

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE QUÍMICA - CÂMPUS DE ARARAQUARA

**Análise da interação funcional de eIF5A com a tradução,
repressão da tradução e degradação de mRNA
em *Saccharomyces cerevisiae***

Juliana Sposto Avaca Crusca

Tese de Doutorado

Araraquara

2011

JULIANA SPOSTO AVACA CRUSCA

**Análise da interação funcional de eIF5A com a tradução,
repressão da tradução e degradação de mRNA
em *Saccharomyces cerevisiae***

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini

Co-orientador: Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli

Araraquara

2011

FICHA CATALOGRÁFICA

A945a Avaca-Crusca, Juliana Sposto
Análise da interação funcional de eIF5A com a tradução,
repressão da tradução e degradação de mRNA em
Saccharomyces cerevisiae / Juliana Sposto Avaca Crusca. –
Araraquara : [s.n], 2011
128 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,

Instituto de Química

Orientador: Sandro Roberto Valentini
Coorientador: Cleslei Fernando Zanelli

1. Biotecnologia. 2. eIF5A. 3. Biologia molecular.
4. Genética de leveduras. I. Título.

Curriculum Vitae

Formação Acadêmica/Titulação

- 2007 - 2011** Doutorado em Biotecnologia.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
Título: Análise da interação funcional de eIF5A com a tradução, repressão da tradução e degradação de mRNA em *Saccharomyces cerevisiae*.
Orientador: Sandro Roberto Valentini
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- 2010 - 2010** Doutorado em Estágio sanduíche no exterior.
Instituto de Química de Araraquara - UNESP, IQ - AR, Brasil
com período sanduíche em *Academy of Sciences of the Czech Republic*
(Orientador : Jiri Hasek)
Título: Análise da interação funcional entre eIF5A, a repressão da tradução e a degradação de mRNA em *S. cerevisiae*, Ano de obtenção: 2011
Orientador: Jiri Hasek
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2004 - 2007** Mestrado em Biotecnologia.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
Título: A proteína quinase dependente de ciclina NcPHO85 de *Neurospora crassa*.
Estudos de caracterização molecular e bioquímica., Ano de obtenção: 2007
Orientador: Maria Celia Bertolini
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 1999 - 2003** Graduação em Farmácia Bioquímica.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil

Formação complementar

- 2011 - 2011** Curso de curta duração em MicroRNAs: Papel Regulatório e Métodos de Análise.
Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu-SP
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
- 2007 - 2007** Curso de curta duração em Curso Restrito a Novos Usuários de Real Time.
Applied Biosystems do Brasil Ltda., AB, Brasil
- 2004 - 2004** Curso de curta duração em Expressão Diferencial de Genes Em Fungos Interação.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
- 2004 - 2004** Curso de curta duração em Molecular And Cellular Biology Of The Yeast Saccha.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
- 2004 - 2004** Expressão diferencial de genes em fungos.
Centro Brasileiro-Argentino de Biotecnologia, CBAB, Brasil
- 2003 - 2003** Curso de curta duração em Infecção Hospitalar.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
- 2003 - 2003** Curso de curta duração em Novas Técnicas de Diagnóstico Em Análises Clínicas.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
- 2002 - 2002** Curso de curta duração em Clonagem Gênica e Suas Aplicações na Biotecnologia.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
- 2000 - 2000** Curso de curta duração em Biologia Molecular Aplicada Às Análises Clínicas e.

	Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
2000 - 2000	Curso de curta duração em Correlação Clínico Laboratorial de Doenças Endócr. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
1999 - 1999	Curso de curta duração em Quimioterápicos no Tratamento Oncológico. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
1999 - 1999	Curso de curta duração em Infecção Hospitalar. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
1999 - 1999	Curso de curta duração em O Profissional Farmacêutico e Mercado de Trabalho. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
1999 - 1999	Curso de curta duração em Vacinas Gênicas. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
1999 - 1999	Curso de curta duração em Introdução a Hemotoxicologia. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil

Atuação profissional

1. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP - FCFAR - UNESP

Vínculo institucional

2007 - Atual Vínculo: Aluna de doutorado , Enquadramento funcional: Pesquisadora e aluna , Carga horária: 40, Regime: Dedicação Exclusiva

Atividades

03/2007 - 07/2007 Estágio, Laboratório de Biologia Molecular e Celular de microrganismos
Estágio: Estágio no laboratório

2. Academy of Sciences of the Czech Republic - AS CR

Vínculo institucional

2010 - 2010 Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Bolsita CAPES/PDEE , Carga horária: 40

Atividades

2010 - 2010 Projetos de pesquisa, Institute of Microbiology of ASCR, v.v.i.
Participação em projetos:
Análise do envolvimento de eIF5A com a via de degradação de mRNA em Saccharomyces cerevisiae

3. Instituto de Química de Araraquara - UNESP - IQ - AR

Vínculo institucional

2004 - 2007 Vínculo: outro , Enquadramento funcional: Aluna de pós-graduação (mestrado) , Carga horária: 40, Regime: Dedicação Exclusiva

4. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP

Vínculo institucional

1999 - 2003 Vínculo: Outro , Enquadramento funcional: Aluna de Graduação, Regime: Dedicção Exclusiva

Atividades

- 2007 - 2011** Projetos de pesquisa, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara
Participação em projetos:
Análise da interação funcional de eIF5A com a tradução, repressão da tradução e degradação de mRNA Saccharomyces cerevisiae
- 10/2002 - 06/2003** Conselhos, Comissões e Consultoria, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Departamento de Análises Clínicas
Especificação:
Representante Discente no Conselho de Departamento
- 01/2001 - 12/2001** Estágio, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Departamento de Análises Clínicas
Estágio:
Iniciação Científica - CNPq
- 09/2000 - 12/2000** Estágio, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Departamento de Análises Clínicas
Estágio:
Estágio de Treinamento em Micologia Clínica
- 04/2000 - 03/2001** Conselhos, Comissões e Consultoria, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara
Especificação:
Representante Discente na Comissão Permanente de Pesquisa
- 08/1999 - 12/1999** Estágio, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Departamento de Análises Clínicas
Estágio:
Estágio de Treinamento em Microbiologia Clínica

Projetos

- 2010 - 2010** Análise do envolvimento de eIF5A com a via de degradação de mRNA em *Saccharomyces cerevisiae*
Descrição: Projeto de doutorado sanduiche realizado no "Laboratory of Cell Reproduction", sob supervisão do PhD Jiri Hasek, realizado na "Academy of Sciences of the Czech Republic".
Situação: Em Andamento Natureza: Pesquisa
Alunos envolvidos: Doutorado (2);
Integrantes: Juliana Sposto Avaca Crusca (Responsável); ; Cleslei Fernando Zanelli; Sandro Roberto Valentini; Jiri Hasek; Tomas Grousl
Financiador(es): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES
- 2007 - 2011** Análise da interação funcional de eIF5A com a tradução, repressão da tradução e degradação de mRNA em *Saccharomyces cerevisiae*
Situação: Em Andamento Natureza: Pesquisa
Alunos envolvidos: Doutorado (1);
Integrantes: Juliana Sposto Avaca Crusca; Cleslei Fernando Zanelli; Sandro Roberto Valentini (Responsável)
Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP

Produção em C, T&A

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. GREGIO, A. P. B., CANO, V. S. P., AVACA, J. S. e/ou AVACA-CRUSCA, J. S., VALENTINI, S. R., ZANELLI, C. F.
eIF5A HAS A FUNCTION IN THE ELONGATION STEP OF TRANSLATION IN YEAST.
Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 380, p. 785 - 790, 2009.

Artigos completos aceito para publicação em periódicos

1. GONDIM, J. O.; MOREIRA-NETO, J. J. S.; GOMES, D. A. S.; AVACA, J. S. e/ou AVACA-CRUSCA, J. S.; VALENTINI, S. R.; ZANELLI, C. F.; SPOLIDORIO, D. M. P.; GIRO, E. M. A.
Effect of a calcium hydroxide/chlorhexidine paste as intracanal dressing in human primary teeth with necrotic pulp against *P. gingivalis* and *E. faecalis*.
International Journal of Paediatric Dentistry, 2011. *In press*.

Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

1. Grousl, T, AVACA, J. S. e/ou AVACA-CRUSCA, J. S., VALENTINI, S. R., HASEK, J.
Stress Induced Rearrangement of Actin Cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae* In: 19th Cytoskeletal club, 2011, Vranovská Ves, Rep Tcheca.
19th Cytoskeletal club - Czechoslovak Biological Society. Praga, Rep Tcheca, 2011.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. AVACA, J. S. E/OU AVACA-CRUSCA, J. S., RAYMUNDO, D. P., ROSSI, D., BELLATO, H. M.; GROUSL, T.; ZANELLI, C. F.; HASEK, J.; VALENTINI, S. R.
Sbp1 is a high-copy suppressor of the *tif51A-1 ts* phenotype and associates with heat-induced stress granules. In: 25th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology, 2011. Olsztyn/Kortowo - Polônia. **Yeast**. Wiley-Blackwell, v. 27, 2011.
2. RAYMUNDO, D. P., AVACA, J. S. e/ou AVACA-CRUSCA, J. S., ROSSI, D., VALENTINI, S. R., ZANELLI, C. F.
Analysis of genetic interactions between mutants of eIF5A and mRNA decay factors in *S. cerevisiae*. In: XL Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2011, Foz do Iguaçu - PR. **Anais da XL Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, 2011.
3. AVACA, J. S. e/ou AVACA-CRUSCA, J. S., RAYMUNDO, D. P., VALENTINI, S. R., ZANELLI, C. F.
Study of the Involvement of eIF5A with the mRNA Decay Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. XXXIX Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2010, Foz do Iguaçu - PR. **XXXIX Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology**, 2010.
4. GREGIO, A. P. B., CANO, V. S. P., AVACA, J. S. e/ou AVACA-CRUSCA, J. S., RAYMUNDO, D. P., VALENTINI, S. R., ZANELLI, C. F.
A role for eIF5A in the elongation step of translation. In: XXXVIII Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2009, Águas de Lindóia - SP.
XXXVIII Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology, 2009.
5. GONDIM, J. O., MOREIRA-NETO, J. J. S., GOMES, D. A. S., AVACA, J. S. e/ou AVACA-CRUSCA, J. S., ZANELLI, C. F., SPOLIDORIO, D. M. P., GIRO, E. M. A.
Efeito da pasta de hidróxido de cálcio associada a clorexedina no tratamento de dentes decíduos humanos com polpa necrosada. In: 26ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 2009, Águas de Lindóia - SP. **26ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica**, 2009.

6. GREGIO, A. P. B., CANO, V. S. P., AVACA, J. S. e/ou AVACA-CRUSCA, J. S., RAYMUNDO, D. P., VALENTINI, S. R., ZANELLI, C. F.

eIF5A has a function in the elongation step of translation in yeast. In: 24th International Yeast Genetics and Molecular Biology & Molecular Biology Conference, 2009. Manchester - UK. **Yeast**. Wiley-Blackwell, v. 26, 2009.

7. AVACA, J. S. e/ou AVACA-CRUSCA, J. S., ZANELLI, C. F., VALENTINI, S. R.

Functional interaction analysis between the proteins eIF5A and Sbp1 in *Saccharomyces cerevisiae*. In: XXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2008, Águas de Lindóia - SP. **XXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, 2008.

8. AVACA, J. S. e/ou AVACA-CRUSCA, J. S., BERTOLINI, Maria Célia

Molecular and biochemical characterization of the NcPHO85 cyclin-dependent protein kinase from *Neurospora crassa*. In: XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq) and 10th International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) Conference, 2007, Salvador - Bahia. **Livro de Resumos**, 2007.

