNETT, K.; BOUTILIER, K.; YANG, L.; WOLTING, C.; DONALDSON, I.; SCHANDORFF, S.; SHEWNARANE, J.; VO, M.; TAGGART, J.; GOUDREAULT, M.; MUSKAT, B.; ALFARANO, C.; DEWAR, D.; LIN, Z.; MICHALICKOVA, K.; WILLEMS, A. R.; SASSI, H.; NIELSEN, P. A.; RASMUSSEN, K. J.; ANDERSEN, J. R.; JOHANSEN, L. E.; HANSEN, L. H.; JESPERSEN, H.; PODTELEJNIKOV, A.; NIELSEN, E.; CRAWFORD, J.; POULSEN, V.; SORENSEN, B. D.; MATTHIESEN, J.; HENDRICKSON, R. C.; GLEESON, F.; PAWSON, T.; MORAN, M. F.; DUROCHER, D.; MANN, M.; HOGUE, C. W.; FIGEYS, D.; TYERS, M. Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. **Nature**, v. 415, n. 6868, p. 180-183, 2002.

HOFMANN, W.; REICHART, B.; EWALD, A.; MULLER, E.; SCHMITT, I.; STAUBER, R. H.; LOTTSPREICH, F.; JOCKUSCH, B. M.; SCHEER, U.; HAUBER, J.; DABAUVALLE, M. C. Cofactor requirements for nuclear export of Rev response element (RRE)- and constitutive transport element (CTE)-containing retroviral RNAs. An unexpected role for actin. **J. Cell Biol.**, v. 152, n. 5, p. 895-910, 2001.

HUH, W. K.; FALVO, J. V.; GERKE, L. C.; CARROLL, A. S.; HOWSON, R. W.; WEISSMAN, J. S.; O'SHEA, E. K. Global analysis of protein localization in budding yeast. **Nature**, v. 425, n. 6959, p. 686-691, 2003.

IWASE, M.; TOH-E, A. Nis1 encoded by YNL078W: a new neck protein of *Saccharomyces cerevisiae*. **Genes Genet. Syst.**, v. 76, n. 5, p. 335-343, 2001.

JAKUS, J.; WOLFF, E. C.; PARK, M. H.; FOLK, J. E. Features of the spermidine-binding site of deoxyhypusine synthase as derived from inhibition studies. Effective inhibition by bis- and mono-guanylated diamines and polyamines. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n. 18, p. 13151-13159, 1993.

JAO, D. L.; CHEN, K. Y. Tandem affinity purification revealed the hypusine-dependent binding of eukaryotic initiation factor 5A to the translating 80S ribosomal complex. **J. Cell Biochem.**, v. 97, n. 3, p. 583-598, 2006.

JOE, Y. A.; PARK, M. H. Structural features of the eIF-5A precursor required for posttranslational synthesis of deoxyhypusine. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 41, p. 25916-25921, 1994.

JOE, Y. A.; WOLFF, E. C.; LEE, Y. B.; PARK, M. H. Enzyme-substrate intermediate at a specific lysine residue is required for deoxyhypusine synthesis. The role of Lys329 in human deoxyhypusine synthase. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 51, p. 32679-32685, 1997.

KANG, H. A.; HERSHEY, J. W. Effect of initiation factor eIF-5A depletion on protein synthesis and proliferation of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 6, p. 3934-3940, 1994.

KANG, H. A.; SCHWELBERGER, H. G.; HERSHEY, J. W. The two genes encoding protein synthesis initiation factor eIF-5A in *Saccharomyces cerevisiae* are members of a duplicated gene cluster. **Mol. Gen. Genet.**, v. 233, n. 3, p. 487-490, 1992.

KANG, H. A.; SCHWELBERGER, H. G.; HERSHEY, J. W. Translation initiation factor eIF-5A, the hypusine-containing protein, is phosphorylated on serine in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n. 20, p. 14750-14756, 1993.

KANG, K. R.; CHUNG, S. I. Characterization of yeast deoxyhypusine synthase: PKC-dependent phosphorylation in vitro and functional domain identification. **Exp. Mol. Med.**, v. 31, n. 4, p. 210-216, 1999.

KANG, K. R.; CHUNG, S. I. Protein kinase CK2 phosphorylates and interacts with deoxyhypusine synthase in HeLa cells. **Exp. Mol. Med.**, v. 35, n. 6, p. 556-564, 2003.

KANG, K. R.; KIM, Y. S.; WOLFF, E. C.; PARK, M. H. Specificity of the deoxyhypusine hydroxylase-eukaryotic translation initiation factor (eIF5A) interaction: identification of amino acid residues of the enzyme required for binding of its substrate, deoxyhypusine-containing eIF5A. **J. Biol. Chem.**, v. 282, n. 11, p. 8300-8308, 2007.

KANG, K. R.; WOLFF, E. C.; PARK, M. H.; FOLK, J. E.; CHUNG, S. I. Identification of YHR068w in *Saccharomyces cerevisiae* chromosome VIII as a gene for deoxyhypusine synthase. Expression and characterization of the enzyme. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 31, p. 18408-18412, 1995.

KANG, K. R.; KIM, J. S.; CHUNG, S. I.; PARK, M. H.; KIM, Y. W.; LIM, D.; LEE, S. Y. Deoxyhypusine synthase is phosphorylated by protein kinase C in vivo as well as in vitro. **Exp. Mol. Med.**, v. 34, n. 6, p. 489-495, 2002.

KIM, K. K.; HUNG, L. W.; YOKOTA, H.; KIM, R.; KIM, S. H. Crystal structures of eukaryotic translation initiation factor 5A from *Methanococcus jannaschii* at 1.8 Å resolution. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 95, n. 18, p. 10419-10424, 1998.

KIM, Y. S.; KANG, K. R.; WOLFF, E. C.; BELL, J. K.; MCPHIE, P.; PARK, M. H. Deoxyhypusine hydroxylase is a Fe(II)-dependent, HEAT-repeat enzyme. Identification of amino acid residues critical for Fe(II) binding and catalysis [corrected]. **J. Biol. Chem.**, v. 281, n. 19, p. 13217-13225, 2006.

KLIER, H.; WOHL, T.; ECKERSKORN, C.; MAGDOLEN, V.; LOTTSPEICH, F. Determination and mutational analysis of the phosphorylation site in the hypusine-containing protein Hyp2p. **FEBS Lett.**, v. 334, n. 3, p. 360-364, 1993.

KOLEV, K.; DOLASHKA-ANGELOVA, P. Fluorescence studies on native and bound to trifluraline soy bean Lb"α" in the enhanced N₂ fixation. **Spectrochim. Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc.**, v. 57, n. 12, p. 2535-2545, 2001.

LEE, C. H.; UM, P. Y.; PARK, M. H. Structure-function studies of human deoxyhypusine synthase: identification of amino acid residues critical for the binding of spermidine and NAD. **Biochem. J.**, v. 355, pt. 3, p. 841-849, 2001.

LEE, Y. B.; FOLK, J. E. Branched-chain and unsaturated 1,7-diaminoheptane derivatives as deoxyhypusine synthase inhibitors. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 6, n. 3, p. 253-270, 1998.

LEE, Y. B.; JOE, Y. A.; WOLFF, E. C.; DIMITRIADIS, E. K.; PARK, M. H. Complex formation between deoxyhypusine synthase and its protein substrate, the eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) precursor. **Biochem. J.**, v. 340, pt. 1, p. 273-281, 1999.

LIAO, D. I.; WOLFF, E. C.; PARK, M. H.; DAVIES, D. R. Crystal structure of the NAD complex of human deoxyhypusine synthase: an enzyme with a ball-and-chain mechanism for blocking the active site. **Structure**, v. 6, n. 1, p. 23-32, 1998.

LIN, K.; RATH, V. L.; DAI, S. C.; FLETTERICK, R. J.; HWANG, P. K. A protein phosphorylation switch at the conserved allosteric site in GP. **Science**, v. 273, n. 5281, p. 1539-1542, 1996.

LIPOWSKY, G.; BISCHOFF, F. R.; SCHWARZMAIER, P.; KRAFT, R.; KOSTKA, S.; HARTMANN, E.; KUTAY, U.; GORLICH, D. Exportin 4: a mediator of a novel nuclear export pathway in higher eukaryotes. **Embo J.**, v. 19, n. 16, p. 4362-4371, 2000.

LIU, Y. P.; NEMEROFF, M.; YAN, Y. P.; CHEN, K. Y. Interaction of eukaryotic initiation factor 5A with the human immunodeficiency virus type 1 Rev response element RNA and U6 snRNA requires deoxyhypusine or hypusine modification. **Biol. Signals**, v. 6, n. 3, p. 166-174, 1997.

LONGTINE, M. S.; BI, E. Regulation of septin organization and function in yeast. **Trends Cell. Biol.**, v. 13, n. 8, p. 403-409, 2003.

MAGDOLEN, V.; KLIER, H.; WOHL, T.; KLINK, F.; HIRT, H.; HAUBER, J.; LOTTSPREICH, F. The function of the hypusine-containing proteins of yeast and other eukaryotes is well conserved. **Mol. Gen. Genet.**, v. 244, n. 6, p. 646-652, 1994.

MEHTA, K. D.; LEUNG, D.; LEFEBVRE, L.; SMITH, M. The ANB1 locus of *Saccharomyces cerevisiae* encodes the protein synthesis initiation factor eIF-4D. **J. Biol. Chem.**, v. 265, n. 15, p. 8802-8807, 1990.

MUHLENHOFF, U.; STADLER, J. A.; RICHHARDT, N.; SEUBERT, A.; EICKHORST, T.; SCHWEYEN, R. J.; LILL, R.; WIESENBERGER, G. A specific role of the yeast mitochondrial carriers MRS3/4p in mitochondrial iron acquisition under iron-limiting conditions. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 42, p. 40612-40620, 2003.

MURPHEY, R. J.; GERNER, E. W. Hypusine formation in protein by a two-step process in cell lysates. **J. Biol. Chem.**, v. 262, n. 31, p. 15033-15036, 1987.

PARK, J. H.; WOLFF, E. C.; FOLK, J. E.; PARK, M. H. Reversal of the deoxyhypusine synthesis reaction. Generation of spermidine or homospermidine from deoxyhypusine by deoxyhypusine synthase. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 35, p. 32683-32691, 2003.

PARK, J. H.; ARAVIND, L.; WOLFF, E. C.; KAEVEL, J.; KIM, Y. S.; PARK, M. H. Molecular cloning, expression, and structural prediction of deoxyhypusine hydroxylase: a HEAT-repeat-containing metalloenzyme. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 103, n. 1, p. 51-56, 2006.

PARK, M. H. The essential role of hypusine in eukaryotic translation initiation factor 4D (eIF-4D). Purification of eIF-4D and its precursors and comparison of their activities. **J. Biol. Chem.**, v. 264, n. 31, p. 18531-18535, 1989.

PARK, M. H. The post-translational synthesis of a polyamine-derived amino acid, hypusine, in the eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A). **J. Biochem. (Tokyo)**, v. 139, n. 2, p. 161-169, 2006.

PARK, M. H.; COOPER, H. L.; FOLK, J. E. Identification of hypusine, an unusual amino acid, in a protein from human lymphocytes and of spermidine as its biosynthetic precursor. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 78, n. 5, p. 2869-2873, 1981.

PARK, M. H.; COOPER, H. L.; FOLK, J. E. The biosynthesis of protein-bound hypusine (N epsilon -(4-amino-2-hydroxybutyl)lysine). Lysine as the amino acid precursor and the intermediate role of deoxyhypusine (N epsilon -(4-aminobutyl)lysine). **J. Biol. Chem.**, v. 257, n. 12, p. 7217-7222, 1982.

PARK, M. H.; WOLFF, E. C.; FOLK, J. E. Is hypusine essential for eukaryotic cell proliferation? **Trends Biochem. Sci.**, v. 18, n. 12, p. 475-479, 1993a.

PARK, M. H.; WOLFF, E. C.; FOLK, J. E. Hypusine: its post-translational formation in eukaryotic initiation factor 5A and its potential role in cellular regulation. **Biofactors**, v. 4, n. 2, p. 95-104, 1993b.

PARK, M. H.; LEE, Y. B.; JOE, Y. A. Hypusine is essential for eukaryotic cell proliferation. **Biol. Signals**, v. 6, n. 3, p. 115-123, 1997.

PARK, M. H.; JOE, Y. A.; KANG, K. R. Deoxyhypusine synthase activity is essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 3, p. 1677-1683, 1998.

PARK, M. H.; WOLFF, E. C.; LEE, Y. B.; FOLK, J. E. Antiproliferative effects of inhibitors of deoxyhypusine synthase. Inhibition of growth of Chinese hamster ovary cells by guanyl diamines. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 45, p. 27827-27832, 1994.

PARK, M. H.; JOE, Y. A.; KANG, K. R.; LEE, Y. B.; WOLFF, E. C. The polyamine-derived amino acid hypusine: its post-translational formation in eIF5A and its role in cell proliferation. **Amino Acids**, v. 10, p. 109-121, 1996.

PARRISH, J. R.; GULYAS, K. D.; FINLEY, R. L., JR. Yeast two-hybrid contributions to interactome mapping. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 17, n. 4, p. 387-393, 2006.

PARVANOV, K.; IDAKIEVA, K.; TODINOVA, S.; GENOV, N. C-terminal functional unit of *Rapana thomasiana* (marine snail, gastropod) hemocyanin isoform RtH1: isolation and characterization. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1651, n. 1-2, p. 153-162, 2003.

PAZ, M. A.; TORRELIO, B. M.; GALLOP, P. M. Hydralazine inhibition of the post-translational hydroxylation of deoxyhypusine, a polyamine-derived amino acid. **Biochem. Pharmacol.**, v. 33, n. 5, p. 779-785, 1984.

PEAT, T. S.; NEWMAN, J.; WALDO, G. S.; BERENDZEN, J.; TERWILLIGER, T. C. Structure of translation initiation factor 5A from *Pyrobaculum aerophilum* at 1.75 Å resolution. **Structure**, v. 6, n. 9, p. 1207-1214, 1998.

RUHL, M.; HIMMELSPACH, M.; BAHR, G. M.; HAMMERSCHMID, F.; JAKSCHE, H.; WOLFF, B.; ASCHAUER, H.; FARRINGTON, G. K.; PROBST, H.; BEVEC, D. Eukaryotic initiation factor 5A is a cellular target of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain mediating trans-activation. **J. Cell Biol.**, v. 123, n. 6, pt. 1, p. 1309-1320, 1993.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SASAKI, K.; ABID, M. R.; MIYAZAKI, M. Deoxyhypusine synthase gene is essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Lett.**, v. 384, n. 2, p. 151-154, 1996.

SCHATZ, O.; OFT, M.; DASCHER, C.; SCHEBESTA, M.; ROSORIUS, O.; JAKSCHE, H.; DOBROVNIK, M.; BEVEC, D.; HAUBER, J. Interaction of the HIV-1 rev cofactor eukaryotic initiation factor 5A with ribosomal protein L5. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 95, n. 4, p. 1607-1612, 1998.

SCHNIER, J.; SCHWELBERGER, H. G.; SMIT-MCBRIDE, Z.; KANG, H. A.; HERSHEY, J. W. Translation initiation factor 5A and its hypusine modification are essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell Biol.**, v. 11, n. 6, p. 3105-3114, 1991.

SCHRADER, R.; YOUNG, C.; KOZIAN, D.; HOFFMANN, R.; LOTTSPEICH, F. Temperature-sensitive eIF5A mutant accumulates transcripts targeted to the nonsense-mediated decay pathway. **J. Biol. Chem.**, v. 281, n. 46, p. 35336-35346, 2006.

SCHWELBERGER, H. G.; KANG, H. A.; HERSHEY, J. W. Translation initiation factor eIF-5A expressed from either of two yeast genes or from human cDNA. Functional identity under aerobic and anaerobic conditions. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n. 19, p. 14018-14025, 1993.