9. AVACA, J. S. e/ou AVACA-CRUSCA, J. S., Terenzi, H. F., BERTOLINI, Maria Célia

Inactivation of the NcPho85 Gene Encoding the Pho85p-Like Protein Kinase of *Neurospora crassa*. In: XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2006, Águas de Lindóia - SP. **Livro de resumos**, 2006.

10. AVACA, J. S. e/ou AVACA-CRUSCA, J. S., PAULA, Renato Magalhães de, FREITAS, Fernanda Zanolli, TERENCE, Heitor Francisco, BERTOLINI, Maria Célia

Molecular Cloning of the Pho85p-Like Protein Kinase in *Neurospora crassa*. In: XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2005, Águas de Lindóia - SP. **XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, 2005.

11. AVACA, J. S. e/ou AVACA-CRUSCA, J. S., SILVA, Juliana L Monteiro da, ANDREOTTI, Patrícia F., GIANNINI, Maria José Soares Mendes

Interação de *Paracoccidioides brasiliensis* com Células Endoteliais. In: XIII Congresso de Iniciação Científica-UNESP, 2001, Bauru-SP. **Anais do XIII Congresso de Iniciação Científica-UNESP**, 2001.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. GONDIM, J. O., AVACA, J. S. e/ou AVACA-CRUSCA, J. S., ZANELLI, C. F., VALENTINI, S. R., SPOLIDORIO, D. M. P., GIRO, E. M. A.

Eficácia antibacteriana da pasta de hidróxido de cálcio associada à clorexedina como medicação intracanal em dentes decíduos humanos. In: 40º Encontro do Grupo Brasileiro de Professores de Ortodontia e Odontopediatria, 2009, São Pedro - SP. **40º Encontro do Grupo Brasileiro de Professores de Ortodontia e Odontopediatria**, 2009.

Produção Técnica

Demais produções técnicas

1. AVACA, J. S. e/ou AVACA-CRUSCA, J. S.

Curso de Especialização em Biotecnologia, 2008 (Especialização, Curso de curta duração ministrado).

JULIANA SPOSTO AVACA CRUSCA

Tese de Doutorado apresentada ao
Instituto de Química, Universidade
Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Doutor em Biotecnologia.

Araraquara, 22 de julho de 2011.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini (Orientador)
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Paulo Sergio Rodrigues Coelho
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, Ribeirão Preto



Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – CCBS – UFSCAR, São Carlos



Prof. Dr. Iran Malavazi
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – CCBS – UFSCAR, São Carlos



Profª Drª Carla Columbano de Oliveira
Instituto de Química – USP, São Paulo

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Maria Regina e Luis Alberto, que sempre me conduziram pelo melhor caminho, apoiando minhas decisões, e sempre permitindo meu aprendizado e crescimento pessoal. Eles são meus exemplos de vida pessoal e profissional.

Ao meu marido, Edson Crusca Junior, que desde o início esteve ao meu lado, nos momentos de alegrias e conquistas e também nas decepções e dificuldades da vida acadêmica e pessoal. Pelos maravilhosos momentos vividos juntos, pela força, compreensão, carinho, paciência e atenção.

A Deus, pelos desafios, facilidades e pessoas que Ele colocou em meu caminho, que apesar das dificuldades, me trouxeram tantas alegrias e conquistas.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao meu orientador, Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini, pela oportunidade, ensinamentos, apoio e valiosas discussões e sugestões.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli pelos ensinamentos.

Ao Prof. Jiří Hašek do *Laboratory of Cell Reproduction*, da *Academy of Sciences of the Czech Republic*, em Praga na República Tcheca, que me recebeu muito cordialmente em seu laboratório onde desenvolvi parte da minha pesquisa.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, em especial o Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli e Prof. Dr. Maria Célia Bertolini pela excelente coordenação do Programa.

A minha mãe e ao meu pai por toda minha vida, pelo amor, carinho, incentivo, e pelos sábios aconselhamentos desde sempre.

Ao Junior por todo amor, carinho, paciência, apoio e compreensão em todos os momentos vividos juntos.

Aos integrantes atuais e aos que passaram pelo laboratório BioMol VZ Diana, Camila, Ana Paula, Danuza, Veridiana, Daniella, Laura, Sílvia, Tatiana, Tati Maria, Thaís, Eliane, Karina, Beatriz, Fábio, Paulo, Eric, Kadu, Hermano e Luciano, pela amizade, pela colaboração, pelas conversas e dúvidas esclarecidas, além dos bons momentos e convivência.

Aos integrantes do *Laboratory of Cell Reproduction*, da *Academy of Sciences of the Czech Republic*, em Praga na República Tcheca, Tomas, Ivana M., Ivana F., Pavla, Renata, Mirka, Lenka e Jarmila, pela ajuda, apoio e amizade.

As funcionárias da Biblioteca e da Seção de Pós-Graduação.

A todos os funcionários do Instituto de Química e da Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científica e Tecnológico), FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e Capes (Coordenadoria de Aperfeiçoamento Profissional de Ensino Superior) pelas bolsas de doutorado e doutorado sanduíche concedidas.

Muito obrigada a todos vocês que de alguma maneira contribuíram para formação pessoal e profissional.

RESUMO

O provável fator de início de tradução 5A (eIF5A) é altamente conservado de arqueas a mamíferos e sofre uma modificação pós-traducional única e essencial, em que uma lisina específica é convertida em um resíduo de hipusina. Este fator já foi relacionado ao transporte nucleocitoplasmático, à degradação de mRNA e à proliferação celular. Dados recentes restabelecem uma função para eIF5A na tradução e sugerem a sua atuação na etapa de alongação ao invés de início, como originalmente proposto. Uma vez que o envolvimento de eIF5A com a degradação de mRNA ainda não foi elucidado, tornou-se interessante estudar qual a natureza desta relação. O metabolismo de mRNA é um processo complexo que envolve as etapas da tradução (mRNAs nos polissomos), repressão da tradução (mRNAs acumulados em grânulos de estresse) e degradação de mRNA (mRNAs nos *P bodies*). Os componentes da maquinaria de degradação de mRNA acumulam-se nos *P bodies* e, neste trabalho, foi verificado que eIF5A não se localiza nestes corpúsculos. Ainda, foi avaliada a formação de *P bodies* no mutante *tif51A-3*, na temperatura não permissiva (38°C), e foi verificada uma inibição na formação de *P bodies*. Outros mutantes com defeitos na alongação da tradução, como *cca1-1* e *eft2*^{H699K}, também apresentaram defeito na agregação dos *P bodies*. Foi avaliada a existência de interação genética sintética entre os mutantes *tif51A-1* e *tif51A-3* e mutantes de fatores envolvidos com a repressão da tradução e/ou degradação de mRNA. Foi revelada uma supressão parcial do fenótipo de termossensibilidade com nocautes dos genes *SBP1*, *DHH1* e *PAT1*, que codificam fatores ativadores da remoção do capacete e repressores da tradução. Por outro lado, uma interação sintético doente entre os mutantes *tif51A-1* e *xrn1Δ* foi observada. Por fim, a agregação de grânulos de estresse induzidos por choque térmico foi testada. Os mutantes *tif51A-3*, *tif51A*^{Q22H/L93F} e *tif51A*^{K56A} apresentaram reduzida formação de grânulos de estresse, especialmente o mutante *tif51A-3*. Foi mostrado que os fatores eIF5A e Sbp1 também se agregam nos grânulos de estresse induzido por choque térmico. Os dados obtidos reforçam o envolvimento de eIF5A com a alongação da tradução, mostram que o efeito de eIF5A na degradação de mRNA é secundário e sugerem uma função para eIF5A como ativador da tradução.

ABSTRACT

The putative translation initiation factor 5A (eIF5A) is highly conserved from archaea to mammals and undergoes an unique and essential post-translational modification, in which a specific lysine residue is converted into a hypusine residue. This factor has been involved in several cellular processes such as nucleocytoplasmic transport, mRNA decay and cell proliferation. Recent data have re-established a function for eIF5A in translation and suggests a role in elongation rather than initiation as originally proposed. Since the involvement of eIF5A with mRNA decay has not been elucidated it has become interesting to study the aspects of this relationship. mRNA metabolism is a complex process that involves the steps of translation (mRNAs on the polysomes), translation repression (mRNAs accumulated in granules) and mRNA degradation (mRNAs in P bodies). The mRNA degradation machinery accumulates in P bodies and in this study we have verified that eIF5A is not localized inside them. P bodies assembly was evaluated in the *tif51A-3* mutant at non-permissive temperature and this aggregation was inhibited. Other mutant strains with defects in translation elongation, such as *cca1-1* e *eft2*^{H699K}, also presented defective P body assembly. The existence of synthetic genetic interactions between the eIF5A mutants, *tif51A-1* and *tif51A-3*, and translation repression and/or mRNA decay mutants was evaluated. A partial suppression of the temperature sensitive phenotype of the eIF5A mutants was revealed when *SBP1*, *DHH1* and *PAT1* genes were deleted. Since those proteins are decapping activators and translational repressors these interactions reveal a putative function for eIF5A as an inhibitor of translation repression. However, a synthetic sick phenotype between *tif51A-1* and *xrn1Δ* mutants was observed. Finally, stress granules assembly was induced by robust heat shock in eIF5A mutants, specifically *tif51A-3*, *tif51A*^{Q22H/L93F} e *tif51A*^{K56A}. Stress granules formation was reduced for all strains, especially for the *tif51A-3* mutant. Moreover, the factors eIF5A and Sbp1 also aggregate in stress granules induced by robust heat shock. The present data reinforce the involvement of eIF5A with translation elongation, showing that eIF5A has a secondary effect in mRNA decay and suggests a role for eIF5A as an activator of translation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Etapas do início da tradução em eucariotos	25
Figura 2.	Ciclo da elongação da tradução em eucariotos	26
Figura 3.	Reação de terminação da tradução	27
Figura 4.	Alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos de eIF5A de diferentes organismos	37
Figura 5.	Via de biossíntese do resíduo de aminoácido hipusina em eIF5A	38
Figura 6.	Principais vias de degradação do mRNA eucariótico	46
Figura 7.	Metabolismo de mRNA	47
Figura 8.	eIF5A não se localiza nos <i>P bodies</i> em diferentes condições de estresse	67
Figura 9.	O mutante <i>tif51A-3</i> não forma <i>P bodies</i> na temperatura não permissiva	68
Figura 10.	O mutante <i>cca1-1</i> não forma <i>P bodies</i> na temperatura não permissiva	69
Figura 11.	O dominante negativo <i>eft2</i> ^{H699K} apresenta diminuída formação de <i>P bodies</i> na temperatura não permissiva	70
Figura 12.	Resposta à repressão da tradução dos mutantes <i>tif51A-1</i> e <i>xrn1Δ</i> induzida por depleção de glicose	73
Figura 13.	Os mutantes <i>tif51A-1</i> e <i>xrn1Δ</i> são sintético doentes	77
Figura 14.	Os mutantes duplo <i>tif51A-1 lsm1Δ</i> e triplo <i>tif51A-1 dcp1-2 ski8Δ</i> não apresentam interação genética sintética	78
Figura 15.	Os mutantes duplos <i>tif51A-1</i> ou <i>tif51A-3</i> e <i>sbp1Δ</i> apresentam interações genéticas sintéticas por supressão parcial do defeito de crescimento	79
Figura 16.	O mutante duplo <i>tif51A-3 dhh1Δ</i> apresenta interação genética sintética por supressão parcial do defeito de crescimento	80
Figura 17.	O mutante duplo <i>tif51A-3</i> e <i>pat1Δ</i> apresenta interação genética sintética por supressão parcial do defeito de crescimento	81
Figura 18.	Os mutantes estáveis de eIF5A possuem defeito na formação de grânulos de estresse induzidos por choque térmico	89
Figura 19.	Os mutantes <i>tif51A-3</i> e <i>tif51A</i> ^{Q22H/L93F} apresentam defeito na formação de grânulos de estresse induzidos por choque térmico	90
Figura 20.	Os mutantes de eIF5A apresentam parada no início da tradução após choque térmico	91
Figura 21.	Co-localização de eIF5A com a proteína Dcp2 nos grânulos de estresse	92
Figura 22.	Co-localização de eIF5A com a proteína Ngr1 nos grânulos de estresse	93
Figura 23.	Co-localização de eIF5A com a proteína eEF3 nos grânulos de estresse	94
Figura 24.	Presença de Sbp1 nos grânulos de estresse induzidos por choque térmico	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Linhagens utilizadas nos experimentos	53
Tabela 2.	Plasmídeos utilizados nos experimentos	56
Tabela 3.	Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos	57
Tabela 4.	Resultados da interações genéticas sintéticas	82

ABREVIações E SIGLAS

µg	micrograma
µL	microlitro
°C	graus Celcius
5'-UTR	região 5'-não traduzida
⁷ mG	capacete de 7-metil-guanosina
ATP	desoxirriboadenosina trifosfatada
ATPase	hidrolase que se liga a ATP
C-terminal	carboxi-terminal
Caf4	<i>CCR4 Associated Factor 4</i>
Caf16	<i>CCR4 Associated Factor 16</i>
Caf40	<i>CCR4 Associated Factor 40</i>
Caf130	<i>CCR4 Associated Factor 130</i>
Ccr4	<i>Carbon Catabolite Repression 4</i>
CHX	ciclo-heximida
cm	centímetro
CRM	<i>Chromosome Region Maintenance 1</i>
Dcp1	<i>mRNA DeCaPping 1</i>
Dcp2	<i>mRNA DeCaPping 2</i>
Dhh1	<i>DExD/H-box Helicase</i>
DIC	<i>Differential Interference Contrast</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	mistura dos desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dATP, dCTP, dGTP e dTTP)
D.O.	densidade ótica
DTT	ditiotreitol
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
eEF's	fatores de elongação da tradução
eEF1A	<i>Eukaryotic translation Elongation Factor 1A</i>
eEF2	<i>Eukaryotic translation Elongation Factor 2</i>
eEF3	<i>Eukaryotic translation Elongation Factor 3</i>
EF-P	<i>Eubacterial Elongation Factor P</i>
eIF's	fatores de início de tradução
eIF1	<i>Eukaryotic translation Initiation Factor 1</i>
eIF1A	<i>Eukaryotic translation Initiation Factor 1A</i>
eIF2	<i>Eukaryotic translation Initiation Factor 2</i>

eIF3	<i>Eukaryotic translation Initiation Factor 3</i>
eIF4E	<i>Eukaryotic translation Initiation Factor 4E</i>
eIF4A	<i>Eukaryotic translation Initiation Factor 4A</i>
eIF4G	<i>Eukaryotic translation Initiation Factor 4G</i>
eIF4F	<i>Eukaryotic translation Initiation Factor 4F</i>
eIF4B	<i>Eukaryotic translation Initiation Factor 4B</i>
eIF5	<i>Eukaryotic translation Initiation Factor 5</i>
eIF5A	<i>Eukaryotic translation Initiation Factor 5A</i>
eIF5B	<i>Eukaryotic translation Initiation Factor 5B</i>
eRF1	<i>Eukaryotic translation Release Factor 1</i>
eRF3	<i>Eukaryotic translation Release Factor 3</i>
g	grama
GC7	<i>N1-Guanil-diaminoheptano</i>
GDP	desoxirriboguanidina difosfatada
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GIC1	<i>GTPase Interactive Component</i>
GTP	desoxirriboguanidina trifosfatafa
GTPase	hidrolase que se liga a GTP
GW182	<i>glycine/tryptophan (GW) rich protein</i>
h	hora
HIV-1	vírus da imunodeficiência humana 1
HSP150	<i>Heat Shock Protein 150</i>
IRES	<i>Internal Ribosome Entry Sites</i>
kb	quilobase
kDa	quilodalton
L11	proteína ribossomal da subunidade 60S
Lsm1-7	<i>Like Sm1-7</i>
M	molar
MAP	<i>Mitogen-Activated signaling Pathway</i>
mCh	<i>mCherry</i>
Met-tRNA _i	<i>Methionin initiator tRNA</i>
mg	miligrama
miRNA	micro RNA
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar

mRNA	RNA mensageiro
mRNP	<i>messenger Ribonucleoprotein</i>
N	normal
N-terminal	amino-terminal
ng	nanograma
Ngr1	<i>Negative Growth Regulatory protein 1</i>
nm	nanômetro
NMD	<i>Non-sense Mediated Decay</i>
Not1-5	<i>(alias CDC39) Cell Division Cycle</i>
ODC	ornitina descarboxilase
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
P0	proteína ribossomal da subunidade 60S
PAB1	<i>Poly(A) Binding protein</i>
Pat1	<i>Protein Associated with Topoisomerase II</i>
pb	pares de base
<i>P bodies</i>	<i>Processing bodies</i>
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PCI	solução de fenol:clorofórmio:ácido isoamílico (25:24:1)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDB	<i>Protein Data Base</i>
PEG	polietilenoglicol
pH	potencial hidrogeniônico
<i>PKC1</i>	<i>Protein Kinase C</i>
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonila
poli(A) ⁺	cauda de poliadenina do mRNA
Pop2	<i>PGK promoter directed OverProduction 2</i>
PRF	<i>Programmed Ribosomal Frameshifting</i>
Rev	proteína de propagação do vírus HIV-1
RFP	<i>Red Fluorescent Protein</i>
RNA	ácido ribonucleico
RNAse	enzima que cliva RNA
rpm	rotação por minuto
S5	proteína ribossomal da subunidade 40S
Sbp1	provável proteína de ligação a RNA
SC	meio sintético completo para levedura
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
SDS	dodecil sulfato de sódio

s	segundo
<i>SIA1</i>	proteína envolvida na ativação da H ⁺ -ATPase Pma1 por glicose
SG	<i>Stress Granules</i>
Ski3	<i>SuperKiller 3</i>
Ski8	<i>SuperKiller 8</i>
<i>SSD1</i>	<i>Suppressor of SIT4 Deletion</i>
TAE	tampão contendo tris, ácido acético e EDTA
TE	tampão tris-EDTA
Tris	tris-hidroximetilaminometano
Triton X-100	polietilenoglicol-terc-octilfenil éter
tRNA	RNA transportador
ts	temperatura sensível
Tub1	<i>TUBulin</i>
U	unidade enzimática
YPD	<i>Yeast extract, Peptone, Dextrose media</i>
Ypt1	<i>Yeast Protein Two</i>
xg	aceleração gravitacional
Xpo1	<i>(alias Crm1) Chromosome Region Maintenance 1</i>
Xrn1	<i>(alias Kem1) Kar-Enhancing Mutations</i>
WSC1	<i>(alias Slg1) Synthetic Lethal with Gap 1</i>
WSC2	<i>cell Wall integrity and Stress response Component 2</i>
WSC3	<i>cell Wall integrity and Stress response Component 3</i>
ZDS1	<i>Zillion Different Screens 1</i>

SUMÁRIO

1.	Introdução	21
1.1.	Síntese de proteínas em eucariotos	22
1.2.	O fator eIF5A	28
1.3.	O metabolismo de mRNA: o papel dos <i>P bodies</i> e dos grânulos de estresse	39
2.	Objetivo Geral	48
3.	Objetivos Específicos	50
4.	Metodologia experimental	52
4.1.	Materiais	53
4.2.	Métodos	58
4.2.1.	Transformação de <i>S. cerevisiae</i>	58
4.2.2.	Reação de PCR	58
4.2.3.	Extração de DNA genômico de levedura	59
4.2.4.	Microscopia de fluorescência para GFP, RFP e mCherry	60
4.2.5.	Perfil polissomal	60
4.2.5.1.	Preparo do gradiente de sacarose	60
4.2.5.2.	Preparo do extrato e centrifugação dos gradientes	61
4.2.5.3.	Fracionamento dos gradientes e coleta das frações	61
4.2.6.	Teste de sensibilidade a temperatura	62
5.	RESULTADOS	63
5.1.	eIF5A e a organização dos <i>P bodies</i>	64
5.2.	Análise do perfil polissomal de mutantes de eIF5A e <i>xrn1Δ</i> em condição de repressão da tradução	71
5.3.	Avaliação da interação genética entre mutantes de eIF5A e de fatores de repressão da tradução e/ou degradação de mRNA	74
5.4.	Avaliação da relação entre os grânulos de estresse, eIF5A e Sbp1	82
6.	DISCUSSÃO	95
6.1.	eIF5A no contexto dos <i>P bodies</i>	96
6.2.	eIF5A no contexto dos fatores de repressão e/ou degradação de mRNA	98
6.3.	eIF5A e Sbp1 no contexto dos grânulos de estresse	99
7.	CONCLUSÕES	103
	REFERÊNCIAS	105
	ANEXO	121

INTRODUÇÃO

1.1. Síntese de proteínas em eucariotos

As proteínas estão entre as biomoléculas mais importantes e abundantes nos seres vivos. É necessário, portanto, que a síntese protéica realizada pelo mecanismo de tradução seja um processo amplamente regulado. A tradução requer uma grande maquinaria biológica, a qual utiliza inúmeros componentes, entre eles, mRNAs, RNAs, tRNAs aminoacilados, enzimas diversas e fatores de tradução (MATHEWS; SONENBERG; HERSHEY, 2007). Os componentes protéicos da maquinaria traducional representam mais de 50% do total das proteínas celulares (MERRICK, 1992). A tradução pode ser dividida em três etapas: início, elongação e término.

O início da tradução consiste basicamente da seleção do mRNA a ser traduzido e da formação do complexo de pré-iniciação 80S com o Met-tRNA_i ligado ao códon iniciador no sítio P (*peptidil*) do ribossomo. As etapas do início da tradução são mostradas na Figura 1 (adaptada de HERSHEY, 2010) e estão descritas a seguir. Primeiramente, à extremidade 5' do mRNA a ser traduzido, mais especificamente no capacete de 7-metil-guanosina (⁷mG), ocorre a ligação de eIF4E, seguido de eIF4G e eIF4A. Estes três fatores de início da tradução (eIF's) formam o complexo eIF4F. Na cauda de poliA do mRNA liga-se Pab1 (*polyA-binding protein*), e por sua vez, a interação eIF4E-eIF4G-Pab1 circulariza o mRNA (GINGRAS; RAUGHT; SONENBERG, 1999; SONENBERG; HINNEBUSCH, 2009). Em seguida, a helicase eIF4A desfaz as estruturas secundárias da extremidade 5'-UTR do mRNA, próximas ao capacete ⁷mG, possibilitando a ligação do ribossomo nesta região (PESTOVA et al., 2001; HERSHEY, 2010; JACKSON; HELLEN; PESTOVA, 2010).