SHI, X. P.; YIN, K. C.; WAXMAN, L. Effects of inhibitors of RNA and protein synthesis on the subcellular distribution of the eukaryotic translation initiation factor, eIF-5A, and the HIV-1 Rev protein. **Biol. Signals**, v. 6, n. 3, p. 143-149, 1997.

SHI, X. P.; YIN, K. C.; ZIMOLO, Z. A.; STERN, A. M.; WAXMAN, L. The subcellular distribution of eukaryotic translation initiation factor, eIF-5A, in cultured cells. **Exp. Cell Res.**, v. 225, n. 2, p. 348-356, 1996a.

SHI, X. P.; YIN, K. C.; AHERN, J.; DAVIS, L. J.; STERN, A. M.; WAXMAN, L. Effects of N1-guanyl-1,7-diaminoheptane, an inhibitor of deoxyhypusine synthase, on the growth of tumorigenic cell lines in culture. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1310, n. 1, p. 119-126, 1996b.

SHIBA, T.; MIZOTE, H.; KANEKO, T.; NAKAJIMA, T.; KAKIMOTO, Y. Hypusine, a new amino acid occurring in bovine brain. Isolation and structural determination. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 244, n. 3, p. 523-531, 1971.

SINGH, U. S.; LI, Q.; CERIONE, R. Identification of the eukaryotic initiation factor 5A as a retinoic acid-stimulated cellular binding partner for tissue transglutaminase II. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 4, p. 1946-1950, 1998.

SMIT-MCBRIDE, Z.; SCHNIER, J.; KAUFMAN, R. J.; HERSHEY, J. W. Protein synthesis initiation factor eIF-4D. Functional comparison of native and unhypusinated forms of the protein. **J. Biol. Chem.**, v. 264, n. 31, p. 18527-18530, 1989.

SPRADLING, A. C.; STERN, D.; BEATON, A.; RHEM, E. J.; LAVERTY, T.; MOZDEN, N.; MISRA, S.; RUBIN, G. M. The Berkeley Drosophila Genome Project gene disruption project: single P-element insertions mutating 25% of vital Drosophila genes. **Genetics**, v. 153, n. 1, p. 135-177, 1999.

SUGIMOTO, A. High-throughput RNAi in *Caenorhabditis elegans*: genome-wide screens and functional genomics. **Differentiation**, v. 72, n. 2-3, p. 81-91, 2004.

TOME, M. E.; GERNER, E. W. Cellular eukaryotic initiation factor 5A content as a mediator of polyamine effects on growth and apoptosis. **Biol. Signals**, v. 6, n. 3, p. 150-156, 1997.

UMLAND, T. C.; WOLFF, E. C.; PARK, M. H.; DAVIES, D. R. A new crystal structure of deoxyhypusine synthase reveals the configuration of the active enzyme and of an enzyme.NAD.inhibitor ternary complex. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 27, p. 28697-28705, 2004.

VALENTINI, S. R.; CASOLARI, J. M.; OLIVEIRA, C. C.; SILVER, P. A.; MCBRIDE, A. E. Genetic interactions of yeast eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) reveal connections to poly(A)-binding protein and protein kinase C signaling. **Genetics**, v. 160, n. 2, p. 393-405, 2002.

WEIR, B. A.; YAFFE, M. P. Mmd1p, a novel, conserved protein essential for normal mitochondrial morphology and distribution in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. **Mol. Biol. Cell**, v. 15, n. 4, p. 1656-1665, 2004.

WIESENBERGER, G.; LINK, T. A.; VON AHSEN, U.; WALDHERR, M.; SCHWEYEN, R. J. MRS3 and MRS4, two suppressors of mtRNA splicing defects in yeast, are new members of the mitochondrial carrier family. **J. Mol. Biol.**, v. 217, n. 1, p. 23-37, 1991.

WOHL, T.; BAUR, M.; FRIEDL, A. A.; LOTTSPREICH, F. Chromosomal localization of the HYP2-gene in *Saccharomyces cerevisiae* and use of pulsed-field gel electrophoresis for detection of irregular recombination events in gene disruption experiments. **Electrophoresis**, v. 13, n. 9-10, p. 651-653, 1992.

WOHL, T.; KLIER, H.; AMMER, H.; LOTTSPREICH, F.; MAGDOLEN, V. The HYP2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is essential for aerobic growth: characterization of different isoforms of the hypusine-containing protein Hyp2p and analysis of gene disruption mutants. **Mol. Gen. Genet.**, v. 241, n. 3-4, p. 305-311, 1993.

WOLFF, E. C.; FOLK, J. E.; PARK, M. H. Enzyme-substrate intermediate formation at lysine 329 of human deoxyhypusine synthase. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 25, p. 15865-15871, 1997.

WOLFF, E. C.; KANG, K. R.; KIM, Y. S.; PARK, M. H. Posttranslational synthesis of hypusine: evolutionary progression and specificity of the hypusine modification. **Amino Acids**, v. 33, n. 2, p. 341-350, 2007.

XU, A.; CHEN, K. Y. Hypusine is required for a sequence-specific interaction of eukaryotic initiation factor 5A with postsystematic evolution of ligands by exponential enrichment RNA. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 4, p. 2555-2561, 2001.

XU, A.; JAO, D. L.; CHEN, K. Y. Identification of mRNA that binds to eukaryotic initiation factor 5A by affinity co-purification and differential display. **Biochem. J.**, v. 384, pt. 3, p. 585-590, 2004.

YAO, M.; OHSAWA, A.; KIKUKAWA, S.; TANAKA, I.; KIMURA, M. Crystal structure of hyperthermophilic archaeal initiation factor 5A: a homologue of eukaryotic initiation factor 5A (eIF-5A). **J. Biochem. (Tokyo)**, v. 133, n. 1, p. 75-81, 2003.

ZANCHIN, N. I.; GOLDFARB, D. S. Nip7p interacts with Nop8p, an essential nucleolar protein required for 60S ribosome biogenesis, and the exosome subunit Rrp43p. **Mol. Cell Biol.**, v. 19, n. 2, p. 1518-1525, 1999.

ZANELLI, C. F.; VALENTINI, S. R. Pkc1 acts through Zds1 and Gic1 to suppress growth and cell polarity defects of a yeast eIF5A mutant. **Genetics**, v. 171, n. 4, p. 1571-1581, 2005.

ZANELLI, C. F.; VALENTINI, S. R. Is there a role for eIF5A in translation? **Amino Acids**, v. 33, n. 2, p. 351-358, 2007.

ZANELLI, C. F.; MARAGNO, A. L.; GREGIO, A. P.; KOMILI, S.; PANDOLFI, J. R.; MESTRINER, C. A.; LUSTRI, W. R.; VALENTINI, S. R. eIF5A binds to translational machinery components and affects translation in yeast. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 348, n. 4, p. 1358-1366, 2006.

ZITOMER, R. S.; LOWRY, C. V. Regulation of gene expression by oxygen in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol. Rev.**, v. 56, n. 1, p. 1-11, 1992.

ZUK, D.; JACOBSON, A. A single amino acid substitution in yeast eIF-5A results in mRNA stabilization. **Embo J.**, v. 17, n. 10, p. 2914-2925, 1998.

ANEXO I

Mapping eIF5A binding sites for Dys1 and Lia1: in vivo evidence for regulation of eIF5A hypusination

Gloria M. Thompson, Veridiana S.P. Cano, Sandro R. Valentini*

Department of Biological Sciences, School of Pharmacy, São Paulo State University - UNESP, Rodovia Araraquara-Jaú, Km01, Araraquara, SP 14801-902, Brazil

Received 12 September 2003; revised 16 October 2003; accepted 27 October 2003

First published online 18 November 2003

Edited by Lev Kisselev

Abstract The evolutionarily conserved factor eIF5A is the only protein known to undergo hypusination, a unique posttranslational modification triggered by deoxyhypusine synthase (Dys1). Although eIF5A is essential for cell viability, the function of this putative translation initiation factor is still obscure. To identify eIF5A-binding proteins that could clarify its function, we screened a two-hybrid library and identified two eIF-5A partners in *S. cerevisiae*: Dys1 and the protein encoded by the gene *YJR070C*, named Lia1 (Ligand of eIF5A). The interactions were confirmed by GST pulldown. Mapping binding sites for these proteins revealed that both eIF5A domains can bind to Dys1, whereas the C-terminal domain is sufficient to bind Lia1. We demonstrate for the first time in vivo that the N-terminal α -helix of Dys1 can modulate enzyme activity by inhibiting eIF5A interaction. We suggest that this inhibition be abrogated in the cell when hypusinated and functional eIF5A is required.

© 2003 Published by Elsevier B.V. on behalf of the Federation of European Biochemical Societies.

Key words: eIF5A; *DYS1*; *LIA1*; *YJR070C*; Two-hybrid; Hypusination

1. Introduction

The putative translation initiation factor 5A (eIF5A) is an intriguing protein. It was identified 25 years ago and implicated in protein synthesis but while subsequent work has revealed its importance in eukaryotic cells, its function remains unclear. eIF5A is the only protein that contains the essential amino acid hypusine, formed by a posttranslational modification of a specific lysine. Hypusination is a two-step process catalyzed consecutively by deoxyhypusine synthase (Dys1) and deoxyhypusine hydroxylase [1]. eIF5A and Dys1 are highly conserved throughout evolution, being found in all eukaryotic cells and archaea but not in eubacteria [2]. Yeast eIF5A is 63% and 35% identical to the mammalian and archaea proteins respectively. These similarities allow heterologous eIF5A to be functional in yeast [3]. Also, yeast Dys1 is 59% identical to the human protein and 44% to the archaeal homolog.

In *Saccharomyces cerevisiae*, eIF5A is encoded by the essential gene *TIF51A* in aerobic conditions [4]. eIF5A is a small abundant protein that localizes mainly in the cytoplasm [5,6].

The hypusine residue (residue 51 in *S. cerevisiae*) is essential for eIF5A function since the alteration of lysine 51 to arginine (eIF5A^{K51R}) blocks eIF5A hypusination and abolishes protein function in vivo [4]. The eIF5A protein comprises two well-defined domains: the N-terminal domain is folded in a β -roll architecture and the C-terminal domain is organized in a β -barrel structure. The N-terminal domain bears the hypusine residue in an exposed loop [7]. Dys1 is a tetramer of four identical subunits of 43 kDa encoded by the essential gene *DYS1* in *S. cerevisiae* and has a very high affinity for its substrate [8–10].

The importance of eIF5A in the cell is evident because it is essential for cell viability and highly conserved throughout evolution. In addition, the critical role of the hypusine residue is clear because this unique posttranslational modification is absolutely required for protein function in vivo. However, even after almost three decades of study, its function is still obscure. Initially, eIF5A was characterized as a translation initiation factor [11]. Nevertheless, its depletion in yeast resulted in a slight decrease (30%) in protein synthesis, arguing against eIF5A being considered a general translation initiation factor [12]. It was hypothesized that eIF5A might have a role in the translation of a specific subset of mRNAs, for instance those related to the G1/S cell cycle transition. This hypothesis was raised because eIF5A depletion results in an increase of G1-arrested cells [1,12]. Also, hypusine formation is essential for proliferation of mammalian cell lines [13–15]. eIF5A has also been associated with mRNA export acting as a cofactor of Rev, an HIV-1 shuttling protein [16]. However, the nucleocytoplasmic shuttling property of eIF5A has been questioned in a series of protein localization experiments [5]. Moreover, yeast cells deficient in the nuclear export machinery eIF5A localization remains mainly cytoplasmic, whereas Rev is retained in the nucleus [6]. eIF5A also participates in the mRNA decay process since eIF5A mutants accumulate transcripts at the restrictive temperature [6,17]. Thus, eIF5A has been associated with several steps of RNA metabolism but its function remains unclear.

In this study we sought to identify eIF5A-interacting proteins that could help us to understand its role in the cell. As expected, a two-hybrid screen of a cDNA library identified several clones containing *DYS1*. However, we also identified a new eIF5A-interacting factor, the protein encoded by the gene *YJR070C*, which we have called Lia1 (Ligand of eIF5A). We have mapped the eIF5A binding sites for both Lia1 and Dys1. Finally, we have shown that, in vivo, the N-terminal α -helix of Dys1 can regulate the interaction of Dys1 with its substrate eIF5A. This regulation could be under control of

*Corresponding author. Fax: (55)-16-3301-6940.

E-mail address: valentsr@fcfar.unesp.br (S.R. Valentini).

a cellular mechanism triggered to make hypusinated and functional eIF5A available in the cell.

2. Materials and methods

2.1. Plasmid construction

The plasmid expressing the bait protein *lexA-eIF5A* (pSV278, *TRP1*) was constructed as follows: *TIF51A* was PCR amplified and cloned into pBTM116 *Bam*HI site. GST-eIF5A expressing plasmid was achieved by cloning *TIF51A* gene into the vector pPS892 [18]; *TIF51A* was PCR amplified and inserted into pPS892 *Bam*HI–*Sall* sites. For the expression of GST-eIF5A^{K51R} in yeast, a 281 bp *Sall*–*Bst*EII fragment of the plasmid Yep352T-5A(K51R) [4], containing the *TIF51A*^{K51R} allele, was swapped with the corresponding fragment in the plasmid pPS892-*TIF51A* described above. Truncations in eIF5A were constructed as *lexA* fusion proteins using pSV278. The enzyme *Hinc*II was used for the deletion Δ 1–42 (pSV429). The deletion Δ 1–63 (pSV420) was obtained with *Eco*RV. To the deletion Δ 1–90 (pSV421) *Mfe*I was used. The enzymes *Mfe*I and *Alu*I were used for the Δ 90–152 deletion (pSV422). To express GST-Lia1 in yeast (pSV361), *LIA1* was subcloned from pGEX-*LIA1* (pSV356) into pPS892. Plasmid constructions were confirmed by DNA sequencing.

2.2. Two-hybrid screen

A two-hybrid screen was performed in the *S. cerevisiae* L40 strain that carries the *HIS3* and *lacZ* reporter genes [19]. Expression of the bait protein (*lexA-eIF5A*) in L40 was confirmed by western blot using anti-eIF5A. L40/*lexA-eIF5A* was transformed with a yeast cDNA library fused to the *GAL4* activation domain (pACT, *LEU2*, ATCC 87002) and plated on selective medium (–Leu/Trp/His) for candidate selection. The His⁺ clones were further assayed for β -gal activity [20]. *LEU2* cDNA library plasmids from His⁺/ β -gal⁺ transformants were isolated in *E. coli* HB101 strain (LeuB mutation). The *LEU2* plasmid was reintroduced by transformation into L40/*lexA-eIF5A* strain for plasmid linkage. The positive clones (His⁺/ β -gal⁺) had the extremities of their *LEU2* plasmid sequenced and the gene present in each clone was identified using the *S. cerevisiae* Genome Database.

2.3. GST pulldown assay

Plasmids expressing GST-eIF5A, GST-eIF5A^{K51R}, GST-Dys1 and GST-Lia1 were introduced in the wild type strain FY23. The resulting strains were used for GST pulldown. Briefly, cells were grown at 30°C to OD_{600nm} = 0.4 and production of GST fusion proteins was induced with 2% galactose for 3 h. Cells were collected, washed twice in cold PBS and suspended in cold Buffer A (30 mM HEPES, pH 7.5, 100 mM KAc, 2 mM MgAc, 7 mM β -mercaptoethanol, 5 μ g/ml of pepstatin, leupeptin, aprotinin and chymostatin). Cells were broken by vortex agitation with glass beads for 3 min, incubating the tubes on ice bath for 1 min after every 1 min agitation. Cell lysates were clarified by centrifugation at 20000 $\times$ g for 20 min at 4°C, and the total protein concentration was determined. Clarified lysates (2 mg)

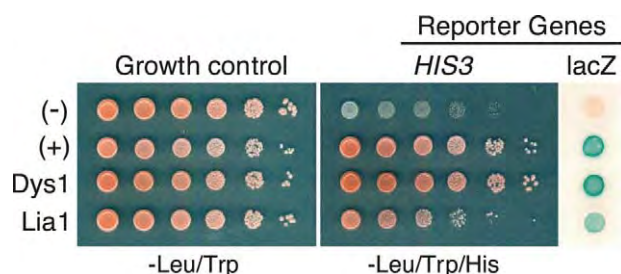


Fig. 1. eIF5A cellular partners revealed by two-hybrid. The strain L40/*lexA-eIF5A* containing pACT (negative control), the positive control L40-41 [21], pACT-Dys1 or pACT-Lia1 were grown on –Leu/Trp to OD_{600nm} = 0.5. Cells were collected by centrifugation and suspended in one tenth of the original volume. Ten-fold serial dilutions of these cell suspensions were spotted (4 μ l) onto –Leu/Trp and –Leu/Trp/His plates and incubated at 30°C for 2 days. For β -gal activity filter assay, 3 μ l of the concentrated cell suspensions were dropped onto a nitrocellulose filter laying on top of a –Leu/Trp plate and incubated 24 h at 30°C before the assay.