Paralelamente, ocorre a formação do complexo ternário, composto por eIF2-GTP-Met-tRNA_i (PESTOVA; LORSCH; HELLEN, 2007), ao qual se liga a subunidade ribossomal 40S e os fatores eIF1, eIF1A, eIF3 e eIF5. Este novo complexo formado é conhecido como complexo de pré-iniciação 43S (CHAUDHURI; CHOWDHURY; MAITRA, 1999; MAJUMDAR; BANDYOPADHYAY; MAITRA, 2003). Ainda, eIF6 liga-se às subunidades 60S, prevenindo a re-associação prematura do ribossomo 80S. Em seguida, o mRNA circularizado é recrutado e ligado ao complexo 43S através de interações entre eIF4G/eIF4B e eIF3/eIF5, formando o complexo 48S. Posteriormente, o complexo de pré-iniciação escaneia o mRNA até localizar o códon de iniciação, geralmente o primeiro AUG da sequência, e então ocorre uma ligação entre o códon e o anticódon (do mRNA e do Met-tRNA_i). Finalmente, a subunidade

ribossomal 60S acopla-se ao complexo de pré-iniciação 48S formando o complexo de pré-iniciação 80S com o Met-tRNA_i ligado ao sítio P do ribossomo (PESTOVA et al., 2001; HERSHEY, 2010; JACKSON; HELLEN; PESTOVA, 2010).

A elongação da tradução é um processo mais simples e que requer menos fatores do que o início da tradução. O ciclo de elongação pode ser resumido pelo acoplamento dos tRNA aminoacilados ao ribossomo 80S e formação das ligações peptídicas. Este ciclo se utiliza de fatores de elongação (eEF's: eEF1A, eEF1B α (β) γ , eEF2 e eEF3) os quais são responsáveis por manter correta a janela de leitura do mRNA (TAYLOR; FRANK; KINZY, 2007). Uma ilustração da etapa de elongação está mostrada na Figura 2 (adaptada de MERRICK, 1992).

Após o início da tradução, temos o Met-tRNA_i ligado sítio P do ribossomo, o próximo códon a ser traduzido está na posição ribossomal chamada de sítio A (*aminoacyl*), sendo que, eEF1A-GTP é o responsável por ligar e recrutar os tRNAs aminoacilados para o sítio A, assegurando um correto pareamento códon/anti-códon. Ocorrem mudanças conformacionais no ribossomo, seguido de hidrólise do GTP ligado a eEF1A. Em seguida, eEF1A-GDP é liberado, e este será reciclado por eEF1B α (β) γ para gerar um novo eEF1A-GTP. O centro peptidil transferase da subunidade maior do ribossomo catalisa a ligação peptídica entre o aminoacil-tRNA do sítio A e o peptidil-tRNA do sítio P, onde há a cadeia polipeptídica nascente. eEF3 é uma ATPase cuja atividade é estimulada pelo ribossomo, sendo este fator necessário para a ligação do complexo aminoacil-tRNA/eEF1A-GTP no sítio A do ribossomo (TRIANA-ALONSO; CHAKRABURTTY; NIERHAUS, 1995). Após a ligação peptídica, a GTPase eEF2 catalisa a translocação do tRNA em um códon, com hidrólise de GTP (TAYLOR et al., 2009), transferindo o tRNA do sítio A/P (*aminoacyl/peptidil*) para P/E (*peptidil/exit*), deixando um tRNA não carregado no sítio E e o novo peptidil-tRNA no sítio P (MERRICK, 1992; TAYLOR; FRANK; KINZY, 2007). Ainda, eEF3 promove a liberação do tRNA localizado no sítio E do ribossomo durante os ciclos de elongação (TRIANA-ALONSO; CHAKRABURTTY; NIERHAUS, 1995; ANDERSEN et al., 2006), além de atuar na reciclagem das subunidades ribossomais (KURATA et al., 2010).

O término da tradução é mediado pelos fatores eRF1 e eRF3, e está mostrado na Figura 3 (adaptada de FAN-MINOGUE et al., 2008). Na terminação, um dos códons de terminação (UAA, UGA e UAG) é translocado para o sítio A do ribossomo. eRF1 reconhece estes códons e bloqueia a ligação de um novo tRNA.

Além disso, eRF1 promove a atividade GTPásica de eRF3 liberando a cadeia polipeptídica. Por fim, ocorre a reciclagem das subunidades ribossomais 40S e 60S (KAPP; LORSCH, 2004; SALAS-MARCO; BEDWELL, 2004; EHRENBURG et al. 2007; FAN-MINOGUE et al., 2008).

A regulação dos níveis de síntese protéica ocorre principalmente pela fosforilação, e consequente inibição da atividade, dos fatores de início e alongação da tradução. Em células eucarióticas, essa regulação ocorre principalmente na etapa de início da tradução, o que permite um rápido e reversível controle da expressão gênica neste nível (JACKSON, HELLEN, PESTOVA et al., 2010). Entre os fatores de início alvos de regulação da tradução podemos citar como exemplos, eIF2, eIF3, eIF4E, eIF4G, eIF4B, entre outros. Uma vez que, entre as etapas iniciais da tradução está à ligação de eIF4E ao capacete ⁷mG, a inibição desta ligação torna-se um importante ponto de regulação. Neste cenário, podemos citar a família de proteínas 4E-BP's, que quando hipofosforiladas ligam-se ao fator eIF4E, impedindo sua associação com eIF4G. Quando as 4E-BP's são fosforiladas, estas perdem afinidade por eIF4E, revertendo a inibição. Entre os fatores de alongação, temos como exemplo a fosforilação de eEF2 (MATHEWS; SONENBERG; HERSHEY, 2007; HERSHEY, 2010). Por fim, existe a regulação pela presença de códons de terminação prematuros nos mRNAs, os quais são reconhecidos e o mRNA é direcionado para degradação pela via de NMD (*Non sense mediated decay*) (CHANG; IMAM; WILKINSON, 2007; BROGNA; WEN, 2009), além disso, estes mRNAs são traducionalmente reprimidos (ZHANG et al., 2010). Através dos mecanismos regulatórios brevemente descritos neste capítulo, compreendemos que as células são capazes de manter a tradução altamente regulada, produzindo as proteínas em níveis adequados.

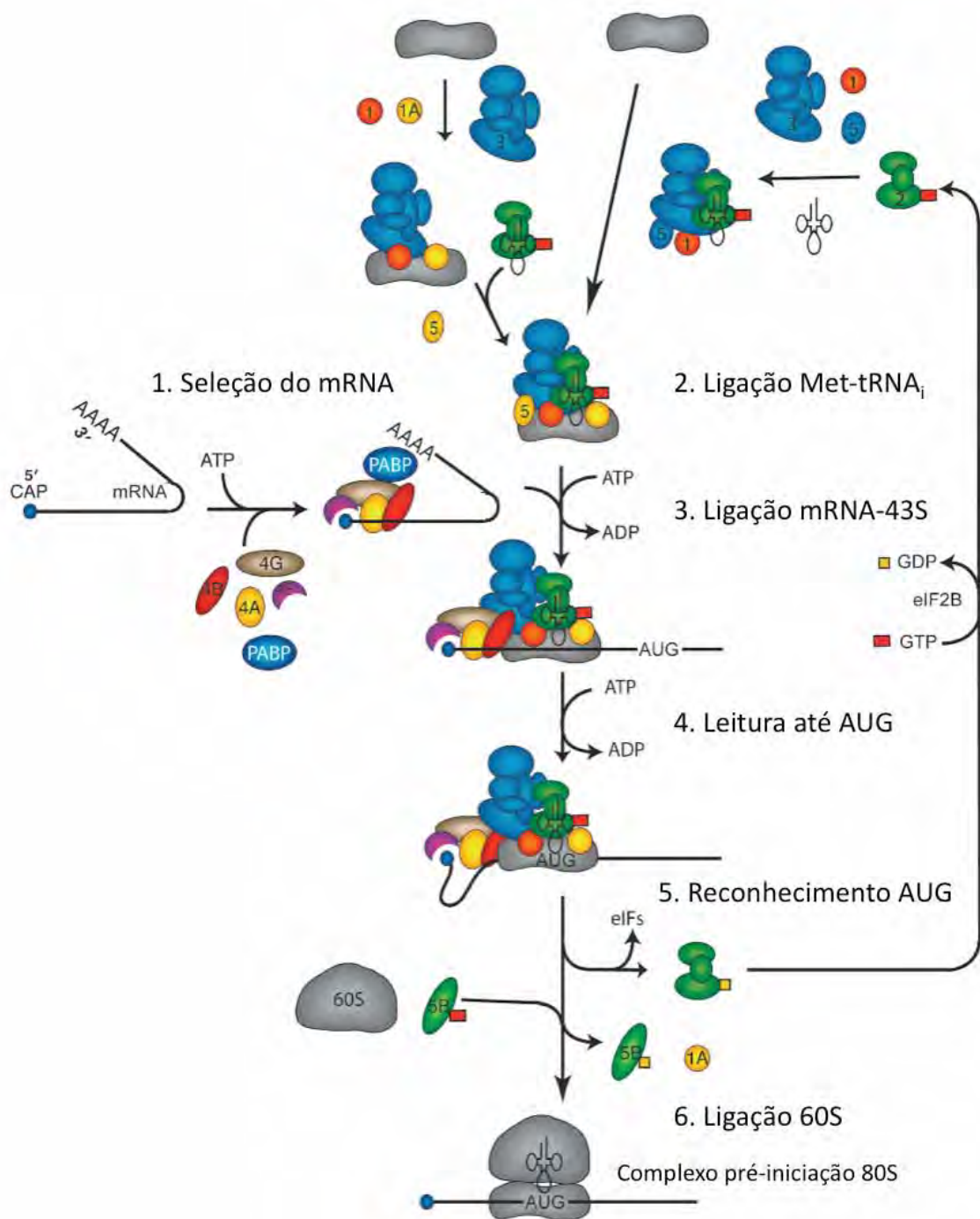


Figura 1. Etapas do início da tradução em eucariotos. O início da tradução apresenta as seguintes etapas: 1) Seleção do mRNA a ser traduzido; 2) Ligação do Mte-tRNA_i; 3) Formação complexo 43S; 4) Escaneamento do mRNA até o AUG; 5) Reconhecimento do AUG; 6) Ligação do 60S e reconstituição do ribossomo 80S (adaptada de HERSHEY, 2010).

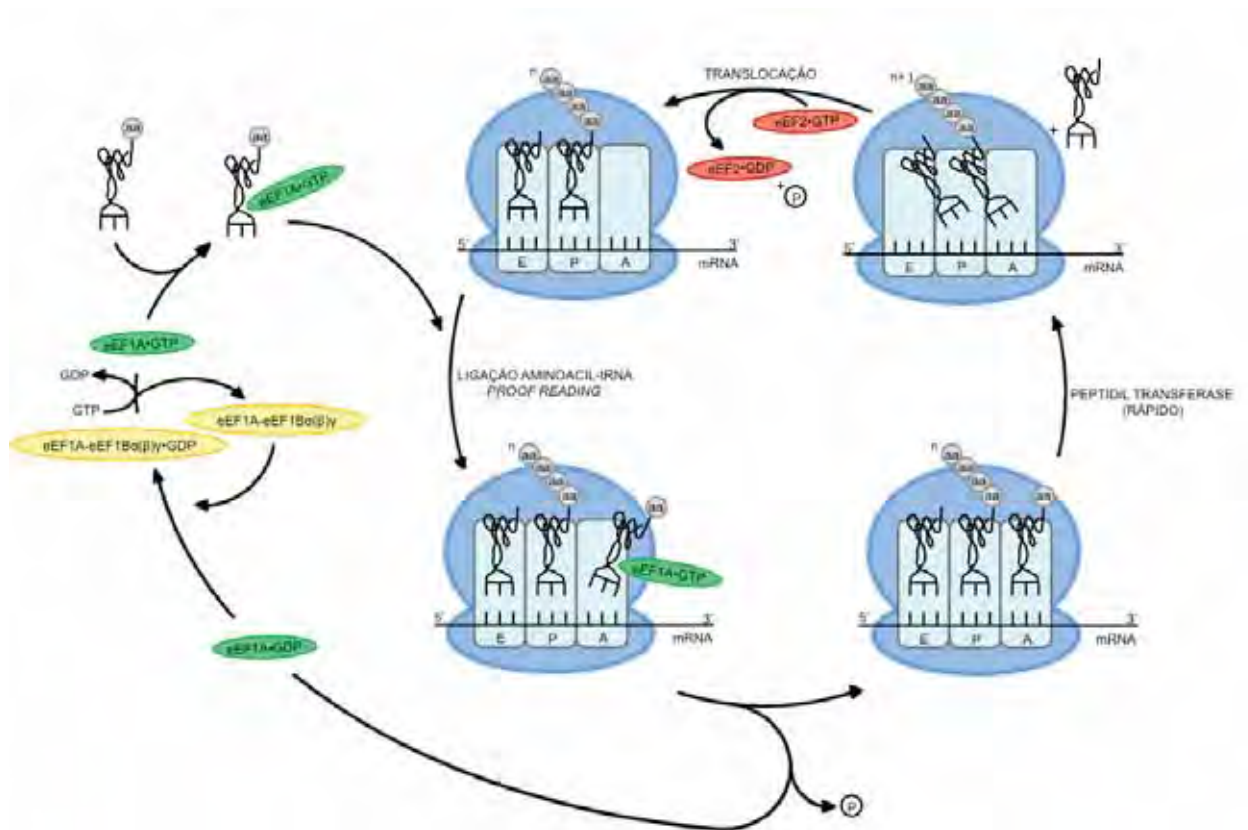


Figura 2. Ciclo da elongação da tradução em eucariotos. A elongação da tradução apresenta as seguintes etapas: transferência do tRNA aminoacilado por eEF1A-GTP para o sítio A do ribossomo; reciclagem de eEF1A-GDP por eEF1Bα(β)γ; formação da ligação peptídica e liberação do tRNA; translocação por eEF2 (adaptada de MERRICK, 1992).

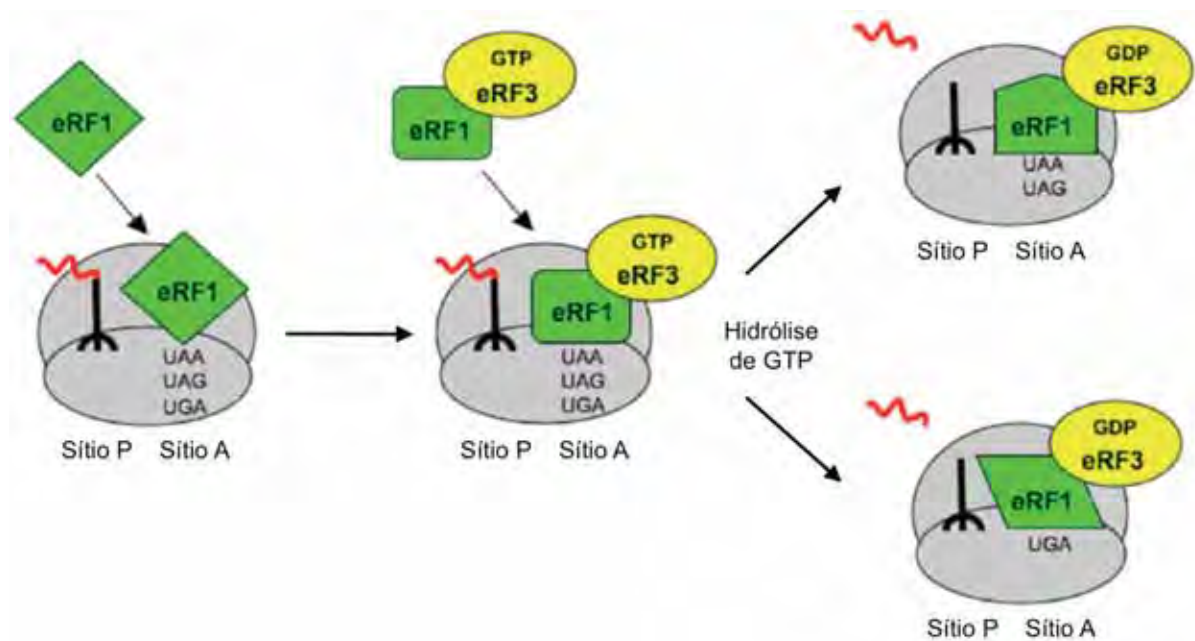


Figura 3. Reação de terminação da tradução. O término da tradução consiste no reconhecimento do códon terminador por eRF1; bloqueio da entrada de um novo tRNA; liberação da cadeia polipeptídica e das subunidades ribossomais por eRF3 (adaptada de FAN-MINOGUE et al., 2008).

1.2. O fator eIF5A

O provável fator de início de tradução de eucariotos 5A (eIF5A - *Eukaryotic translation Initiation Factor 5A*) é altamente conservado desde arqueas a eucariotos, sendo que as proteínas eIF5A de *Saccharomyces cerevisiae* e de mamíferos são 63% idênticas (SCHNIER et al., 1991; CHEN; LIU, 1997). Na Figura 4 está mostrado um alinhamento das sequências de eIF5A de diversos organismos, incluindo arqueas, eucariotos inferiores e superiores. Como pode ser verificado, há um alto grau de conservação entre as espécies analisadas, o que sugere a importância de eIF5A em processos celulares comuns.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* possui dois genes parálogos que codificam para eIF5A, *TIF51A* (*HYP2*) e *TIF51B* (*HYP1* ou *ANB1*), expressos em condições aeróbicas e anaeróbicas, respectivamente (SCHNIER et al., 1991; WOHL et al., 1993; VALENTINI et al., 2002). Um estudo mostrou que linhagens expressando apenas *TIF51A* ou *TIF51B* sob controle de um promotor induzível por galactose são capazes de crescer em aerobiose ou anaerobiose, portanto as proteínas expressas por estes genes são intercambiáveis *in vivo* (SCHWELBERGER; KANG; HERSHEY, 1993). Estes genes estão localizados em cromossomos diferentes (WOHL et al., 1992), e apesar das ORF's de *TIF51A* e *TIF51B* possuírem 90% de identidade, ao compararmos 500 pb das suas regiões flaqueadoras 5'-UTR e 3'-UTR foi verificada uma identidade de apenas 41% e 36%, respectivamente, através de alinhamento múltiplo de sequências. Como esperado, a deleção de *TIF51B* não afeta o crescimento de células haplóides em condições de aerobiose (WOHL et al., 1993). Em condições aeróbicas, eIF5A expressa por *TIF51A* pode ser encontrada em três isoformas, uma básica, uma ácida, e um produto de degradação sem os 10 primeiros aminoácidos (WOHL et al., 1993), sendo a forma acídica predominante (KANG; SCHWELBERGER; HERSHEY, 1993). E, uma vez que *TIF51A* é essencial para a viabilidade celular na presença de oxigênio, vários mutantes condicionais foram isolados e caracterizados (ZUK; JACOBSON, 1998; VALENTINI et al., 2002; DIAS et al., 2008).

eIF5A sofre duas modificações pós-traducionais. A primeira delas ocorre na forma acídica de eIF5A, e consiste na fosforilação do resíduo de serina acetilado da região N-terminal da proteína (KANG; SCHWELBERGER; HERSHEY, 1993; KLIER et al., 1993). Esta serina está indicada em verde e negrito na Figura 4, na sequência de

aminoácidos de eIF5A de *S.cerevisiae*. A mutação neste resíduo (S2A em levedura) revelou que a forma não fosforilada de eIF5A não apresenta defeito de crescimento nem de viabilidade celular, além de ser 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 pós-traducional de eIF5A é única e essencial para sua atividade na célula. Esta modificação corresponde à hipusinação de um resíduo de lisina que é substituído pelo resíduo de aminoácido hipusina (CHEN; LIU, 1997; PARK; LEE; JOE, 1997). No alinhamento de sequências da Figura 4 está sublinhada a região da proteína eIF5A que sofre a hipusinação, conhecida como alça de hipusinação, bem como a lisina alvo desta modificação (marcada em lilás e negrito).

A formação do aminoácido hipusina [N_ϵ -(4-amino-2-hidroxibutil)-lisina] (*hypusine*: hydroxyputrescine-lysine) ocorre através da transferência, pela desoxi-hipusina sintase, de um grupamento 4-aminobutil da espermidina (uma poliamina) para o amino grupo livre de uma lisina específica, seguido de hidroxilação deste grupo pela desoxi-hipusina hidroxilase. A hipusina é produzida logo após a tradução de eIF5A, sendo esta modificação irreversível e essencial (PARK; WOLFF; FOLK, 1993). A via de biossíntese da hipusina está representada no esquema da Figura 5. O grau de conservação, entre as diferentes espécies, dos resíduos flanqueadores do sítio de hipusinação revela a grande importância deste aminoácido raro (MAGDOLEN et al., 1994; CHEN; LIU, 1997). A mutação deste resíduo (K51R em *S. cerevisiae*) leva à produção de eIF5A não hipusinado, que não complementa o fenótipo de células onde *TIF51A* foi nocauteado (SCHNIER et al., 1991). Adicionalmente, o gene codificador da enzima desoxi-hipusina sintase é essencial para o crescimento de *S. cerevisiae* (SASAKI; ABID; MIYAZAKI, 1996; PARK; LEE; JOE, 1997). Portanto, o fato de eIF5A ser a única proteína eucariótica que sofre hipusinação fortalece a idéia de que este fator seja de fundamental importância no metabolismo celular.

É conhecido que as poliaminas, precursoras da hipusina, são essenciais para a proliferação celular (PARK; LEE; FOLK, 1997; LEE et al., 2009). A hipusinação pode ser inibida por um análogo da poliamina espermidina, o GC7 (*N1*-Guanil-diaminoheptano), uma vez que esta droga liga-se ao sítio ativo da desoxi-hipusina sintase, impedindo a formação da hipusina (PARK, 2006). Recentemente, foi demonstrado em mamíferos que o tratamento das células com GC7 além de inibir a

hipusinação de eIF5A, também promove a regulação da tradução nas etapas de início e alongação (LANDAU et al., 2010).

eIF5A possui 18 kDa em levedura, podendo variar até 21 kDa dependendo da espécie (PARK; LEE; JOE, 1997). As estruturas tridimensionais de homólogos de eIF5A foram resolvidas por cristalografia para as proteínas das arqueas *Methanococcus jannaschii* (KIM et al., 1998); *Pyrobaculum aerophilum* (PEAT et al., 1998) e *Pyrococcus horikoshii* (YAO et al., 2003). Além destas, as estruturas de eIF5A dos protozoários *Leishmania mexicana* e *Leishmania braziliensis* foram depositadas no *Protein Data Bank* (PDB 1XTD, 1X6O, respectivamente); e a estrutura de eIF5A de humanos (PDB 3CPF) (TONG et al., 2009) também foi resolvida. Um trabalho recente de nosso laboratório gerou por cristalografia a estrutura terciária de eIF5A de *S. cerevisiae*, a qual está depositada no PDB 3ERO. Estas determinações estruturais revelaram várias características comuns entre as proteínas. Segundo esses estudos, eIF5A trata-se de uma proteína dividida em dois domínios predominantemente compostos por folhas beta. A comparação destes domínios com outras proteínas de estruturas tridimensionais conhecidas mostra que o domínio N-terminal, o qual contém a hipusina, possui um dobramento classificado como *Translation Protein SH3-like motif*, o qual também está presente em várias proteínas ribossomais (<http://supfam.org/SUPERFAMILY>) (GOUGH et al., 2001). O domínio C-terminal, por sua vez, é similar a dobramentos de proteínas que se ligam a ácidos nucleicos de fita simples (*Single-stranded Oligonucleotide Binding Fold*), o qual está presente em proteínas de diferentes funções celulares que se ligam a RNA ou DNA fita simples (<http://supfam.org/SUPERFAMILY>) (GOUGH et al., 2001). De fato, dois trabalhos publicados tentam correlacionar a função de eIF5A com a ligação a mRNAs, porém a extensão de tais estudos ainda necessita ser ampliada para se estabelecer um papel de eIF5A na interação física direta com mRNAs (XU; CHEN, 2001; XU, JAO; CHEN, 2004). Interessantemente, embora não exista proteína homóloga de eIF5A em eubactérias, o fator de alongação da tradução de bactérias EF-P é um homólogo estrutural de eIF5A de arqueas, sendo a estrutura de eIF5A bastante semelhante a dois domínios de EF-P (HANAWA-SUETSUGU et al., 2004). Portanto, esta conservação estrutural parece estar correlacionada à conservação funcional entre as proteínas.