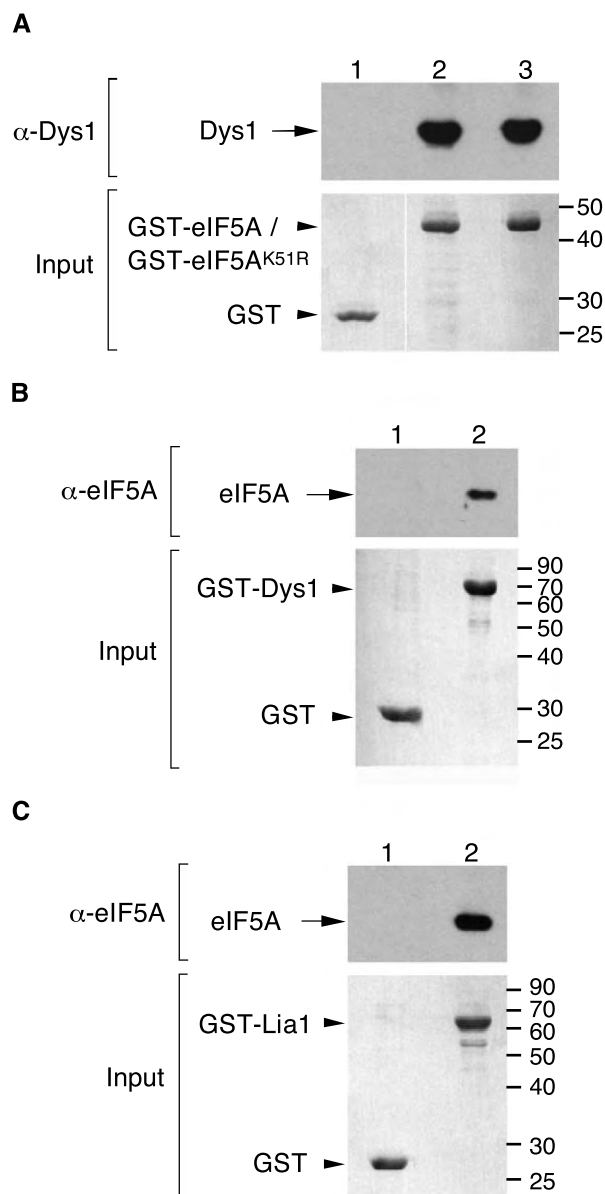


Fig. 2. Confirmation of eIF5A two-hybrid interactions by copurification. Western blot of GST pulldown assays (upper panels) and input of GST or GST fusion proteins (lower panels). A: Copurification of Dys1 with GST-eIF5A (lane 2) and GST-eIF5A^{K51R} (lane 3). B: Copurification of eIF5A with GST-Dys1 (lane 2). C: Copurification of eIF5A with GST-Lia1 (lane 2). GST negative control is shown in lane 1 of all panels. Arrowheads indicate GST or GST fusions and copurified proteins are indicated by arrows.

were incubated with 100 μ l of glutathione-Sepharose beads (50% slurry) for 1 h, at 4°C. Beads were collected, washed five times with cold Buffer A and suspended in 30 μ l of SDS-PAGE loading buffer. Proteins were separated by 12% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membrane, stained with Ponceau-S and documented after rinsing. Finally, proteins were detected by western blot using the polyclonal anti-eIF5A, anti-Dys1 or anti-Lia1 and the ECL system (Amersham).

3. Results and discussion

3.1. Identification of eIF5A cellular partners: Dys1 and Lia1

In an attempt to understand the role of eIF5A in the cell, we searched for proteins that physically interact with eIF5A.

We screened a yeast two-hybrid cDNA library (1.1×10^6 transformants) and 14 positive clones were isolated. *DYS1* was the most frequent gene as it was present in 10 out of the 14 positive clones (Fig. 1). Although this interaction has not been described in *S. cerevisiae*, the physical interaction between eIF5A and Dys1 has been demonstrated in vitro for the human proteins [10]. The remaining four clones (30%) contained the gene *YJR070C*, suggesting that it encodes a specific and significant eIF5A-interacting protein. Here, we named the *YJR070C* gene *LIA1*, because it encodes a protein 'Ligand of eIF5A'. As shown in Fig. 1, the eIF5A interaction with Lia1 is not as intense as with Dys1. Lia1 is a protein of 325 amino acids (36 kDa), not essential for cell viability [22]. Lia1 has a cytoplasmic subcellular localization [23] and contains four to five HEAT-like repeats.

GST pulldown assays were performed to confirm these interactions using wild type yeast cells expressing the fusion proteins GST-eIF5A, GST-eIF5A^{K51R}, GST-Lia1 or GST-Dys1. The fusion proteins were purified by glutathione-Sepharose and the copurified proteins revealed by western blot. GST-eIF5A copurified Dys1 but not GST alone (Fig. 2A). This fusion protein (GST-eIF5A) is functional as it rescues the temperature-sensitive phenotype of an eIF5A mutant (data not shown). In a similar experiment, eIF5A was also copurified with GST-Dys1 protein (Fig. 2B). The copurification of Dys1 with the non-functional isoform eIF5A^{K51R} was as intense as with the wild type protein (Fig. 2A), indicating that this amino acid alteration does not impair eIF5A binding to the modifying enzyme, even though it cannot be hypusinated. GST-Lia1 but not GST alone copurifies eIF5A (Fig. 2C). On the other hand, GST-eIF5A copurifies small

amounts of Lia1, assayed using anti-Lia1 (data not shown); this could be due to the fusion of Lia1 to GST or to the low expression of Lia1 in the cell.

The two-hybrid system is a valuable tool for defining protein function through the establishment of a protein interaction network with other well-known proteins. However, in this study the only protein found in the screen besides the expected Dys1 was the protein Lia1. Even though eIF5A is an essential protein, Lia1 is not required for cell viability. Overexpression of Lia1 does not suppress a temperature-sensitive allele of eIF5A and this allele is not synthetically lethal with a knockout strain of *LIA1* (data not shown). Due to the fact that Lia1 is not a well-characterized protein, further studies will be required to establish the functional relevance of this interaction.

3.2. Mapping eIF5A-binding sites to Dys1 and Lia1

To define which domain of eIF5A is required for the interactions with Dys1 and Lia1, three N-terminal deletions and one deletion of the C-terminal half of eIF5A (Fig. 3A) were created. The truncation sites are indicated in the predicted structure for the human eIF5A (Fig. 3B) [7]. Expression of the truncated lexA-eIF5A proteins, with the expected molecular sizes, was confirmed by western blot using anti-eIF5A (data not shown). The interactions were assayed by the expression of the two-hybrid *HIS3* reporter gene. The interaction of eIF5A with Dys1 was analyzed using one of the strongest interacting clones selected in the screen Dys1(K29) which does not contain the first 28 amino acids of Dys1. Binding of eIF5A to Dys1(K29) was not affected by truncation of either the N- or the C-terminal half (see $\Delta 1-90$ and $\Delta 90-152$, Fig.

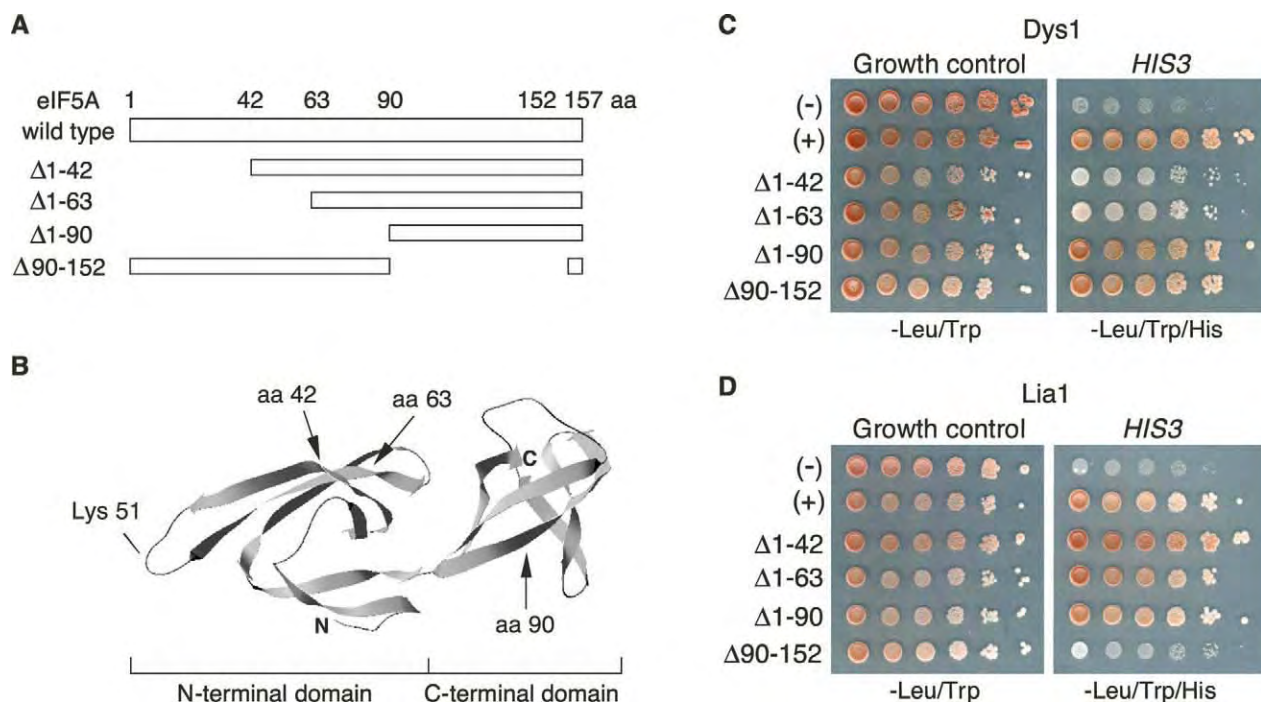


Fig. 3. Determining eIF5A binding sites for Dys1 and Lia1. A: eIF5A truncations scheme. B: Predicted tertiary structure for the human eIF5A [7]. Arrows indicate the position of the corresponding amino acid in the yeast protein and the truncation sites. C: L40 strains expressing vector alone (–), wild type eIF5A (+) or eIF5A truncations ($\Delta 1-42$, $\Delta 1-63$, $\Delta 1-90$ and $\Delta 90-152$) fused to lexA and Dys1 fused to Gal4-activation domain were tested exactly as described in Fig. 1, except that the expression of *HIS3* reporter was observed in selective medium containing 1 mM 3-aminotriazole. D: L40 strains expressing vector alone (–), wild type eIF5A (+) or eIF5A truncations fused to lexA and Lia1 fused to Gal4-activation domain were tested exactly as described in Fig. 1.

3C), suggesting that both domains of eIF5A can interact with Dys1. Thus, although the target site is located in the N-terminal domain, the modifying enzyme interacts with both domains of eIF5A. The truncation of eIF5A residues 1–42 or 1–63 weakens the interaction with Dys1 probably due to a conformational change in eIF5A structure, suggesting that the correct folding of the N-terminal domain of eIF5A is essential for efficient interaction with Dys1. The eIF5A N-terminal domain is sufficient for hypusination by Dys1 with a slight reduction of 24% when compared to hypusination efficiency of the native protein [8]. Although binding to the N-terminal domain is enough to permit hypusination, the interaction with C-terminal domain of eIF5A identified here might be important for the complete enzymatic activity.

The interaction with Lial was mapped to the C-terminal domain of eIF5A (Fig. 3D). None of the N-terminal truncations affected Lial binding to eIF5A. In contrast, the C-terminal deletion ($\Delta 90$ –152) completely abolished the interaction. Although the N-terminal domain suffices for eIF5A hypusination [8], this domain is not functional by itself as it cannot substitute for the native protein in a knockout strain (data not shown). The significance of the eIF5A C-terminal domain for protein function is further highlighted by the fact that temperature-sensitive alleles of eIF5A with amino acid alterations in this domain have a more severe phenotype than alleles altered in the N-terminal domain [6,17]. Hence, the C-terminal domain must have an important role in eIF5A function and Lial might contribute to this function.

3.3. Dys1 N-terminal domain impairs eIF5A binding

During the analysis of the positive clones, we observed that the *DYS1* clones exhibited an irregular growth pattern, varying from very poor to normal growth (data not shown). Sequencing of all 10 *DYS1* cDNAs revealed several 5'-end truncations encoding Dys1 proteins starting at the following residues: aspartate 3 (D3), proline 9 (P9), leucine 12 (L12) and lysine 29 (K29). Interestingly, the protein encoded by a 82 nt deletion (K29) showed the strongest interaction with eIF5A, whereas a deletion of 24 nt (P9) or the entire gene (M1) resulted in a weakened interaction (Fig. 4A). Given that yeast Dys1 is 79% similar to the human protein, we used the crystal structure of the human Dys1 monomer [24] to locate the corresponding residues in these truncated forms of yeast Dys1. As shown in Fig. 4B, the truncated protein Dys1(K29) has the first N-terminal α -helix removed, whereas Dys1(P9) maintains this secondary structure. It was previously determined that the enzyme tetramer is formed by two pairs of tightly associated dimers which contain two active sites located at each dimer interface. The active site is buried inside a cavity and the N-terminal α -helix of a third monomer obstructs the active site entrance [24]. We found that clones containing the entire protein Dys1(M1) or a small truncation of Dys1(P9) have decreased interaction with eIF5A compared to the truncation that lacks the blocking N-terminal α -helix Dys1(K29). Therefore, the Dys1(K29) interaction probably reflects the total binding capacity to eIF5A since the entrance of the active site is uncovered.

Knowing that the N-terminal α -helix of Dys1 blocks eIF5A binding (Fig. 4A) and Dys1(K29) binds to both domains of eIF5A (Fig. 3C), we wondered if the inhibitory N-terminal α -helix interferes in the interaction of Dys1 with both eIF5A domains. To answer this question, we transformed

the L40 strain with the *LEU2* plasmids expressing Dys1(M1) and the *TRP1* plasmids expressing eIF5A $\Delta 1$ –90 or $\Delta 90$ –152 and tested for the expression of the *HIS3* two-hybrid reporter gene. In Fig. 4C, we demonstrated that the interaction of Dys1 with the eIF5A C-terminal domain ($\Delta 1$ –90) is not affected by the presence of the blocking α -helix. However, as expected, the Dys1 interaction with the eIF5A N-terminal domain ($\Delta 90$ –152) is completely abolished in the presence of the blocking α -helix. These results demonstrate that each eIF5A domain has an independent binding site in the enzyme.

Here, we present for the first time in vivo evidence for the inhibitory effect of the Dys1 N-terminal α -helix on the interaction with its substrate eIF5A. This helix seems to modulate eIF5A Lys51 access to the active site [24]. These findings may suggest a mechanism where inactive Dys1 under negative control of the N-terminal α -helix would open the catalytic site only when hypusinated and functional eIF5A is needed in the cell, for instance, during cell cycle transition. Future work will address the question if this mechanism is under control of one of the signal transduction pathways governing cell proliferation.

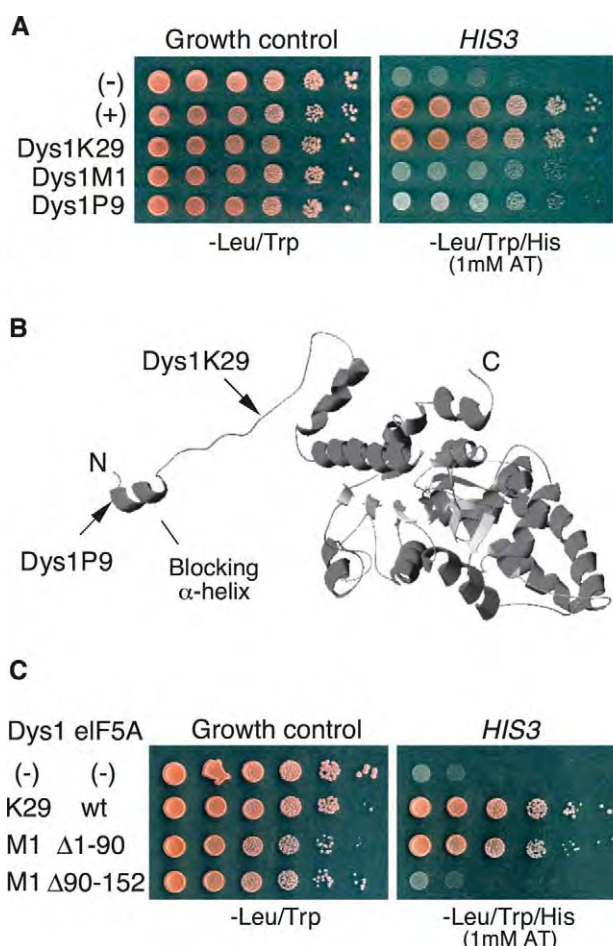


Fig. 4. In vivo inhibitory effect of the N-terminal α -helix on Dys1 interaction to eIF5A. A: Expression of *HIS3* reporter gene as described in Fig. 3C. Dys1(M1)=entire Dys1, Dys1(P9) and Dys1(K29)=truncated forms of Dys1. B: Tertiary structure of human Dys1 [24]. Location of the starting amino acid in the truncated forms of Dys1 is indicated by arrows. C: Interaction of Dys1(M1) to either eIF5A domains: N-terminal ($\Delta 90$ –152) and C-terminal ($\Delta 1$ –90).

Acknowledgements: We thank Dr. Carla Oliveira for two-hybrid reagents and Dr. Nilson Zanchin for the anti-Dys1. We thank Dr. Anne McBride, Dr. Anita Corbett, Dr. Marc Damelin and Cleslei Zanelli for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants to S.R.V. from FAPESP, a post-doctoral fellowship to G.M.T. and a scientific training fellowship to V.S.P.C. both from FAPESP.

References

- [1] Park, M.H., Lee, Y.B. and Joe, Y.A. (1997) *Biol. Signals* 6, 115–1123.
- [2] Chen, K.Y. and Liu, A.Y. (1997) *Biol. Signals* 6, 105–109.
- [3] Magdolen, V., Klier, H., Wohl, T., Klink, F., Hirt, H., Hauber, J. and Lottspeich, F. (1994) *Mol. Gen. Genet.* 244, 646–652.
- [4] Schnier, J., Schwelberger, H.G., Smit-McBride, Z., Kang, H.A. and Hershey, J.W. (1991) *Mol. Cell. Biol.* 11, 3105–3114.
- [5] Shi, X.P., Yin, K.C. and Waxman, L. (1997) *Biol. Signals* 6, 143–149.
- [6] Valentini, S.R., Casolari, J.M., Oliveira, C.C., Silver, P.A. and McBride, A.E. (2002) *Genetics* 160, 393–405.
- [7] Facchiano, A.M., Stiuso, P., Chiusano, M.L., Caraglia, M., Giuberti, G., Marra, M., Abbruzzese, A. and Colonna, G. (2001) *Protein Eng.* 14, 881–890.
- [8] Joe, Y.A. and Park, M.H. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 25916–25921.
- [9] Kang, K.R., Wolff, E.C., Park, M.H., Folk, J.E. and Chung, S.I. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 18408–18412.
- [10] Lee, Y.B., Joe, Y.A., Wolff, E.C., Dimitriadis, E.K. and Park, M.H. (1999) *Biochem. J.* 340, 273–281.
- [11] Park, M.H., Wolff, E.C. and Folk, J.E. (1993) *Biofactors* 4, 95–104.
- [12] Kang, H.A. and Hershey, J.W. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 3934–3940.
- [13] Shi, X.P., Yin, K.C., Ahern, J., Davis, L.J., Stern, A.M. and Waxman, L. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* 1310, 119–126.
- [14] Park, M.H., Wolff, E.C., Lee, Y.B. and Folk, J.E. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 27827–27832.
- [15] Hanauske-Abel, H.M., Park, M.H., Hanauske, A.R., Popowicz, A.M., Lalande, M. and Folk, J.E. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* 1221, 115–124.
- [16] Ruhl, M. et al. (1993) *J. Cell. Biol.* 123, 1309–1320.
- [17] Zuk, D. and Jacobson, A. (1998) *EMBO J.* 17, 2914–2925.
- [18] Koepp, D.M., Wong, D.H., Corbett, A.H. and Silver, P.A. (1996) *J. Cell. Biol.* 133, 1163–1176.
- [19] Hollenberg, S.M., Sternglanz, R., Cheng, P.F. and Weintraub, H. (1995) *Mol. Cell. Biol.* 15, 3813–3822.
- [20] Vojtek, A.B. and Hollenberg, S.M. (1995) *Methods Enzymol.* 255, 331–342.
- [21] Zanchin, N.I.T. and Goldfarb, D.S. (1999) *Mol. Cell. Biol.* 19, 1518–1525.
- [22] Giaever, G. et al. (2002) *Nature* 418, 387–391.
- [23] Kumar, A. et al. (2002) *Genes Dev.* 16, 707–719.
- [24] Liao, D.I., Wolff, E.C., Park, M.H. and Davies, D.R. (1998) *Structure* 6, 23–32.

ANEXO II

Mutational analyses of human eIF5A-1 – identification of amino acid residues critical for eIF5A activity and hypusine modification

Veridiana S. P. Cano^{1,2,*}, Geoung A. Jeon^{1,*†}, Hans E. Johansson³, C. Allen Henderson⁴, Jong-Hwan Park¹, Sandro R. Valentini², John W. B. Hershey⁴ and Myung Hee Park¹

¹ Oral and Pharyngeal Cancer Branch, National Institute of Dental and Craniofacial Research, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA

² Department of Biological Sciences, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University, Brazil

³ Biosearch Technologies Inc., Novato, CA, USA

⁴ Department of Biochemistry and Molecular Medicine, School of Medicine, University of California, Davis, CA, USA

Keywords

deoxyhypusine synthase; eIF5A; hypusine; post-translational modification; translation initiation

Correspondence

M. H. Park, Bldg 30, Room 211, OPCB, NIDCR, NIH, Bethesda, MD 20892-4340, USA

Fax: +1301-402-0823

Tel: +1301-496-5056

E-mail: mhpark@nih.gov

†Present address

Department of Microbiology, Korea University College of Medicine, Seoul, Korea

*These authors contributed equally to this work

(Received 11 July 2007, revised 5 October 2007, accepted 30 October 2007)

doi:10.1111/j.1742-4658.2007.06172.x

The eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) is the only protein that contains hypusine [*N*^ε-(4-amino-2-hydroxybutyl)lysine], which is required for its activity. Hypusine is formed by post-translational modification of one specific lysine (Lys50 for human eIF5A) by deoxyhypusine synthase and deoxyhypusine hydroxylase. To investigate the features of eIF5A required for its activity, we generated 49 mutations in human eIF5A-1, with a single amino acid substitution at the highly conserved residues or with N-terminal or C-terminal truncations, and tested mutant proteins in complementing the growth of a *Saccharomyces cerevisiae* eIF5A null strain. Growth-supporting activity was abolished in only a few mutant eIF5As (K47D, G49A, K50A, K50D, K50I, K50R, G52A and K55A), with substitutions at or near the hypusine modification site or with truncation of 21 amino acids from either the N-terminus or C-terminus. The inactivity of the Lys50 substitution proteins is obviously due to lack of deoxyhypusine modification. In contrast, K47D and G49A were effective substrates for deoxyhypusine synthase, yet failed to support growth, suggesting critical roles of Lys47 and Gly49 in eIF5A activity, possibly in its interaction with effector(s). By use of a UBHY-R strain harboring genetically engineered unstable eIF5A, we present evidence for the primary function of eIF5A in protein synthesis. When selected eIF5A mutant proteins were tested for their activity in protein synthesis, a close correlation was observed between their ability to enhance protein synthesis and growth, lending further support for a central role of eIF5A in translation.

Eukaryotic initiation factor 5A (eIF5A) is a putative translation initiation factor and is the only cellular protein that contains the unique modified Lys, hypusine [*N*^ε-(4-amino-2-hydroxybutyl)lysine] [1]. Hypusine

is formed post-translationally at one specific Lys residue of the eIF5A precursor in two consecutive enzymatic reactions [2,3]. The first enzyme, deoxyhypusine synthase (DHS) [4,5], catalyzes the transfer of the

Abbreviations

5-FOA, 5-fluoroorotic acid; aIF5A, archaeal initiation factor 5A; DHS, deoxyhypusine synthase; DOHH, deoxyhypusine hydroxylase; EF-P, elongation factor P; eIF5A, eukaryotic initiation factor 5A; eIF5A-1, major isoform of eukaryotic initiation factor 5A; hIF5A, human eukaryotic initiation factor 5A; SGal, synthetic minimal medium containing galactose; UBR5A, arginine-fusion yeast eukaryotic initiation factor 5A; YPD, rich medium containing glucose; YPGal, rich medium containing galactose.

aminobutyl moiety from the polyamine spermidine to form an intermediate, deoxyhypusine [N^{ϵ} -(4-amino-butyl)lysine] residue, which in turn is hydroxylated by deoxyhypusine hydroxylase (DOHH) [6,7]. The absolute requirement for the eIF5A protein and its post-translational modification was established from gene disruption studies in *Saccharomyces cerevisiae*, in which inactivation of the eIF5A genes (*TIF51A* and *TIF51B*) [8,9] or of the deoxyhypusine synthase gene [10,11] caused loss of viability. Additional evidence in support of the essential nature of hypusine and eIF5A in eukaryotic and mammalian cell proliferation has been reported from several laboratories [2,12–17].

eIF5A is a small acidic protein, highly conserved from yeast to mammals. There are homologs in archaea [archaeal initiation factor 5A (aIF5A)] and bacteria [elongation factor P (EF-P)] that share significant sequence identity and structural similarity with eIF5A [18]. The hypusine modification has evolved in eukaryotes, as hypusine modification does not occur in bacteria, and only DHS but no DOHH homologous genes have been identified in archaea [6]. The structural model of the major human isoform of eIF5A (eIF5A-1) (Protein Data Bank 1FH4) [19,20], based on secondary structure analysis and the structures of the archaeal proteins [21–23], consists of two domains, a basic N-terminal domain and an acidic C-terminal domain, connected by a hinge (Fig. 1). The C-terminal domain resembles an oligonucleotide-binding fold of the *Escherichia coli* cold shock protein CspA and has

been implicated in RNA binding. The Lys that undergoes hypusine modification is located at the tip of an exposed loop (Fig. 1, amino acids 46–54) in the N-terminal domain. The amino acid sequence surrounding this modification site (STSKTGK50HGHAK) is very basic and hydrophilic. Addition of the 4-amino-2-hydroxybutyl moiety to the ϵ -amino group of Lys50 creates a long, basic side chain in this loop. The strict conservation of the hypusine loop sequence suggests that it, together with the hypusine residue, serves an essential basic function that has been preserved throughout eukaryotic evolution.

Despite the essential nature of eIF5A in eukaryotic cell proliferation [2,12–17], the precise cellular function of eIF5A has remained obscure for decades. eIF5A was initially isolated from the high-salt washes of reticulocyte lysate ribosomes with other initiation factors [24]. eIF5A stimulates methionyl-puromycin synthesis, a model assay for translation initiation. The requirement for deoxyhypusine/hypusine in this assay is remarkably stringent [25,26]. However, its role as a general translation initiation factor has been disputed, because rapid depletion of UBR5A (arginine-fusion yeast eukaryotic initiation factor 5A) caused only a moderate reduction in protein synthesis [27]. Recently, a role of eIF5A in translation has been revisited more carefully. Association of eIF5A with actively translating ribosomes [28,29] suggests a specific role in translational control. eIF5A has been proposed to be a specific initiation factor for a subset of mRNAs [27,30]

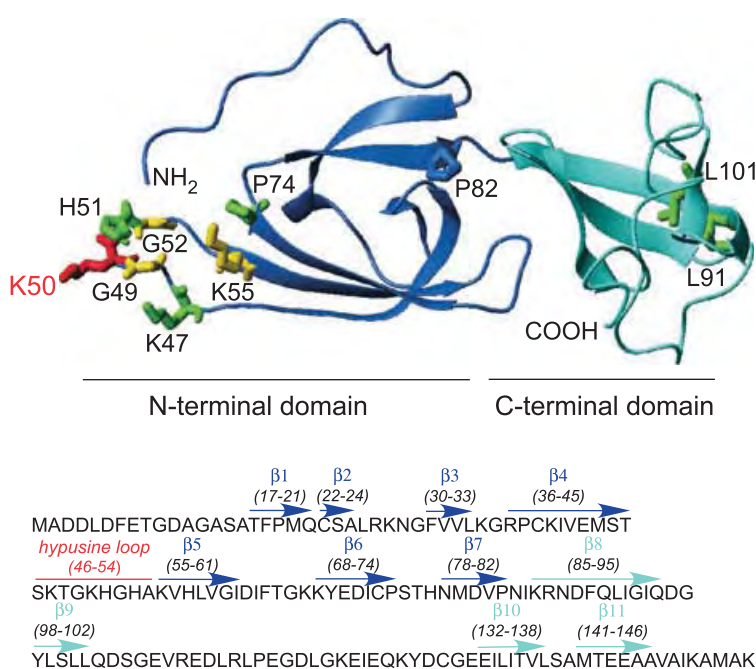


Fig. 1. Model structure of eIF5A with critical amino acid residues. The structure of eIF5A-1 is based on the model (Protein Data Bank 1FH4) constructed by Facchiano *et al.* [19]. Both the N-terminal and C-terminal domains (in blue and aqua-blue) consist of β -sheet core structures and are connected by a hinge at Asn83-Ile84. The hypusine modification site (Lys50, in red) is located at an exposed loop (hypusine loop amino acids 46–54) in the basic N-terminal domain. No growth is observed upon Ala substitution of the red-colored and orange-colored residues (Lys50, Gly49, Gly52, and Lys55) and slow growth upon Ala substitution of the green-colored residues (Lys47, His51, Pro74, Leu91, and Leu101).

or an RNA-binding protein involved in nuclear transport [31]. Several mRNAs have been reported, from differential display analysis, to be candidate targets of eIF5A [32]. Furthermore, an eIF5A homolog in an archaean, *Halobacterium* sp., as well as eIF5A, was reported to display specific RNA cleavage activity *in vitro* [33]. *S. cerevisiae* strains harboring eIF5A temperature-sensitive mutants exhibit diverse cellular changes [34–38], suggesting a direct or indirect role of eIF5A in cell wall integrity, mRNA decay, actin polarization, apoptosis and cell cycle progression [39]. It is not yet clear how depletion or dysfunction of eIF5A leads to the pleiotropic phenotypes of the temperature-sensitive eIF5A mutant strains.