O fator eIF5A foi inicialmente purificado a partir de ribossomos de lisados de reticulócitos de coelho e recebeu esta denominação, pois foi considerado um fator

de início de tradução, devido a sua capacidade de estimular a síntese de metionil-puromicina *in vitro* (BENNE; HERSHEY, 1978). O antibiótico puromicina é um análogo estrutural da extremidade 3' de um tRNA aminoacilado e pode ocupar o sítio ribossomal A possibilitando que seu radical amino primário interaja com um Met-tRNA_i, reproduzindo a formação de uma ligação peptídica. O ensaio de metionil-puromicina mede a incorporação de metionina radioativa, a partir de Met-tRNA_i, à puromicina, através de catálise ribossomal, sendo, portanto, um ensaio bastante utilizado para avaliar a influência de diferentes fatores no início da tradução.

Apesar da capacidade evidente de eIF5A estimular a síntese de metionil-puromicina *in vitro* utilizando-se tripletes AUG ou mRNA de globina, a não adição de eIF5A não mostrou nenhum impacto sobre a síntese de globina *in vitro*, discordando, de resultados obtidos na ausência dos outros fatores de início de tradução eIF1, eIF1A, eIF3, eIF5B e eIF5, também testados. Além disso, eIF5A não pareceu influenciar a formação *in vitro* de complexo ternário ou a ligação do mRNA de globina ou do Met-tRNA_i à subunidade 40S (BENNE; HERSHEY, 1978). A possibilidade de eIF5A atuar na elongação da tradução também foi considerada, mas nenhum efeito positivo foi observado com a adição de eIF5A em um sistema de síntese protéica para polimerização de poli-fenilalanina a partir de ácido poli-uridílico, ribossomos 80S e fatores de elongação eEF1 e eEF2 purificados (BENNE; HERSHEY, 1978). Em concordância com esse trabalho inicial de caracterização funcional de eIF5A em sistemas *in vitro*, foram publicados posteriormente estudos mostrando que a inibição da maturação funcional de eIF5A (discutida a seguir) não se correlaciona a uma repressão da tradução em células de mamífero, e que a depleção deste fator em *S. cerevisiae* leva a uma pequena diminuição (30%) da taxa de síntese protéica (DUNCAN; HERSHEY, 1986; KANG; HERSHEY, 1994; ZUK; JACOBSON, 1998). Assim, apesar de eIF5A ter sido denominado inicialmente um fator de início de tradução, a sua função como tal não foi claramente demonstrada.

Uma função para eIF5A como fator geral da tradução foi descartada, uma vez que, a depleção *in vivo* deste fator em levedura causa uma pequena redução, de apenas 30%, nos níveis de síntese protéica total (KANG; HERSHEY, 1994). Interessantemente, neste estudo foi verificado que esta depleção de eIF5A gerou um aumento de células paradas em G1, sugerindo que eIF5A seja um fator envolvido na tradução de um grupo específico de mensageiros, como por exemplo, aqueles codificadores de proteínas envolvidas na transição G1/S do ciclo celular

(KANG; HERSHEY, 1994). 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 (HANAUKE-ABEL et al., 1994; PARK et al., 1994; CHEN et al., 1996; SHI et al., 1996b). Além destas, outras observações também evidenciam o envolvimento de eIF5A com proliferação celular como, por exemplo, foi verificado que a expressão de eIF5A é induzida em linfócitos T ativados (BEVEC et al., 1996). Complementando estes dados, um estudo utilizando *Drosophila melanogaster* evidenciou uma perda no controle do ciclo celular, no início do desenvolvimento deste inseto, em consequência da alteração dos níveis de eIF5A (LEE et al., 2001). Portanto, estes dados reforçaram o envolvimento de eIF5A com a progressão do ciclo celular.

Embora proposto previamente que eIF5A seja um cofator celular da proteína Rev de HIV-1 e esteja envolvido na exportação dos mensageiros tardios deste vírus (RUHL et al., 1993; BEVEC et al., 1996; BEVEC; HAUBER, 1997; ELFGANG et al., 1999; ROSORIUS et al., 1999), outros estudos não evidenciam o envolvimento de eIF5A com transporte nucleocitoplasmático (HENDERSON; PERCIPALLE, 1997; SHI; YIN; WAXMAN, 1997; JAO; CHEN, 2002; VALENTINI et al., 2002). Curiosamente, um trabalho recente, mostrou que a inibição da hipusinação provoca a inibição da expressão de HIV-1 (HOQUE et al., 2009). Em outro trabalho, foi mostrado que eIF5A possui um efeito regulatório positivo na expressão gênica independente da proteína Rev e na tradução do RNA de HIV-1, além de ser um co-fator que aumenta a tradução mediada por IRES (*Internal Ribosome Entry Sites*) deste vírus (LIU et al., 2011). Portanto, eIF5A poderia ter um papel na tradução específica desse tipo de vírus.

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, ao se inibir a transcrição a localização de Rev é alterada completamente, enquanto que, a de eIF5A permanece inalterada. Entretanto, inibidores da tradução, alteram a localização subcelular de eIF5A, mas não de Rev. Esses dados sugerem que eIF5A não sofre translocação nucleocitoplasmática como ocorre com Rev (SHI; YIN; WAXMAN, 1997). Em *S. cerevisiae*, eIF5A é uma proteína que apresenta uma localização citoplasmática com maior concentração perinuclear (VALENTINI et al.,

2002), o que está de acordo com sua localização em células de mamíferos, onde eIF5A localiza-se principalmente no citoplasma (SHI; YIN; WAXMAN, 1997; JAO; CHEN, 2002). Esta localização perinuclear não é alterada em leveduras contendo um alelo temperatura-sensível de *XPO1*, gene que codifica para CRM1/exportina 1 em leveduras, na temperatura não permissiva. Assim como acontece em mamíferos, o bloqueio da ação de exportina 1 em leveduras leva a um acúmulo da proteína Rev de HIV-1 no núcleo. Entretanto, não ocorre acúmulo de eIF5A nas mesmas condições onde ocorre acúmulo de Rev no mutante de Xpo1, e também não ocorre acúmulo de Rev no núcleo em mutantes de eIF5A, o que compromete o envolvimento de eIF5A com a exportação de proteínas através do receptor CRM1/exportina 1 (VALENTINI et al., 2002). Interessantemente, foi mostrado em células de mamíferos que a localização subcelular de eIF5A de humanos está relacionada à hipusinação (LEE et al., 2009). A forma precursora de eIF5A localiza-se em ambos, citoplasma e núcleo, enquanto que, a forma hipusinada está predominantemente no citoplasma celular, local onde este fator pode atuar na tradução, sendo exportada pela exportina 4, de uma maneira dependente da hipusinação (LEE et al., 2009).

O fator eIF5A está envolvido com a degradação de mRNA, pois foi demonstrado que o mutante temperatura-sensível (*ts*) do gene *TIF51A*, o mutante *ts1159*, acumula mRNA sem o capacete ⁷mG na temperatura não permissiva (ZUK; JACOBSON, 1998). Além deste, outros mutantes de eIF5A descritos por nosso laboratório (*tif51A-1*, *tif51A-2* e *tif51A-3*) também acumulam mRNAs na temperatura não permissiva (VALENTINI et al., 2002). Em outro estudo, foi mostrado que linhagens contendo formas mutadas de eIF5A de humano apresentaram fenótipo *ts* e síntese protéica diminuída. Estes mutantes apresentaram também acúmulo de mRNAs semelhante ao observado em linhagens deficientes para NMD (*Non-sense mediated decay*), além de aumento na meia-vida de alguns transcritos de genes dependentes de NMD (SCHRADER et al., 2006).

Diversos genes foram isolados como supressores em alto número de cópias do fenótipo *ts* do mutante *tif51A-1*. Entre estes genes estão: *PAB1*, *PKC1*, *WSC1*, *WSC2*, *WSC3*, *SIA1*, *HSP150*, *GIC1* e *ZDS1* (VALENTINI et al., 2002; ZANELLI; VALENTINI, 2005). O encontro desses genes levou à sugestão de uma nova via de sinalização celular a partir de Pkc1. A proteína Pkc1 participa da resposta a choque hipoosmótico, juntamente com as proteínas Wsc1, 2 e 3. Ainda, foi mostrado que a

supressão por Pkc1 é independente da via de MAP quinases e foi descrita uma via de sinalização intracelular que atua abaixo de Pkc1 e que envolve as proteínas Zds1 e Gic1. Os genes supressores *PKC1*, *ZDS1* e *GIC1* são importantes para a polaridade celular na levedura, e uma vez que, mutantes de eIF5A apresentam defeito na polarização do citoesqueleto de actina na temperatura não permissiva (ZANELLI; VALENTINI, 2005). É provável que eIF5A esteja envolvido com a progressão no ciclo celular em levedura de maneira indireta, através do controle da expressão gênica em nível traducional.

Adicionalmente, um rastreamento de letalidade sintética foi realizado utilizando o mutante *ts tif51A-3* e revelou o gene *YPT1* como sendo sinteticamente letal com *TIF51A* (FRIGIERI et al., 2007). Esta letalidade sintética entre *tif51A-3* e *ypt1* passa a envolver direta ou indiretamente o fator 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. Além disso, o dado de que os genes supressores *PKC1*, *WSC1*, *WSC2* e *WSC3* estão relacionados ao correto funcionamento da via secretória (GUSTIN et al., 1998) fortalecem 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 (FRIGIERI et al., 2007; FRIGIERI et al., 2008).