One approach towards understanding the molecular mechanisms of eIF5A action has been to identify its binding partners through yeast two-hybrid screening or copurification using epitope-tagged eIF5A baits. Several proteins have been reported as binding partners of eIF5A, including DHS [28,40,41], DOHH (yeast Lia1) [41], HIV-1 post-transcriptional activator REV [42], ribosomal protein L5 [43], nuclear actin [44], transglutaminase 2 [45], exportin 4 [31], ribosomes, ribosomal component proteins, and ribosome-associated proteins [28,29]. Except for those with DHS and DOHH, molecular interactions between eIF5A and other candidate binding partners have not been well characterized. Binding of eIF5A to the ribosome appears to be dependent on the hypusine modification [28,29] and also on an intact ribosomal complex, as the binding is disrupted in the presence of EDTA or by RNaseA treatment [28,29]. However, there is no information available as to which parts of the eIF5A molecule and the ribosome are involved in the interaction.

The identification of amino acid residues critical for eIF5A activity is a necessary step towards characterizing the molecular interactions by which eIF5A exerts its activity. The absolute requirement for the hypusine modification was demonstrated by the lack of activity of the yeast mutant protein (K51R) with the Lys → Arg substitution at the hypusine modification site [8]. However, the importance of the many other strictly conserved amino acid residues of eIF5A in, or outside, the hypusine loop was unknown. Furthermore, it has been difficult to distinguish which residues of the hypusine loop contribute specifically to its activity as opposed to residues that are required for the modification. Our goal was to assemble an informative set of mutants to address three general questions: (a) which amino acids of eIF5A, other than the hypusine residue itself, contribute to its activity; (b) how stringent the sequence requirement is for eIF5A as

substrate for DHS and DOHH; (c) what the global structural requirements of eIF5A are for its biological activity. To this end, we generated several human eIF5A (heIF5A) mutant proteins through site-directed mutagenesis of each conserved amino acid, and by truncation, tested them as substrates for DHS and DOHH, and assessed their activities in supporting growth and protein synthesis in an eIF5A null background [27]. Besides the hypusine residue, we have identified new structural elements (including Lys47, Gly49 and Gly52 of the hypusine loop) that are critical for eIF5A activity, independently of the deoxyhypusine/hypusine modification. Our data demonstrate that both N-terminal and C-terminal domain β -sheet core structures are required for eIF5A activity, and underscore the importance of the conserved hypusine site loop for its biological activity, probably as a focal point in its interaction with downstream effectors. We also provide further evidence that eIF5A stimulates protein synthesis *in vivo*.

Results

Identification of amino acid residues of heIF5A that are vital for its activity in supporting yeast growth

S. cerevisiae contains two eIF5A genes, *TIF51A* and *TIF51B*, which encode two isoforms with highly similar amino acid sequences (92% amino acid sequence identity). Although the two genes are reciprocally regulated by oxygen [46], either of the two yeast proteins can support growth under aerobic as well as anaerobic conditions [47]. Furthermore, either of the two heIF5A isoforms can also substitute for the yeast eIF5A [47,48], suggesting functional conservation of eIF5A from yeast to human. In order to identify the structural elements of eIF5A that are required for its activity, we targeted all the highly conserved amino acid residues of human eIF5A-1 by site-directed mutagenesis and generated 41 mutant proteins: D3A, D4A, L5A, D6A, F7W, D11A, G13A, S15A, T17A, P19A, C22A, P37A, C38A, M43A, K47A, K47D, K47R, G49A, K50A, K50D, K50I, K50R, H51A, G52A, K55A, F64A, P74A, H77A, M79A, P82A, I84A, R86A, L91A, L101A, P115A, E116A, L119A, E144A, K150A, M43A/M79A, and C73A/M79A. The ability of each mutant protein to complement growth of *S. cerevisiae* strain HHY13a (Table 1) was evaluated by the plasmid shuffle technique [49]. In this strain, both yeast eIF5A genes (*TIF51A* and *TIF51B*) are inactivated and growth is supported by yeast eIF5A expressed from pBM-*TIF51A* (*URA3*). HHY13a was

Table 1. Strains and plasmids.

Strains and plasmids	Genotype	Reference
Strain		
W303-1A	MAT α <i>leu2-3, 112his3-11, 15ade2-1 ura3-1 trp1-1 can1-100</i>	[47]
HHY13	MAT α <i>leu2 his3 ura3 trp1 can1 tif51A::LEU2 tif51B::HIS3</i> (pBM-TIF51A)	[47]
UBHY-R	MAT α <i>leu2 his3 ura3 trp1 can1 tif51A::LEU2 tif51B::HIS3</i> (YCpUB-R5A)	[27]
HHY212d	MAT α <i>leu2 his3 ura3 trp1 can1 tif51A::LEU2 tif51B::HIS3</i> (pBM-TIF51A) (p414GAL1-helF5A-1m)	This work
HHY212S	MAT α <i>leu2 his3 ura3 trp1 can1 tif51A::LEU2 tif51B::HIS3</i> (p414GAL1-helF5A-1m)	This work
UBHY-R 212d	MAT α <i>leu2 his3 ura3 trp1 can1 tif51A::LEU2 tif51B::HIS3</i> (YCpUB-R5A) (p414GAL1-helF5A-1m)	This work
Plasmid		
pBM-TIF51A	<i>CEN4, ARS1, AmpR, URA3, GAL10, TIF51A</i>	[47]
YCpUB-R5A	<i>CEN11, ARS1, AmpR, URA3, GAL10, UBR5A</i>	[27]
P414GAL1-helF5A-1m	<i>CEN6, ARSH4, AmpR, TRP1, GAL1, helF5A-1 mutants</i>	This work

transformed with p414GAL1 (*TRP1*) vectors encoding heIF5As, and Trp⁺ transformants expressing both yeast and heIF5As were selected (Table 1, HHY212d strains). Purified colonies were resuspended in water and spotted on selection plates (Fig. 2A, left-side panels) and on plates containing 5-fluoroorotic acid (5-FOA) to select those that had lost the pBM-TIF51A plasmid and thereby expressed only heIF5As (Table 1, HHY212s strains). As the majority of 41 human mutant proteins could substitute for yeast eIF5A in supporting growth, data are shown only for mutations at specific sites, i.e. the conserved hypusine region, and those that displayed growth defects.

Only eight mutations at five sites (K47D, G49A, K50A, K50I, K50D, K50R, G52A, and K55A) caused total inactivation of eIF5A, as judged from the lack of growth on 5-FOA plates (Fig. 2A, middle and right panels). Interestingly, all the residues identified as being critical for eIF5A function (by Ala substitution), namely Gly49, Lys50, Gly52 and Lys55, are clustered around the hypusine modification site (Fig. 1). At

no other site tested did Ala substitution abolish the growth-supporting activity of eIF5A. The absolute requirement for deoxyhypusine/hypusine modification for eIF5A activity previously demonstrated using the yeast eIF5A mutant K51R (Lys51 is the hypusine modification site of yeast eIF5A) [8] is confirmed by the inactivity of three other Lys50 substitutions.

Five other mutations (K47A, H51A, P74A, L91A, and L101A) did not abolish, but did impair, eIF5A function, as strains expressing these mutant proteins grew at much slower rates than that expressing the wild-type protein (Fig. 2). For those strains expressing these mutant proteins, there was only minimal growth on day 3, but growth was apparent by day 6 (Fig. 2A, 5-FOA plates). Moreover, varying growth rates were observed among the mutant strains in rich liquid medium containing galactose (YPGal) (Fig. 2B). Doubling times for the strains expressing these mutant proteins were estimated to be 234.4 ± 5.2 (K47A), 113.8 ± 10.8 (K47R), 238.7 ± 11.3 (H51A), 144.5 ± 14.2 (P74A), 150.1 ± 12.5 (L91A) and 444.0 ± 32.6 min (L101A), whereas that for the strain expressing wild-type heIF5A was 112.3 ± 6.8 min. Notably, three different substitutions at Lys47 resulted in distinct growth phenotypes: K47R displayed normal growth, K47A showed reduced growth, and no growth was observed with the K47D mutation.

Expression and stability of heIF5A mutants in yeast

The failure of a mutant form of eIF5A to support growth may be due to protein instability. Therefore, we examined the expression levels of the heIF5A mutants and yeast eIF5A in *S. cerevisiae*, before (Fig. 2C, HHY212d strains) and after (Fig. 2D, HHY212s strains) 5-FOA selection, using specific antibodies. There was no cross-reactivity between antibodies to human and yeast eIF5A (compare lanes 17 and 18 in Fig. 2C, and lanes 8 and 9 in Fig. 2D). The yeast eIF5A and most of the heIF5A mutants were readily detectable in HHY212d strains (Fig. 2C) before 5-FOA selection. Steady-state levels of only two mutant proteins, L91A and L101A, were markedly reduced, suggesting their instability. In the viable HHY212s strains, only heIF5As (wild-type, K47A, K47R, H51A, P74A, L91A, and L101A) but no yeast eIF5A were detected, as expected (Fig. 2D), demonstrating partial or full support of *S. cerevisiae* growth by these heIF5As. Although the L101A signal was consistently enhanced and clearly visible after 5-FOA selection (compare Fig. 2D with Fig. 2C), its level was still much lower than those of other heIF5As. The

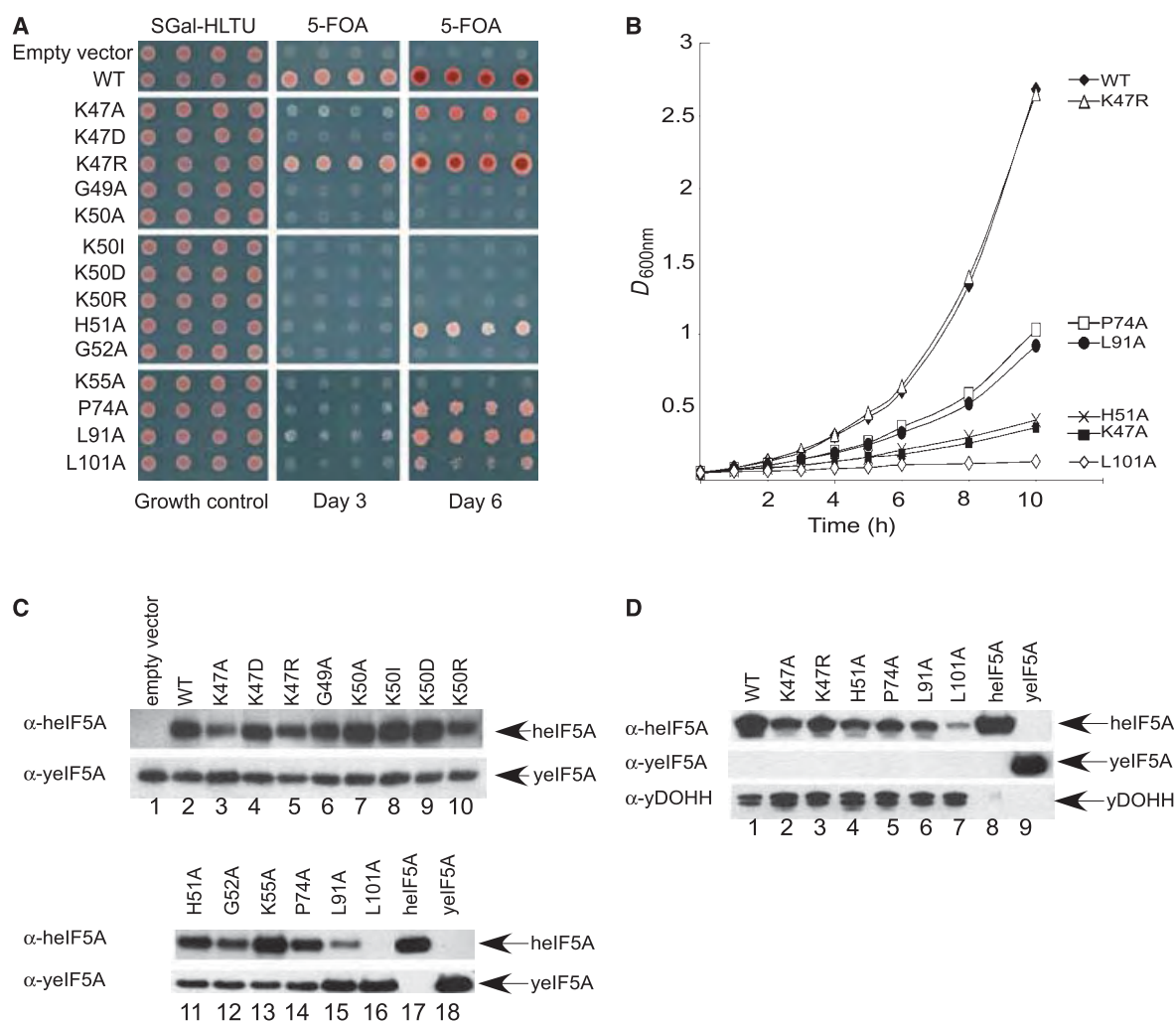


Fig. 2. Growth analysis of *S. cerevisiae* strains expressing heIF5A wild-type and mutant proteins (A, B) and stability of heIF5A proteins (C, D). (A) The haploid strain HHY13a was transformed with recombinant p414GAL1 plasmid encoding heIF5A-1 wild-type or mutant proteins with single amino acid substitutions, indicated on the left side. Trp⁺ transformants were selected on minimal galactose plates (SGal, – His, – Leu, – Trp, – Ura). Four individual transformant colonies (HHY212d) were resuspended in water and spotted in parallel onto the same selection plates (left panels) and on the 5-FOA-containing plates (SGal, – His, – Leu, – Trp, plus 5-FOA) (middle and right panels) to derive HHY212s that had lost pBM–*TIF51A*. The plates were photographed after incubation at 30 °C for 2 days without 5-FOA (left panels), or 3 and 6 days with 5-FOA (middle and right panels). (B) Growth curves of HHY212s strains harboring only the heIF5A proteins in YPGal. Western blot analyses of proteins of HHY212d strains harboring both recombinant plasmids, pBM–*TIF51A* and p414GAL1-heIF5A (C), and of HHY212s strains expressing only the heIF5A proteins (D). Twenty micrograms of cell proteins [all except lanes 15 and 16 of (C), where 40 μ g was applied] were used for SDS/PAGE. The same blotted membrane was first used for immunodetection with heIF5A antibody, and then stripped and then reused for immunodetection with yeIF5A (control) antibody or yeast DOHH (control) antibody. Purified recombinant yeast and heIF5A (10 ng each) were applied to determine the specificity of antibodies and to monitor efficacy of stripping. All the strains in (C) were cultured in SGal, – His, – Leu, – Trp, – Ura, and those in (D) were cultured in SGal, – His, – Leu, – Trp. All the experiments were repeated two times with virtually the same results: a typical experiment is shown.

slow growth of HHY212s strain bearing L101A (Fig. 2B) may be due to reduction in the L101A protein level as well as its reduced activity. On the other hand, the slow growth rates of other strains expressing the apparently stable heIF5A mutants, K47A, H51A, and P74A (Fig. 2A,B), suggest compromised activity of these mutant proteins.

Human eIF5A mutants as substrates for DHS and DOHH

The first step of hypusine synthesis (deoxyhypusine synthesis) is vital for *S. cerevisiae* survival [10,11], but the second step (deoxyhypusine hydroxylation) is not [6], an indication that the deoxyhypusine-containing

form of eIF5A is functional in yeast without subsequent hydroxylation. The impaired activity of heIF5A mutants could be due to their deficiency as substrates for DHS. Thus, we tested heIF5A mutants as substrates for *S. cerevisiae* DHS and DOHH, using a combined *in vitro* assay. All the mutant proteins were overexpressed in BL21(DE3) *E. coli* cells, but the levels of K50D, L91A and L101A mutants were lower than those of others in the bacterial lysates (presumably due to their instability). Upon reaction of the lysates with DHS and DOHH in the presence of [^{3} H]spermidine, strong radiolabeling of eIF5As was observed for the wild-type and the mutant proteins K47A, K47D, K47R, G49A, H51A, P74A, L91A, and L101A (Fig. 3A), indicating that these mutants are good substrates for DHS. Therefore, slow or no growth of the HHY212s strains carrying these mutants (K47A, K47D, G49A, H51A, P74A, L91A, and L101A) (Fig. 2) cannot be attributed to impaired deoxyhypusine modification. No labeling was observed for any of the mutants substituted at Lys50 (the hypusine modification site), as expected (Fig. 3A). Only very weak radiolabeling was observed for G52A and K55A.

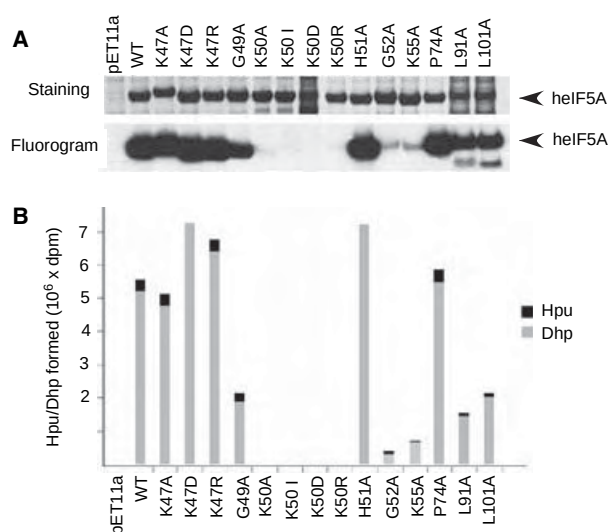


Fig. 3. heIF5A mutant proteins as substrates for DHS and DOHH *in vitro*. Human recombinant eIF5A proteins were expressed in *E. coli* BL21(DE3), and cell lysates were used as substrates for DHS and DOHH in a combined assay. Coomassie Blue staining of BL21(DE3) lysates expressing human mutant proteins (A, top panel) and fluorogram of the SDS gel of DHS/DOHH reaction mixtures showing labeling of several mutant proteins (A, bottom panel). Portions of DHS/DOHH reaction mixtures were analyzed for radioactive deoxyhypusine and hypusine content in the products by ion exchange chromatographic separation (B), as described previously [58]. The experiments were repeated two times with virtually the same results: a typical experiment is shown.

Radiolabeled hypusine was formed in K47A, K47R, G49A, P74A, L91A and L101A mutants, indicating that they acted as substrates for DOHH as well as for DHS (Fig. 3B). In contrast, only radioactive deoxyhypusine, but no hypusine, was detected in mutants K47D and H51A, suggesting the importance of the basic charges of Lys47 and His51 in the DOHH reaction. Although DHS and DOHH are totally specific for eIF5A and probably recognize the β -sheet core structure of the eIF5A N-terminal domain [50,51], there are fine differences between the two enzymes in terms of specific sequence requirements for their substrates (Table 2), as revealed by K47D and H51A.

Although inefficient modification of G52A and K55A by DHS may be partially responsible for the lack of growth support, it cannot be ruled out that Gly52 and Lys55 have an additional role in eIF5A activity. This may be especially true for Gly52, as Ala or Asp substitution of the counterpart residue (Gly53) in yeast eIF5A totally abolishes its activity (C. A. O. Dias and S. R. Valentini, unpublished results). Two other mutants, K47D and G49A, failed to support growth (Fig. 2A), in spite of their effective modification by DHS, indicating that Lys47 and Gly49 are required for eIF5A activity independently of deoxyhypusine/hypusine. Another mutant, P74A, also showed impaired eIF5A activity (Fig. 2), without apparent loss of its stability (Fig. 2C) or its modification by DHS (Fig. 3A).

Table 2. Summary of characteristics of heIF5A mutant proteins. SG, slow growth; ND, not determined.

Mutant	Substrate for		Growth	Protein synthesis
	DHS	DOHH		
Wild-type	+++	+	+	+
K47A	+++	+	SG	ND
K47D	+++	–	–	–
K47R	+++	+	+	+
G49A	++	+	–	ND
K50A	–	–	–	ND
K50D	–	–	–	ND
K50I	–	–	–	ND
K50R	–	–	–	–
H51A	+++	–	SG	ND
G52A	+	+	–	ND
K55A	+	+	–	ND
P74A	++	+	SG	ND
L91A ^a	++	+	SG	ND
L101A ^a	++	+	SG	ND

^a These proteins appear to be unstable, and their cellular levels were low.

Effects of N-terminal or C-terminal truncation of eIF5A on its stability and activity

eIF5A has an extended N-terminus and a different C-terminus as compared to the bacterial (EF-P) [18] and archaeal (aIF5A) homologs. Recently, the N-terminal extension (amino acids 1–19) of mammalian eIF5A has been reported as a nuclear localization signal [52]. In order to determine whether these N-terminal or C-terminal extensions are functionally significant and whether intact N-terminal or C-terminal domains of eIF5A are required for eIF5A activity, we generated truncated eIF5A. eIF5A with deletions of six or 13 amino acids from the N-terminus, or five amino acids from the C-terminus, supported growth, but no growth was observed with further truncations (Fig. 4A). Truncated heIF5As $\Delta 2-6$, $\Delta 2-13$, $\Delta 2-21$, $\Delta 150-154$ and $\Delta 135-154$ were stably expressed in HHY212d strains, as detected by western blotting using a commercial mAb generated against a human recombinant eIF5A-1 peptide (amino acids 58–154). Three other peptides, the N-terminal domain ($\Delta 84-154$), the C-terminal domain ($\Delta 2-83$) and $\Delta 145-154$ were not detectable, either due to their inability to be recognized by the mAb or due to their instability, and no conclusion can be drawn

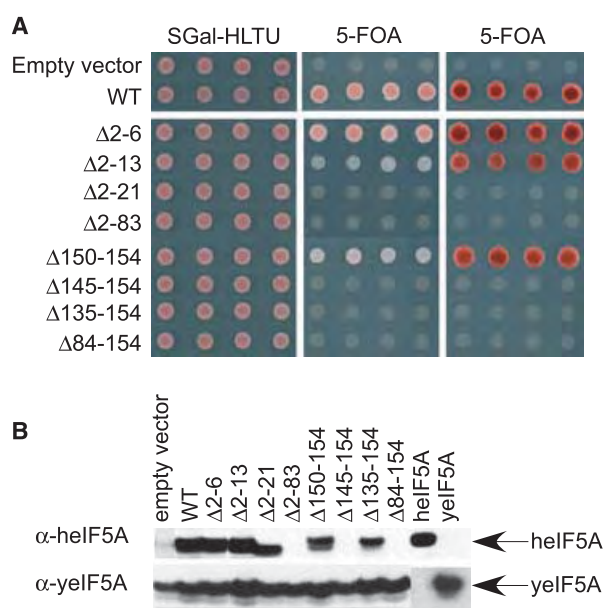


Fig. 4. Growth analysis of *S. cerevisiae* strains expressing truncated heIF5A and expression and stability of truncated proteins. Growth analysis was performed as described in Fig. 2A, and western blots of proteins of HHY212d strains harboring both recombinant plasmids, pBM-7IF51A and p414GAL1-heIF5A (B), are shown. The strains were cultured in SGal, – His, – Leu, – Trp, – Ura). The experiments were repeated two times with virtually the same results: a typical experiment is shown.

regarding their activity. Unlike $\Delta 2-6$, $\Delta 2-13$ and $\Delta 150-154$, the two truncated proteins, $\Delta 2-21$ and $\Delta 135-154$ (Fig. 4A,B), failed to support growth, whereas they are stably expressed and expected to be effective substrates for DHS and DOHH [53]. These findings provide evidence that both the N-terminal and C-terminal domain β -sheet core structures (amino acids 17–82 and 85–146) (Fig. 1) are required for the biological activity of eIF5A in cells.

Effects of eIF5A depletion on growth and on the synthesis of DNA, RNA and protein in *S. cerevisiae*

The UBHY-R strain harboring unstable Arg-eIF5A fusion protein (UBR5A) was previously designed to determine the effects of eIF5A depletion [27]. Upon shift of this strain to a rich medium containing glucose (YPD), transcription from the GAL promoter is turned off, leading to rapid degradation and depletion of UBR5A. As eIF5A depletion in yeast caused only modest inhibition of protein synthesis in minimal medium [27] and larger but incomplete inhibition in rich medium (C. A. Henderson and J. W. B. Hershey, unpublished results), it could not be ruled out that the observed inhibition of protein synthesis is secondary to other effects caused by eIF5A depletion. Therefore, we compared the effects of eIF5A depletion on growth and the synthesis of DNA, RNA, and protein (Fig. 5). In the case of the wild-type strain, all the macromolecular syntheses increased upon the shift to the glucose medium, presumably due to more efficient utilization of glucose than galactose as the energy source. In contrast, in the UBHY-R strain, the rates of all the macromolecular syntheses declined by 3 h of medium shift, consistent with the growth inhibition (Fig. 5). Of the three macromolecules, the synthesis of protein was consistently inhibited at 1 h of the medium shift, while DNA synthesis was unaffected and RNA synthesis was even increased (probably driven by the glucose effect). By 3–4 h after the shift, the protein synthesis was down to ~30% of the initial rate of UBHY-R, whereas the rates of synthesis of DNA and RNA were 70% and 60% of the initial values, respectively. These data suggest that the primary effect of eIF5A depletion is on protein synthesis, and that the reduced protein synthesis leads to a decrease in the synthesis of DNA and RNA and to growth inhibition.

Finally we compared the activities of heIF5A wild-type and mutant proteins in supporting growth and protein synthesis (Fig. 6A,B). The rapid reduction in UBR5A (Fig. 6C) was accompanied by decrease in growth rate (Fig. 6A). The protein synthesis rate in

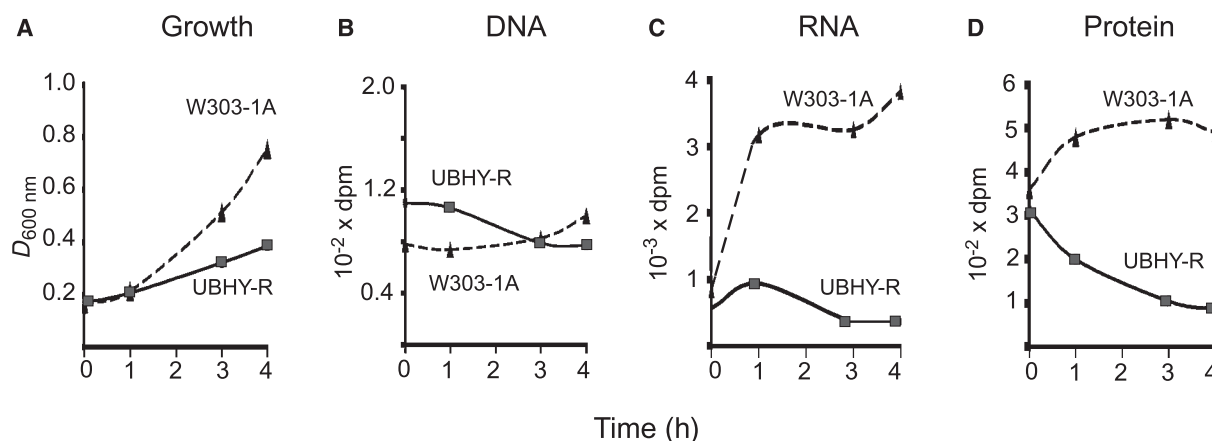


Fig. 5. The effects of eIF5A depletion on the synthesis of DNA, RNA, and protein. Macromolecular synthesis was measured in duplicates using exponential cultures of W303-1A and UBHY-R after medium shift to YPD, as described in Experimental procedures. (A) Growth curve. (B) DNA synthesis. (C) RNA synthesis. (D) Protein synthesis. The rate of macromolecular synthesis was calculated as $\text{dpm} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \mu\text{g protein per 20 min}$, using the average values from duplicates that agreed within 10% of experimental error. The experiments were repeated two times with similar results: a typical experiment is shown.

UBHY-R declined (YPD) by 70% 5 h after the shift to glucose medium, whereas protein synthesis in the wild-type strain W303-1A increased. Although we observed a consistently greater inhibition of protein synthesis in YPD medium than under the previously reported conditions, there was a basal level of [³H]leucine incorporation ($\sim 30\%$ of control). This incomplete inhibition may be due to a small amount of UBR5A remaining even after 5 h of medium shift (UBHY-R, Fig. 6C).

Expression of human wild-type eIF5A, or the functional mutant K47R, sustained growth of UBHY-R after the shift to glucose medium in the first 5 h (Fig. 6A) at a rate close to that in W303-1A (Fig. 6A) and also maintained protein synthesis (Fig. 6B). Unlike UBR5A (Fig. 6C, 26 kDa, solid arrowheads), heIF5A has a long half-life and did not decay rapidly upon shift to glucose medium (Fig. 6C, 18 kDa, open arrowheads). In the UBHY-R expressing wild-type eIF5A or K47R (Fig. 6B), the protein synthesis rate was steady in the first 3 h and declined only modestly at 5 h, probably as a result of decreased heIF5A. In contrast, the nonfunctional eIF5A mutants K47D and K50R did not cause any significant enhancement in the growth rate or protein synthesis over those in UBHY-R. Taken together, these results confirm an essential role of eIF5A in *S. cerevisiae* cell proliferation and support a primary role of eIF5A in translational control.

Discussion

eIF5A is unique in that it is the only cellular protein activated by hypusine modification. eIF5A is highly

conserved and consists of two β -sheet core domains, a basic N-terminal domain with an exposed hypusine site loop, and an acidic C-terminal domain (Fig. 1). One important question is whether the sequence and structural conservation of eIF5A reflects structural requirements for its interaction with the hypusine modification enzymes, eIF5A downstream effectors, or both. We undertook a comprehensive mutagenesis study of human eIF5A-1 to dissect the structural elements of this protein required for its biological activity and for its hypusine modification, and thereby to gain insights into its function. In spite of the high sequence conservation of eIF5A, the protein was remarkably resilient to individual Ala substitutions, and a majority of mutant proteins were fully functional in supporting *S. cerevisiae* growth. We have identified several amino acid residues in the exposed hypusine loop as the critical sites for eIF5A activity (Fig. 1 and Table 2). The finding that several mutants failed to support growth (e.g. K47D, G49A, G52A, and K55A), whereas all the single substitution mutants (except that with the Lys50 substitution) worked as substrates for DHS (Table 2), suggests that strict conservation of the hypusine loop sequence has been dictated to a greater extent for preservation of eIF5A activity, possibly for its interaction with downstream effector molecules, than for its interaction with the modification enzymes. Furthermore, our data provide evidence that the β -sheet core structures of both the N-terminal and C-terminal domains of eIF5A (Fig. 1, amino acids 17–82 and 85–146) are necessary for the biological functions of eIF5A.