Retornando ao cenário da tradução, resultados obtidos em nosso laboratório fortaleceram o envolvimento de eIF5A com a etapa de elongação ao invés de início da tradução. Em um primeiro trabalho, foi mostrado através de ensaios de copurificação seguidos de identificação por espectrometria de massas que eIF5A interage com as proteínas ribossomais (P0, S5 e L11) e com o fator de elongação de tradução 2 (eEF2), componentes da maquinaria de tradução (ZANELLI et al., 2006). Ainda, foi observado que eIF5A interage especificamente com monossomos funcionalmente ativos, e que mutantes condicionais de eIF5A apresentam defeito no perfil polissomal (ZANELLI et al., 2006). Resultados de outro laboratório também

sugerem o envolvimento de eIF5A com a etapa de alongação da tradução, pois foi verificado que eIF5A interage fisicamente com proteínas ribossomais (JAO; CHEN, 2006). Além disto, o análogo de eIF5A de eubactérias (EF-P) tem sua atividade especificamente afetada *in vitro* por inibidores da atividade peptidil-transferase (AOKI et al., 2008) e similarmente foi observada a sensibilidade dos mutantes de eIF5A de levedura a inibidores da tradução, como a esparsomicina e anisomicina (ZANELLI et al., 2006). Estes dados evidenciam uma função para eIF5A na alongação da tradução.

Posteriormente, em outro trabalho de nosso laboratório, foram realizadas interações genéticas e análises de perfil polissomal de linhagens que combinam mutações em eIF5A e em fatores envolvidos na etapa de início (eIF4E) ou alongação (eEF2) da tradução, onde foi observada interação genética entre *TIF51A* e os genes analisados (GREGIO et al., 2009). Neste estudo, foi mostrado que o perfil polissomal do mutante *ts tif51A-3* é bastante semelhante ao do dominante negativo de eEF2 (*eft2*^{H699K}) e que a depleção de eIF5A provoca uma diminuição significativa na síntese protéica total e um aumento no tempo de trânsito ribossomal (GREGIO et al., 2009).

Fortalecendo e complementando os dados publicados pelo nosso laboratório, foi mostrado que o mutante *ts tif51A*^{D63V} apresentou defeito na capacidade de realizar a alteração na janela de leitura programada +1, chamada de PRF +1 (*Programmed Ribosomal Frameshifting*), efeito semelhante ao observado para linhagens selvagens tratadas com sordarina, um inibidor de eEF2. Ainda, a linhagem selvagem tratada com sordarina apresentam perfis polissomais semelhantes aos mutantes de eIF5A, com acúmulo de polissomos na temperatura não permissiva, reforçando a correlação entre eIF5A e eEF2 (SAINI et al., 2009).

Um estudo realizado pelo nosso laboratório identificou dois mutantes, *tif51A*^{K56A} e *tif51A*^{Q22H/L93F}, que possuem eIF5A estável na temperatura não permissiva (DIAS et al., 2008). Foi mostrado mais recentemente que o mutante *tif51A*^{K56A} apresenta uma interação genética do tipo sintético doente com o dominante negativo de eEF2 (*eft2*^{H699K}) (DIAS et al., 2011). A superexpressão de eEF2 em *tif51A*^{K56A} suprime os defeitos de crescimento, de morfologia celular, de síntese protéica total e melhora a resistência à droga higromicina B, a qual possui ação como inibidor da síntese protéica e promove alterações de PRF. Além disso, a superexpressão de eEF2 no mutante *tif51A*^{K56A} corrige o defeito de alongação da

tradução do mutante de eIF5A como verificado por ensaios de perfil polissomal. Estes resultados demonstram que eIF5A está intimamente correlacionado com a função de eEF2 na elongação da tradução fortalecendo a hipótese de eIF5A atuar nesta etapa da tradução.

```

Pho      -----MGDKTKVQVSKLKPGRYIIIDDEPCRIVNITVSSPGKHGSA 41
Pae      -----MSTK-YVEAGELKEGSYVVIDGEPCRVVEIEKSKTGKHGSA 40
Mja      -----MVIIMPGTKQVNVGSLKVGQYVMIDGVPCEIVDISVSKPGKHGGA 45
Sce      MSD--EEHT-FETADAG--SSATYPMQCSALRKNGFVVIKSRPCKIVDMSTSKTGKHGHA 55
Spo      MAE--EEHVDFFEGGEAG--ASLTFFPMQCSALRKNGHVVIKGRPCKIVDMSTSKTGKHGHA 56
Lme      MSD---EDHDFAHQGGGDNASKTYPMAAGALKKGGYVCINGRPCKVIDLSVSKTGKHGHA 57
Lbr      MSD---EDHDFSHQGGGDNASKTYPMAAGALKKGGYVCINGRPCKVIDLSVSKTGKHGHA 57
Cel      MSDDHHDDEHFHTGDSG--AAATFPKQCSALRKNEHVMIKGRPCKIVEMSTSKTGKHGHA 58
Dme      MAEL---DDQFETDSDG--ASTTYPMQCSALRKNGFVMLKSRPCKIVEMSTSKTGKHGHA 55
Mmu      MAD---DLDFETGDAG--ASATFPMQCSALRKNGFVVLKGRPCKIVEMSTSKTGKHGHA 54
Hsa1     MAD---DLDFETGDAG--ASATFPMQCSALRKNGFVVLKGWPCCKIVEMASKTGKHGHA 54
Hsa2     MAD---EIDFTTGDSG--ASSTYPMQCSALRKNGFVVLKGRPCKIVEMSTSKTGKHGHA 54
          .      .      * : . . : . . ** : : : : * . . * * * *

Pho      KARIEAVGIFDGKVRISIVKPTSAEVDVPIIDKKTAAQVIAITPD-----TVQIMD---M 91
Pae      KARIVAVGVFDGGKRTLSLPVDAQVEVPIIEKFTAQILSVSGD-----VIQLMD---M 90
Mja      KARVVGIGIFEKVKKEFVAPTSSKVEVPIIDRRKGQVLAIMGD-----MVQIMD---L 95
Sce      KVHLVAIDIFTGKKLEDLSPSTHNMEVPVVKRNEYQLLDIDDG-----FLSLMN-MDG 107
Spo      KVHIVALDIFNGRKYEDMSPSTHNMDVPVVKRDEYQLVNIDDG-----YLNLMT-TDG 108
Lme      KVSIVATDIFTGNRLEDQAPSTHNVEVPFVKTFYTSVLDIQPNEDPSLPSHLSLMD-DEG 116
Lbr      KVSIVATDIFTGNRLEDQAPSTHNVEVPFVKTYTSVLDIQANEDPSLPAHLSLMD-DEG 116
Cel      KVHMAVIDIFTSKKLEDICPSTHNMDVPVVKRREYLLMAIDDG-----YCSLMDPESC 111
Dme      KVHMGVIDIFSNNKYEDICPSTHNMDVPNVKREDLQLIAISDDS-----FLTLMT-ESG 108
Mmu      KVHLVGIDIFTGKKYEDICPSTHNMDVPNIKRNDQLIGIQDG-----YLSLLQ-DSG 106
Hsa1     KVHLVGIDIFTGKKYEDICPSTHNMDVPNIKRNDQLIGIQDG-----YLSLLQ-DSG 106
Hsa2     KVHLVGIDIFTGKKYEDICPSTHNMDVPNIKRNDYQLICIQDG-----YLSLLT-ETG 106
          * . : . : *      *      : : * * : . : : : . : : :

Pho      ETYETFEVPIDTGVADRIDQLKEGI---NVEYWETLGRIMRIKGEGE--- 138
Pae      RDYKTIEVPMKY-VEEEAKGRLAPGA---EVEVWQILDYKIIRVK----- 132
Mja      QTYETLELPIPE----GIEG-LEPGG---EVEYIEAVGQYKITRVIGGK--- 136
Sce      DTKDDVKAP-EGELGDSLQTAFADEGK-DLMVTIISAMGEEAAISFKEAARTD- 157
Spo      TTKDDVRLP-EGELGNEIEEGFDEGR-DLIITVVSAMGEETALACRDAPSS-- 157
Lme      ESREDLDMPPDAALATQIKEQFDSGK-EVLVVVSAMGTEQVLQTKNAAEK-- 166
Lbr      ESREDLDMPPDAALATQIKEQFDSGK-EVLVVVSAMGTEQVLQTKNAAEK-- 166
Cel      EQKDDLKLP-DTELGGQIRDAYEKDEGSVLVQVVSAMGEEAAILGWKVSTKE-- 161
Dme      DLREDLKVP-EGELGELRLDFDSGK-DLLCTVLKACGEECVIAIKNTALDK 159
Mmu      EVREDLRP-EGDLGKEIEQKYDCGE-EILITVLSAMTEEAATAIKAMAK--- 154
Hsa1     EVPEDLRP-EGDLGKEIEQKYDCGE-EILITVLSAMTEEAATAIKAMAK--- 154
Hsa2     EVREDLRP-EGELGKEIEGKYNAGE-DVQVSVCMAMSEYAVAIAKPKC---- 153
          . .      *      .      .

```

Figura 4. Alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos de eIF5A de diferentes organismos. As sequências de arqueas: Pho (*Pyrococcus horikoshii*), Pae (*Pyrobaculum aerophilum*), Mja (*Methanococcus jannaschii*); de eucariotos inferiores: Sce (*Saccharomyces cerevisiae*), Spo (*Schizosaccharomyces pombe*), Lme (*Leishmania mexicana*), Lbr (*Leishmania braziliensis*), Cel (*Caenorhabditis elegans*), Dme (*Drosophila melanogaster*), Mmu (*Mus musculus*), e de eucariotos superiores: Hsa1 (*Homo sapiens* eIF5A-1) e Hsa2 (*Homo sapiens* eIF5A-2) foram comparadas através do programa CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Os resíduos de aminoácidos completamente conservados em todos os organismos estão marcados com "*", os resíduos com alguma conservação estão marcados com ":" ou "." indicando uma maior ou menor conservação, respectivamente. A região sublinhada indica os resíduos que fazem parte da região da alça de hipusinação, o resíduo de lisina modificado para hipusina está na cor lilás e em negrito, e o resíduo de serina-acetilado que sofre fosforilação em *S. cerevisiae* está na cor verde e em negrito.

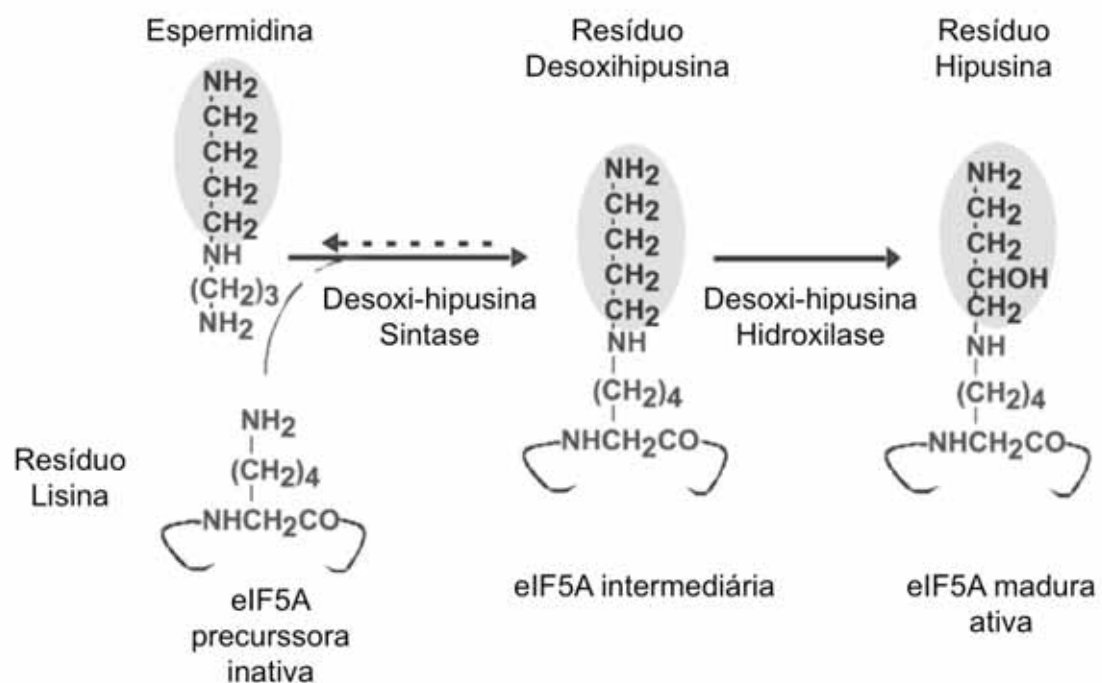


Figura 5. Via de biossíntese do resíduo de aminoácido hipusina em eIF5A. A modificação pós-traducional que ocorre em eIF5A está mostrado simplificada. Um resíduo 4-aminobutil da poliamina espermidina é transferido para a lisina alvo em eIF5A pela enzima desoxi-hipusina sintase. A forma intermediária de eIF5A sofre a hidroxilação pela desoxi-hipusina hidroxilase formando eIF5A madura e hipusinada (adaptada de PARK, 2006).