The loss of eIF5A function for various mutants may be the result of a defect in effector binding, instability,

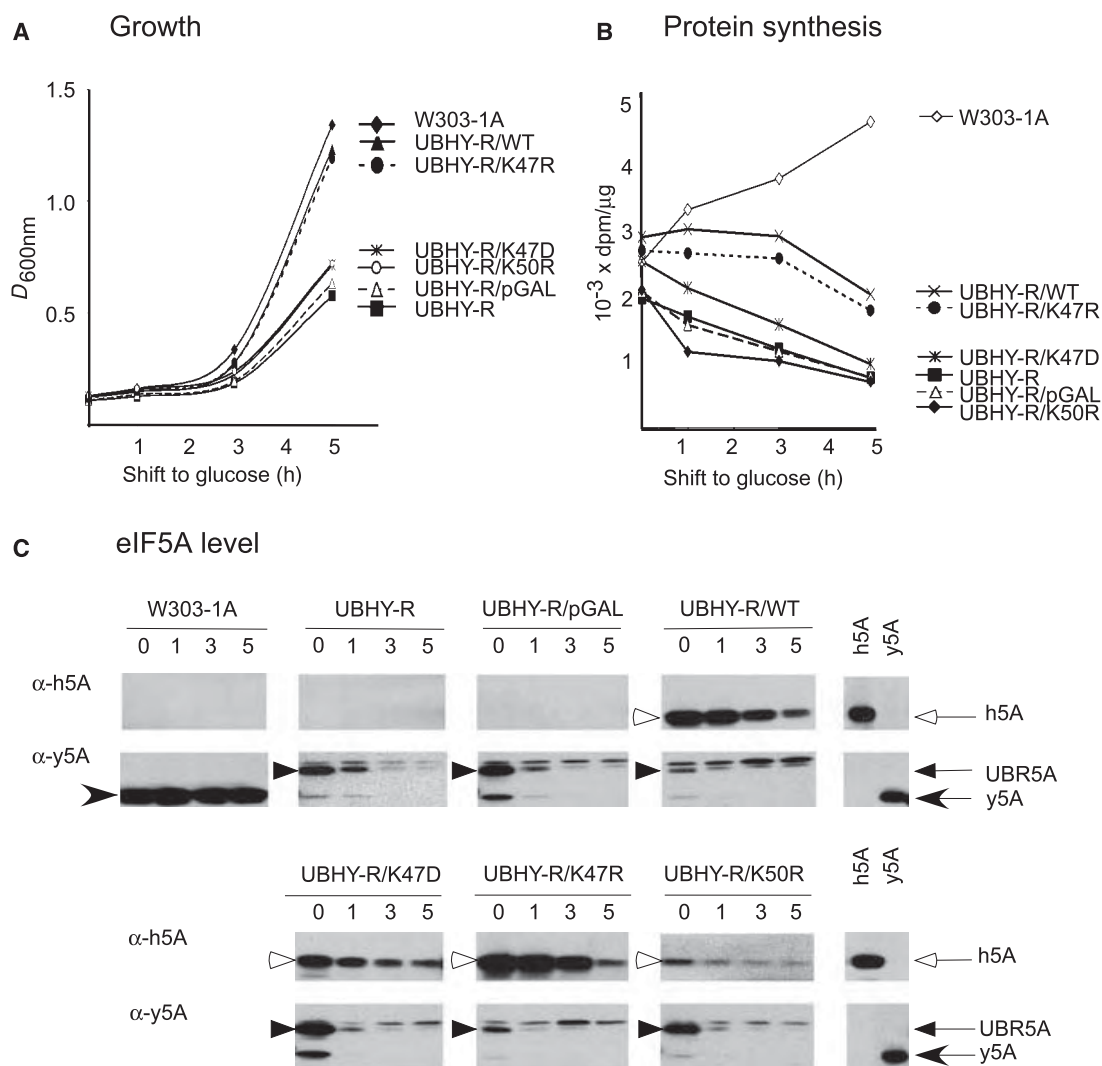


Fig. 6. The effects of human wild-type and mutant eIF5A expression on growth and protein synthesis in UBHY-R. Protein synthesis was measured in W303-1A, UBHY-R and UBHY-R transformants expressing human eIF5A-1 wild-type or mutant proteins K47A, K47R, and K50R, as described under Experimental procedures, with minor modifications as follows. (A) Growth curve. At 0, 1, 3 and 5 h after shift to glucose medium, ~1 D unit of cells was used to measure protein synthesis in 0.2 mL of YPD (labeling medium) (containing 20 μ Ci of [^{3} H]leucine) for 20 min at 30 °C. Protein synthesis was stopped, cells were harvested, and cell pellets were frozen on dry ice. When all the samples were collected, 1 mL of 15% trichloroacetic acid solution was added to the cell pellets, and the suspended samples were heated at 100 °C for 15 min. A portion of washed trichloroacetic acid precipitates was used for protein determination by the Bio-Rad protein assay and another portion for radioactivity measurements. The rate of protein synthesis was calculated as $\text{dpm} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ protein per 20 min (B). The levels of human and yeast eIF5A and yeast UBR5A proteins were determined by western blot analysis (C). The open arrowheads indicate h5A, and solid arrowheads the yeast endogenous eIF5A and UBR5A. The experiments were repeated three times with virtually the same results: a typical experiment is shown.

and/or inability to be modified by DHS. Analysis of properties of the selected eIF5A mutant proteins, summarized in Table 2, reveals distinct sequence requirements for their growth-supporting activity and as substrates for DHS and DOHH. Judging from the fact that all but the Lys50 mutants are substrates for DHS (albeit at a reduced efficiency for some), single amino acid substitutions, including those in the hypusine

loop, are tolerated for the DHS-eIF5A interaction. In contrast, there is a stringent sequence requirement of eIF5A (especially surrounding the hypusine residue) for its biological activity, as several single amino acid substitutions (K47D, G49A, G52A, and K55A) caused total inactivation of eIF5A. Thus, in addition to the hypusine/deoxyhypusine residue, Lys47, Gly49, Gly52 and Lys55 are vital for the biological activity of

heIF5A (Fig. 2 and Table 2). It is tempting to speculate that these residues, in addition to deoxyhypusine/hypusine, are involved in the binding of eIF5A to its downstream effectors as the anchoring sites. Alternatively, they may be critical for the proper orientation of the deoxyhypusine/hypusine residue and/or the hypusine loop. The role of Gly49 and Gly52 is noteworthy in view of the rigid property of Gly in the peptide structure. Being adjacent to Lys50, these two Gly residues are likely to form the β -turn structure of the -Gly-Dhp/Hpu-His-Gly- motif, and may contribute to the proper orientation of the deoxyhypusine/hypusine side chain and the precise configuration of the hypusine loop.

Comparison of the three different heIF5A mutants, K47A, K47D, and K47R, provides an interesting insight into the role of Lys47. The three mutants are all effectively modified by DHS, but differ widely in their growth-supporting activity. Lys47 has been previously reported as a target for acetylation [54,55], an additional post-translational modification occurring in eIF5A. Unlike the irreversible hypusine modification, acetylation is reversible. However, no experimental evidence has been reported for eIF5A activity being regulated by Lys47 acetylation. Therefore, we substituted Lys47 with three different amino acids, i.e. acidic, neutral and basic amino acids. The fact that eIF5A activity is impaired partially by Ala substitution and totally by Asp substitution, but not by Arg substitution, suggests that basic charge of Lys47 is important for its activity and that eIF5A activity is negatively regulated by acetylation in cells. Although the Lys47 acetylation does not affect deoxyhypusine modification [26], the basic charge at this residue may be critical in an ionic interaction with an acidic adaptor site of an eIF5A-binding partner.

As the amino acid sequence surrounding the hypusine residue (STSKTGHpu50HGHAKVH) is very basic and hydrophilic, this loop may interact with specific nucleotide sequences of RNA [51], acidic proteins, or ribonucleoprotein complexes. The β -sheet structure of the C-terminal domain of eIF5A resembles an oligonucleotide-binding fold and has also been implicated in RNA binding. This C-terminal domain also contains a stretch of highly conserved hydrophobic amino acids [FQLIGIQDGYLSLL(89–102)] that was proposed as a potential effector domain involved in protein–protein interaction [56]. Indeed, Ala substitution of Leu91 or Leu101 caused a reduction in growth rate. Analysis of the position of both amino acids in the human eIF5A-1 model, Leu91 and Leu101, shows that they are localized at the hydrophobic core of the β -barrel (Fig. 1). Substitution of either of the two Leu

residues by Ala could easily disrupt the tertiary structure. Without a properly folded β -barrel, the mutants are probably more sensitive to proteolytic degradation, as shown from their reduced level in HHY212d strains and in BL21(DE3) lysates. The growth defect of L101A may be largely due to instability of the mutant, as its level is drastically reduced (Fig. 2). Likewise, the yeast counterpart L102A exhibits a temperature-sensitive phenotype, being unstable at the nonpermissive temperature [37].

The role of eIF5A and its hypusine modification in translation has been a longstanding enigma. eIF5A enhances methionyl-puromycin synthesis in a deoxyhypusine/hypusine-dependent manner *in vitro* [25,26]. Recently, it was shown that eIF5A binds to actively translating ribosomes and that conditional mutants of eIF5A are hypersensitive to protein synthesis inhibitors [28,29]. Published aIF5A homolog structures are partially superimposable on the bacterial ortholog, EF-P, which contains a third domain and resembles the structure of the L-shaped structure of tRNA [18]. Whether eIF5A functionally mimics tRNA on ribosomes remains to be explored. Our data demonstrate that eIF5A is definitely required for optimal protein synthesis and that expression of functional heIF5A (wild-type or K47R) in an eIF5A null background (UBHY-R in glucose medium) restores growth and protein synthesis *in vivo* (Fig. 6). Comparison of the effects of eIF5A depletion on macromolecular synthesis (DNA, RNA, and protein) suggests that inhibition of protein synthesis is the primary consequence of eIF5A depletion. Furthermore, addition of modified eIF5A (eIF5A intermediate containing deoxyhypusine) to an eIF5A-depleted lysate of the UBHY-R strain enhances total protein synthesis *in vitro*, whereas no enhancement is observed with unmodified eIF5A precursor (C. A. Henderson and J. W. B. Hershey, unpublished results). All these findings are consistent with a role of eIF5A in translation. However, as incomplete inhibition of protein synthesis is observed in cells and *in vitro* upon eIF5A depletion (< 10% of normal level), it is not clear whether eIF5A is required for global protein synthesis or for optimal and balanced translation of a subgroup of endogenous mRNAs, especially those involved in cell cycle progression. Recently, genes involved in actin polarization, a process necessary for the G₁–S transition in yeast, were isolated as high-copy suppressors of temperature-sensitive eIF5A mutants [36].

eIF5A activity *in vitro* and *in vivo* depends not only on a long and basic deoxyhypusine/hypusine side chain, but also on a specific configuration of surrounding residues in the exposed hypusine loop (amino acids

46–54) with the Gly-Dhp/Hpu-His-Gly tip structure. Such a precise structural requirement suggests that this deoxyhypusine/hypusine loop docks into a well-defined space of its biological effector molecule. It is a great future challenge to identify this binding partner of eIF5A with its specific pocket (proteins, RNA, or RNA–protein complexes) and to elucidate the mode of action of eIF5A.

Experimental procedures

Materials

[1,8-³H]Spermidine HCl (15–25 Ci·mmol^{−1}), [methyl-³H]thymidine (6.7 Ci·mmol^{−1}), L-[4,5-³H(N)]leucine (60 Ci·mmol^{−1}) and [5,6-³H]uracil (12.5 Ci·mmol^{−1}) were purchased from Perkin-Elmer/NEN (Boston, MA). Precast Tris/glycine and NuPAGE (Bis-Tris) gels, electrophoresis buffers and Simply Blue staining solution were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA), ECL Plus Western Blotting Detection system was obtained from GE Healthcare (Piscataway, NJ), and the Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit was obtained from Stratagene (La Jolla, CA). The protease inhibitor cocktail was purchased from Pierce (Woburn, MA) and 5-FOA from Sigma (St Louis, MO). A mAb against recombinant heIF5A (amino acids 58–154) was purchased from BD Biosciences (San Jose, CA). Rabbit polyclonal antibodies were produced using purified *S. cerevisiae* eIF5A (Tif51a). The oligonucleotide primers were synthesized by Integrated DNA Technologies, Inc. (Coralville, IA). The human and yeast recombinant eIF5A [50], recombinant DHS [57] and DOHH [6] proteins were purified as described previously.

Yeast strains and methods

An HHY13a strain (Table 1) with inactivation of both *S. cerevisiae* eIF5A genes (*TIF51A* and *TIF51B*) and whose growth is sustained by plasmid-borne *TIF51A* under the GAL1 promoter (pBM-*TIF51A*, *URA3*) [47] was transformed with p414GAL1(*TRP1*) vectors encoding human eIF5A-1 wild-type or mutant proteins. Trp⁺ transformant colonies harboring both yeast eIF5A and heIF5A were purified on selection plates [synthetic minimal medium containing galactose (SGal), – His, – Leu, – Trp, – Ura] to derive HHY212d strains and streaked on SGal containing 5-FOA (SGal, – His, – Leu, – Trp, plus 5-FOA) to select the strains (HHY212s) that lost the pBM-*TIF51A* plasmid and therefore expressed only heIF5As. The UBHY-R strain (Table 1) is a derivative of HHY13a with inactivation of both *S. cerevisiae* eIF5A genes (*TIF51A* and *TIF51B*), and its growth is supported by a plasmid-borne yeast eIF5A fusion protein containing the N-terminal Arg destabilizing element (UBR5A) under the control of the GAL promoter

[27]. This strain was transformed with p414GAL1(*TRP1*) plasmids encoding human wild-type and mutant eIF5A, and Trp⁺ transformants were selected on SGal, – His, Leu, – Trp, – Ura medium to derive UBHY-R212d strains (Table 1).

Generation of recombinant plasmids encoding heIF5A site-directed mutants and truncated proteins

The yeast and bacterial expression vectors (p414GAL1 and pET11a) encoding several heIF5A mutants, including D3A, D4A, L5A, D6A, F7W, D11A, G13A, S15A, T17A, P19A, C22A, P37A, C38A, M43A, K47A, K47D, K47R, G49A, K50A, K50D, K50I, K50R, H51A, G52A, K55A, F64A, P74A, H77A, M79A, P82A, I84A, R86A, L91A, L101A, P115A, E116A, L119A, E144A, K150A, M43A/M79A, and C73A/M79A, were generated using the QuickChange Site-directed Mutagenesis Kit and employing p414GAL1/heIF5A-1 and pET11a/heIF5A-1 as templates. The vectors encoding truncated eIF5A were generated by subcloning the PCR-amplified ORFs into the *Bam*HI–*Eco*RI sites of p414GAL1 and the *Nde*I–*Bam*HI sites of pET11a. The entire ORF of the site-mutated and truncated eIF5A was sequenced for confirmation of the intended mutation or truncation.

Determination of growth rates

Yeast strains were grown in YPGal (1% yeast extract, 2% bacto-tryptone, 2% galactose) at 30 °C with shaking at 200 r.p.m., starting with a small inoculum so that the culture would still be in exponential stage after overnight incubation. The overnight cultures were diluted in fresh medium to the density indicated, and growth was monitored at 600 nm.

Detection and determination of yeast eIF5A and heIF5A by western blots

Yeast cells were grown at 30 °C in rich or minimal medium containing galactose or glucose as indicated. Cells were harvested by centrifugation at 2000 *g*, and cell pellets were resuspended in cold Tris buffer (50 mM Tris/HCl, pH 7.5, and 1 mM dithiothreitol, containing 2× yeast protease inhibitor cocktail). Yeast extracts were generated by breaking the cells with glass beads using a BioSpec (Bartlesville, OK) bead beater. Cycles of 10 s of agitation and 1 min of cooling on ice were repeated three times. Cell lysates were clarified by centrifugation at 20 800 *g* for 20 min at 4 °C. The total protein concentration of the lysate was determined using the Bio-Rad (Hercules, CA) Protein Assay solution. Approximately 20 µg of cellular protein was separated by SDS/PAGE (4–12% gel) in MES buffer. Proteins were

transferred to 0.2 μm nitrocellulose membranes for immunodetection using rabbit polyclonal antibody (1 : 5000 dilution) against yeast eIF5A and mouse monoclonal antibody (1 : 10 000 dilution) against the heIF5A-1 peptide, amino acids 58–154. The signal was developed with an ECL Plus chemiluminescence reagent.

Measurement of synthesis of DNA, RNA and protein in cells

The wild-type strain W303-1A and the mutant strain UBHY-R were grown in YPGal to mid-log phase ($D_{600\text{ nm}}$ 0.4–0.7) and quickly washed in YPD. For measurement of synthesis of DNA, RNA and protein (Fig. 5) at time 0, washed cell pellets ($\sim 1 D$ unit), in duplicate, were resuspended in 1.0 mL of YPD containing 20 μCi of [^3H]thymidine, [^3H]uracil or [^3H]leucine, respectively, and incubated with shaking for 20 min at 30 °C. The reaction was stopped by addition of 0.5 mL of ice-cold stopping solutions (0.3 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ of thymidine for DNA, 0.3 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ of uracil for RNA, and 0.3 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ of cycloheximide plus 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ of leucine for protein), and cells were harvested by centrifugation at 2000 g . Cell pellets were immediately frozen on dry ice until all the samples from different time points were collected. To measure the synthesis rates after shift to glucose medium, the cells grown in YPGal were washed and diluted in YPD to ~ 0.125 – 0.17 (D , 600 nm), and growth was monitored. At 1, 3, 4 or 5 h after the medium shift, cells ($\sim 1 D$ unit) were resuspended in YPD and processed as above. When all samples were collected from all the time points, 1 mL of 6% trichloroacetic acid solution was added to the cell pellets. After 20 min of incubation on ice, trichloroacetic acid precipitates were collected by centrifugation at 14 000 g at 4 °C for 4 min, and the pellets were quickly washed twice with ice-cold 6% trichloroacetic acid. Aliquots of the washed and trichloroacetic acid precipitate pellets were resuspended in 0.1 mL of 0.2 M NaOH. Fifty-microliter aliquots were used for measurement of radioactivity in a Beckman (Fullerton, CA) Scintillation Counter, and 20 μL aliquots for determination of protein amounts by the BCA protein assay. The rates of macromolecular synthesis were calculated as $\text{dpm}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ protein per 20 min.

Combined DHS/DOHH assays

Human recombinant eIF5A wild-type and mutant proteins were tested as substrates for DHS and DOHH *in vitro* as described previously [51]. eIF5A protein expression was induced in *E. coli* BL21(DE3) cells transformed with pET11a/heIF5A vectors by 1 mM isopropyl thio- β -D-galactoside for 3 h. The cell pellets from 5 mL cultures were sonicated using an Ultrasonic Processor in 0.2 mL of ice-cold Tris buffer (50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 1 mM dithiothreitol) containing protease inhibitor cocktail. Cell debris was removed by centrifugation at 14 000 g at 4 °C for 20 min.

Aliquots of the clarified lysates (1–10 μL) were used for SDS/PAGE to determine the level of eIF5A protein expression. Aliquots (1–10 μL) containing 2–5 μg of recombinant eIF5A proteins were used for the combined DHS/DOHH assays [51]. The reaction mixture contained, in 20 μL , 0.125 M Tris/HCl, pH 8.5, 6 mM dithiothreitol, 1 mM NAD, 25 μg of BSA, 3 μCi of [^3H]spermidine, 0.1 μg of DHS and 1.0 μg of DOHH and clarified BL21(DE3) lysates containing heIF5As (2–5 μg). After incubation for 2 h at 37 °C, an aliquot of the reaction mixture was used for SDS/PAGE for fluorographic detection of the radiolabeled peptides. To the rest, 500 μg of carrier BSA was added, and the proteins were precipitated with 10% trichloroacetic acid containing polyamines (putrescine, spermidine and spermine, 1 mM each). After removal of [^3H]spermidine by repeated washing with 10% trichloroacetic acid containing polyamines, the trichloroacetic acid-precipitated proteins were hydrolyzed in 6 M HCl at 110 °C overnight and the radiolabeled hypusine and deoxyhypusine were measured after ion exchange chromatographic separation as previously described [58].

Acknowledgements

This research was supported by the Intramural Research Program of National Institutes of Health (NIDCR), and in part by the Swedish Cancer Society (4157-B98-01XAB), Uppsala University, and the Children's Hospital at Oakland Endowment (to H. E. Johansson). We thank Edith C. Wolff (NIDCR/NIH) for helpful discussion and critical reading of our manuscript.

References

- 1 Cooper HL, Park MH, Folk JE, Safer B & Braverman R (1983) Identification of the hypusine-containing protein hy+ as translation initiation factor eIF-4D. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**, 1854–1857.
- 2 Park MH (2006) The post-translational synthesis of a polyamine-derived amino acid, hypusine, in the eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A). *J Biochem (Tokyo)* **139**, 161–169.
- 3 Murphey RJ & Gerner EW (1987) Hypusine formation in protein by a two-step process in cell lysates. *J Biol Chem* **262**, 15033–15036.
- 4 Wolff EC, Lee YB, Chung SI, Folk JE & Park MH (1995) Deoxyhypusine synthase from rat testis: purification and characterization. *J Biol Chem* **270**, 8660–8666.
- 5 Tao Y & Chen KY (1995) Molecular cloning and functional expression of Neurospora deoxyhypusine synthase cDNA and identification of yeast deoxyhypusine synthase cDNA. *J Biol Chem* **270**, 23984–23987.

- 6 Park J-H, Aravind L, Wolff EC, Kaevel J, Kim YS & Park MH (2006) Molecular cloning, expression, and structural prediction of deoxyhypusine hydroxylase: a HEAT-repeat-containing metalloenzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 51–56.
- 7 Abbruzzese A, Park MH & Folk JE (1986) Deoxyhypusine hydroxylase from rat testis. Partial purification and characterization. *J Biol Chem* **261**, 3085–3089.
- 8 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**, 3105–3114.
- 9 Wöhl T, Klier H, Ammer H, Lottspeich F & Magdolen V (1993) The HYP2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is essential for aerobic growth: characterization of different isoforms of the hypusine-containing protein Hyp2p and analysis of gene disruption mutants. *Mol Gen Genet* **241**, 305–311.
- 10 Sasaki K, Abid MR & Miyazaki M (1996) Deoxyhypusine synthase gene is essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **384**, 151–154.
- 11 Park MH, Joe YA & Kang KR (1998) Deoxyhypusine synthase activity is essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **273**, 1677–1683.
- 12 Byers TL, Ganem B & Pegg AE (1992) Cytostasis induced in L1210 murine leukaemia cells by the *S*-adenosyl-L-methionine decarboxylase inhibitor 5'-((Z)-4-amino-2-butenyl)methylamino)-5'-deoxyadenosine may be due to hypusine depletion. *Biochem J* **287**, 717–724.
- 13 Gerner EW, Mamont PS, Bernhardt A & Siat M (1986) Post-translational modification of the protein-synthesis initiation factor eIF-4D by spermidine in rat hepatoma cells. *Biochem J* **239**, 379–386.
- 14 Chen KY & Liu AY (1997) Biochemistry and function of hypusine formation on eukaryotic initiation factor 5A. *Biol Signals* **6**, 105–109.
- 15 Caraglia M, Marra M, Giuberti G, d'Alessandro AM, Budillon A, del Prete S, Lentini A, Beninati S & Abbruzzese A (2001) The role of eukaryotic initiation factor 5A in the control of cell proliferation and apoptosis. *Amino Acids* **20**, 91–104.
- 16 Chattopadhyay MK, Tabor CW & Tabor H (2003) Spermidine but not spermine is essential for hypusine biosynthesis and growth in *Saccharomyces cerevisiae*: spermine is converted to spermidine in vivo by the FMS1-amine oxidase. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 13869–13874.
- 17 Nishimura K, Murozumi K, Shirahata A, Park MH, Kashiwagi K & Igarashi K (2005) Independent roles of eIF5A and polyamines in cell proliferation. *Biochem J* **385**, 779–785.
- 18 Hanawa-Suetsugu K, Sekine S, Sakai H, Hori-Takemoto C, Terada T, Unzai S, Tame JR, Kuramitsu S, Shirouzu M & Yokoyama S (2004) Crystal structure of elongation factor P from *Thermus thermophilus* HB8. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 9595–9600.
- 19 Facchiano AM, Stiuso P, Chiusano ML, Caraglia M, Giuberti G, Marra M, Abbruzzese A & Colonna G (2001) Homology modelling of the human eukaryotic initiation factor 5A (eIF-5A). *Protein Eng* **14**, 881–890.
- 20 Costa-Neto CM, Parreiras ESLT, Ruller R, Oliveira EB, Miranda A, Oliveira L & Ward RJ (2006) Molecular modeling of the human eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) based on spectroscopic and computational analyses. *Biochem Biophys Res Commun* **347**, 634–640.
- 21 Kim KK, Hung L-W, Yokota H, Kim R & Kim SH (1998) Crystal structures of eukaryotic translation initiation factor 5A from *Methanococcus jannaschii* at 1.8 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 10419–10424.
- 22 Peat TS, Newman J, Waldo GS, Berendzen J & Terwilinger TC (1998) Structure of translation initiation factor 5A from *Pyrobaculum aerophilum* at 1.75 Å resolution. *Structure* **6**, 1207–1214.
- 23 Yao M, Ohsawa A, Kikukawa S, Tanaka I & Kimura M (2003) Crystal structure of hyperthermophilic archaeal initiation factor 5A: a homologue of eukaryotic initiation factor 5A (eIF-5A). *J Biochem (Tokyo)* **133**, 75–81.
- 24 Benne R, Brown-Luedi ML & Hershey JW (1978) Purification and characterization of protein synthesis initiation factors eIF-1, eIF-4C, eIF-4D, and eIF-5 from rabbit reticulocytes. *J Biol Chem* **253**, 3070–3077.
- 25 Smit-McBride Z, Schnier J, Kaufman RJ & Hershey JW (1989) Protein synthesis initiation factor eIF-4D. Functional comparison of native and unhyposinated forms of the protein. *J Biol Chem* **264**, 18527–18530.
- 26 Park MH (1989) The essential role of hypusine in eukaryotic translation initiation factor 4D (eIF-4D). Purification of eIF-4D and its precursors and comparison of their activities. *J Biol Chem* **264**, 18531–18535.
- 27 Kang HA & Hershey JW (1994) Effect of initiation factor eIF-5A depletion on protein synthesis and proliferation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **269**, 3934–3940.
- 28 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**, 583–598.
- 29 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**, 1358–1366.
- 30 Hanauske-Abel HM, Slowinska B, Zagulska S, Wilson RC, Staiano-Coico L, Hanauske AR, McCaffrey T & Szabo P (1995) Detection of a sub-set of polysomal mRNAs associated with modulation of hypusine

- formation at the G1–S boundary. Proposal of a role for eIF-5A in onset of DNA replication. *FEBS Lett* **366**, 92–98.
- 31 Lipowsky G, Bischoff FR, Schwarzmaier P, Kraft R, Kostka S, Hartmann E, Kutay U & Görlich D (2000) Exportin 4: a mediator of a novel nuclear export pathway in higher eukaryotes. *EMBO J*, **19**, 4362–4371.
 - 32 Xu A, Jao DL & Chen KY (2004) Identification of mRNA that binds to eukaryotic initiation factor 5A by affinity co-purification and differential display. *Biochem J* **384**, 585–590.
 - 33 Wagner S & Klug G (2007) An archaeal protein with homology to the eukaryotic translation initiation factor 5A shows ribonucleolytic activity. *J Biol Chem* **282**, 13966–13976.
 - 34 Zuk D & Jacobson A (1998) A single amino acid substitution in yeast eIF-5A results in mRNA stabilization. *EMBO J* **17**, 2914–2925.
 - 35 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**, 393–405.
 - 36 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**, 1571–1581.
 - 37 Chatterjee I, Gross SR, Kinzy TG & Chen KY (2006) Rapid depletion of mutant eukaryotic initiation factor 5A at restrictive temperature reveals connections to actin cytoskeleton and cell cycle progression. *Mol Genet Genomics* **275**, 264–276.
 - 38 Schrader R, Young C, Kozian D, Hoffmann R & Lottspeich F (2006) Temperature-sensitive eIF5A mutant accumulates transcripts targeted to the nonsense-mediated decay pathway. *J Biol Chem* **281**, 35336–35346.
 - 39 Zanelli CF & Valentini SR (2007) Is there a role for eIF5A in translation? *Amino Acids* **33**, 351–358.
 - 40 Lee YB, Joe YA, Wolff EC, Dimitriadis EK & Park MH (1999) Complex formation between deoxyhypusine synthase and its protein substrate, the eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) precursor. *Biochem J* **340**, 273–281.
 - 41 Thompson GM, Cano VS & Valentini SR (2003) Mapping eIF5A binding sites for Dys1 and Lia1: in vivo evidence for regulation of eIF5A hypusination. *FEBS Lett* **555**, 464–468.
 - 42 Ruhl M, Himmelsbach M, Bahr GM, Hammerschmid F, Jaksche H, Wolff B, Aschauer H, Farrington GK, Probst H, Bevec D *et al.* (1993) Eukaryotic initiation factor 5A is a cellular target of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain mediating trans-activation. *J Cell Biol* **123**, 1309–1320.
 - 43 Schatz O, Oft M, Dascher C, Schebesta M, Rosorius O, Jaksche H, Dobrovnik M, Bevec D & Hauber J (1998) Interaction of the HIV-1 rev cofactor eukaryotic initiation factor 5A with ribosomal protein L5. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 1607–1612.
 - 44 Hofmann W, Reichart B, Ewald A, Müller E, Schmitt I, Stauber RH, Lottspeich F, Jockusch BM, Scheer U, Hauber J *et al.* (2001) Cofactor requirements for nuclear export of Rev response element (RRE)- and constitutive transport element (CTE)-containing retroviral RNAs: an unexpected role for actin. *J Cell Biol* **152**, 895–910.
 - 45 Singh US, Li Q & Cerione R (1998) Identification of the eukaryotic translation initiation factor 5A as a retinoic acid-stimulated cellular binding partner for a tissue transglutaminase II. *J Biol Chem* **273**, 1946–1950.
 - 46 Mehta KD, Leung D, Lefebvre L & Smith M (1990) The ANB1 locus of *Saccharomyces cerevisiae* encodes the protein synthesis initiation factor eIF-4D. *J Biol Chem* **265**, 8802–8807.
 - 47 Schwelberger HG, Kang HA & Hershey JW (1993) Translation initiation factor eIF-5A expressed from either of two yeast genes or from human cDNA. Functional identity under aerobic and anaerobic conditions. *J Biol Chem* **268**, 14018–14025.
 - 48 Clement PC, Henderson CA, Jenkins ZA, Smit-McBride Z, Wolff EC, Hershey JWB, Park MH & Johansson HE (2003) Identification and characterization of eukaryotic initiation factor 5A-2. *Eur J Biochem* **147**, 4254–4263.
 - 49 Boeke JD, Trueheart J, Natsoulis G & Fink GR (1987) 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods Enzymol* **154**, 164–175.
 - 50 Joe YA & Park MH (1994) Structural features of the eIF-5A precursor required for posttranslational synthesis of deoxyhypusine. *J Biol Chem* **269**, 25916–25921.
 - 51 Kang KR, Kim YS, Wolff EC & Park MH (2007) Specificity of the deoxyhypusine hydroxylase–eukaryotic translation initiation factor (eIF5A) interaction: identification of amino acid residues of the enzyme required for binding of its substrate, deoxyhypusine-containing eIF5A. *J Biol Chem* **282**, 8300–8308.
 - 52 Parreiras-e-Silva LT, Gomes MD, Oliveira EB & Costa-Neto CM (2007) The N-terminal region of eukaryotic translation initiation factor 5A signals to nuclear localization of the protein. *Biochem Biophys Res Commun* **363**, 393–398.
 - 53 Wolff EC, Kang KR, Kim YS & Park MH (2007) Post-translational synthesis of hypusine: evolutionary progression and specificity of the hypusine modification. *Amino Acids* **33**, 341–350.
 - 54 Park MH (1988) The identification of a eukaryotic initiation factor 4D precursor in spermidine-depleted Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* **263**, 7447–7449.
 - 55 Klier H, Csonga R, Joao HC, Eckerskorn C, Auer M, Lottspeich F & Eder J (1995) Isolation and structural characterization of different isoforms of the hypusine-containing protein eIF-5A from HeLa cells. *Biochemistry* **34**, 14693–14702.

- 56 Liu YP, Nemeroff M, Yan YP & Chen KY (1997) Interaction of eukaryotic initiation factor 5A with the human immunodeficiency virus type 1 Rev response element RNA and U6 snRNA requires deoxyhypusine or hypusine modification. *Biol Signals* **6**, 166–174.
- 57 Joe YA, Wolff EC & Park MH (1995) Cloning and expression of human deoxyhypusine synthase cDNA. Structure–function studies with the recombinant enzyme and mutant proteins. *J Biol Chem* **270**, 22386–22392.
- 58 Clement PM, Hanauske-Abel HM, Wolff EC, Kleinman HK & Park MH (2002) The antifungal drug ciclopirox inhibits deoxyhypusine and proline hydroxylation, endothelial cell growth and angiogenesis in vitro. *Int J Cancer* **100**, 491–498.