1.3. O metabolismo de mRNA: o papel dos *P bodies* e dos grânulos de estresse

O controle entre a tradução e a degradação dos mRNAs também representa um ponto relevante da regulação da expressão gênica (WILUSZ; WORMINGTON; PELTZ, 2001; MOORE, 2005). Diversos estudos, utilizando a levedura *S. cerevisiae* como modelo, foram realizados para analisar o mecanismo de degradação de mRNA como mecanismo de regulação da expressão gênica, e esses estudos revelaram componentes cruciais de mecanismos de regulação da estabilidade de mensageiros evolutivamente conservados (HILLEREN; PARKER, 1999; VASUDEVAN; PELTZ, 2001; WILUSZ; WORMINGTON; PELTZ, 2001; COLLIER; PARKER, 2004).

Durante o processamento do mRNA de eucaritos são incorporados co-transcricionalmente ao transcrito duas estruturas que conferem estabilidade a este mRNA: o capacete de 7mG na extremidade 5' e a cauda poli(A)⁺ na extremidade 3'. Essas duas estruturas interagem com as proteínas citoplasmáticas eIF4E e Pab1, respectivamente, protegendo o transcrito da ação de exonucleases (WILUSZ; WILUSZ, 2004). Para o início da degradação de mRNA, uma dessas estruturas deve ser comprometida ou o mRNA deve sofrer clivagem por ataque endonucleásico (WILUSZ; WILUSZ, 2004).

Ao longo dos vários ciclos da tradução de um mRNA eucariótico, ocorre o encurtamento da cauda de poli(A)⁺ pelo complexo de desadenilação, o qual inclui as nucleases Ccr4 e Pop2, além de proteínas efetoras como Not1-5, Caf4, Caf16, Caf40 e Caf130 (DENIS et al., 2001; TUCKER et al., 2001). Em seguida, é ativada a remoção do capacete 7mG da extremidade 5' do mRNA pelo complexo Dcp1/Dcp2 (DECKER; PARKER, 1993; MUHLRAD; DECKER; PARKER, 1994), e então, o mRNA é degradado no sentido 5'→3' por Xrn1 (HSU; STEVENS, 1993). Alternativamente, o mRNA desadenilado pode ser degradado mais lentamente no sentido 3'→5' pelo complexo de exorribonucleases, o exossomo (MUHLRAD; DECKER; PARKER, 1995; ANDERSON; PARKER, 1998; CAO; PARKER, 2001), seguido da hidrólise do capacete 7mG pela enzima DcpS (VAN DIJK; LE HIR; SÉRAPHIN, 2003). Na via de remoção do capacete 7mG , juntamente com o complexo Dcp1/Dcp2, atuam fatores ativadores da remoção do capacete, que incluem Dhh1, Pat1, Sbp1, Edc3, Scd6 e o complexo Lsm1-7 (BONNEROT; BOECK; LAPEYRE, 2000; THARUN et al., 2000; COLLIER et al., 2001; THARUN; PARKER, 2001; KSHIRSAGAR; PARKER, 2004; SEGAL; DUNCKLEY; PARKER, 2006;

NISSAN et al., 2010). Na Figura 6 estão descritas resumidamente as principais vias de degradação do mRNA e as enzimas e complexos envolvidos nestas etapas (adaptada de PARKER; SHETH, 2007). Uma eficiente remoção do capacete 7^{mG} do mRNA está correlacionada à formação de complexos de mRNPs não traduzidos com fatores de maquinaria de degradação (COLLER; PARKER, 2004). Portanto, a remoção do capacete é uma etapa muito importante na degradação de mRNA, visto que permite a degradação rápida do transcrito, sendo assim um alvo para regulação (PARKER; SHETH, 2007).

Alguns estudos verificaram que há uma competição entre o complexo de remoção do capacete (Dcp1/Dcp2) e o complexo de início de tradução eIF4F pelo capacete 7^{mG} (BEELMAN; PARKER, 1994; SCHWARTZ; PARKER, 1999; 2000). Baseado na análise dos corpúsculos de processamento (*P bodies*), foi concluído que a tradução e a remoção do capacete atuam competitivamente (COLLER; PARKER, 2004). Estes corpúsculos são atualmente chamados de *P bodies*, mas foram inicialmente chamados de corpúsculos de Dcp1 ou corpúsculos GW182, e receberam estas denominações por apresentarem em sua composição as proteínas Dcp1, Dcp2, Xrn1 e GW182 (BASHKIROV et al., 1997; EYSTATHIOY et al., 2002; INGELFINGER et al., 2002; VAN DIJK et al., 2002; SHETH; PARKER, 2003). Posteriormente, outros componentes dos *P bodies* foram identificados, como os fatores ativadores da remoção do capacete (FENGER-GRØN et al., 2005; YU et al., 2005; SCHELLER et al., 2007; BECKHAM et al., 2008). Portanto, os *P bodies* são agregados citoplasmáticos cuja composição pode variar, mas contêm principalmente os mRNA que não estão sendo traduzidos (mRNPs), os fatores de remoção do capacete e fatores de degradação de mRNA (SHETH; PARKER, 2003; COUGOT et al., 2004; EULALIO et al., 2007; PARKER; SHETH, 2007). As proteínas que compõem os *P bodies* são conservadas desde leveduras até os mamíferos (ANDERSON; KEDERSHA, 2006; EULALIO et al., 2007; PARKER; SHETH, 2007).

Os *P bodies* e seus mRNPs agregados têm sido amplamente estudados, e estes corpúsculos já foram envolvidos com a repressão da tradução (HOLMES et al., 2004; COLLIER; PARKER, 2005), com a degradação normal de mRNAs (SHETH; PARKER, 2003; COUGOT et al., 2004), com a via de NMD (UNTERHOLZNER; IZARRALDE, 2004; SHETH; PARKER, 2006), e com o armazenamento de mRNA (BRENGUES; TEIXEIRA; PARKER, 2005; BHATTACHARYYA et al., 2006). Os *P bodies* servem como marcadores da proporção entre os mRNPs complexados com as maquinarias de

repressão e degradação de mRNA, além de poderem atuar no controle da tradução dos mRNAs e/ou na sua degradação (NISSAN; PARKER, 2008; BUCHAN; NISSAN; PARKER, 2010). Os componentes dos *P bodies* podem atuar como repressores da tradução durante a depleção de glicose e outras condições de estresse celular (HOLMES et al., 2004; COLLIER; PARKER, 2005; PILKINGTON; PARKER, 2008), reforçando a relação dos *P bodies* com os processos de tradução e degradação de mRNAs. É estabelecido que estes corpúsculos servem como local de armazenamento de mRNAs no citoplasma até que sua tradução seja adequada (PARKER; SHETH, 2007), entretanto, a função e a importância dos *P bodies* na regulação dos mRNPs ainda está sujeita a controvérsias e inúmeros estudos estão em andamento.

Na Figura 7 (BALAGOPAL; PARKER, 2009) está mostrado um esquema do ciclo do mRNA dentro da célula, mostrando o envolvimento do mRNA com tradução, degradação e acúmulo em corpúsculos. Após a tradução, os mRNAs acumulam-se nos *P bodies* e podem ser direcionados para a degradação, e ao se interferir no processo da tradução, foram observadas consequências no tamanho e número dos *P bodies* (SHETH; PARKER, 2003; TEIXEIRA et al., 2005). Além disso, se interferirmos nas etapas de repressão e/ou degradação de mRNA, também verificamos alterações no padrão de agregação destes corpúsculos (PARKER; SHETH, 2007; NISSAN; PARKER, 2008). Uma vez que os níveis de tradução e degradação de mRNA são influenciados por um equilíbrio dinâmico entre os polissomos e os mRNPs presentes nos *P bodies*, a observação da localização de fatores componentes de *P bodies* pode ser informativa com relação às alterações nas diferentes etapas da tradução e da degradação de mRNAs.

Estudos mostram que a adição do inibidor da elongação da tradução cicloheximida provoca um acúmulo de mRNA ligados a ribossomos, levando à redução drástica de *P bodies*; por outro lado, o bloqueio do início da tradução acarreta aumento em tamanho e número de *P bodies*, além de aumentar a remoção do capacete de ⁷mG. Portanto, nestes estudos foi mostrado que há uma relação direta entre o *pool* de proteínas celulares funcionais e a agregação deste corpúsculos (BEELMAN; PARKER, 1994; SCHWARTZ; PARKER, 1999; SHETH; PARKER, 2003; TEIXEIRA et al., 2005). Além disso, a deleção de diferentes componentes dos *P bodies* pode levar ao acúmulo ou ausência de outros componentes dos *P bodies*, assim como a sua distribuição na célula (TEIXEIRA; PARKER, 2007).

Em um trabalho de 2005, Collier e Parker, verificaram que ao se interromper duas vias de repressão da tradução, pela deleção de *DHH1* e *PAT1*, ocorre inibição da formação de *P bodies*. Neste estudo, foi sugerido que os ativadores da remoção do capacete Dhh1 e Pat1 mediam a transição da tradução para o degradação de mRNA, e estes fatores estariam atuando também na repressão da tradução (COLLIER; PARKER, 2005). Portanto, a formação dos *P bodies* está fortemente relacionada com os níveis de tradução na célula (PARKER; SHETH, 2007).

Os fatores de início de tradução eIF4E e eIF4G foram observados nos *P bodies* durante a depleção de glicose e na fase estacionária de crescimento celular (BRENGUES; PARKER, 2007). Estes resultados sugerem que os mRNAs poliadenilados podem entrar nos *P bodies*, e que um complexo de mRNP traducionalmente reprimido, incluindo mRNA poli(A)⁺, Pab1, eIF4E e eIF4G pode representar uma situação transitória do mRNA entre *P bodies* e posterior retorno à tradução (BRENGUES; PARKER, 2007).

Dois componentes dos *P bodies* foram identificados como necessários para a agregação de corpúsculos visíveis em *S. cerevisiae*. As proteínas Edc3 e Lsm4 foram determinados como os fatores que promovem as interações físicas entre os mRNPs e são necessárias para a agregação do *P bodies* (DECKER; TEIXEIRA; PARKER, 2007; REIJNS et al., 2008). Nestes estudos, foram geradas linhagens de levedura com a deleção da região C-terminal do domínio de dimerização de Edc3 (chamado Yjef-N), e uma deleção do domínio rico em Glutamina/Asparagina (Q/N) da região C-terminal de Lsm4, e foi verificado que nestas células não há formação de *P bodies* (DECKER; TEIXEIRA; PARKER, 2007; REIJNS et al., 2008). Entretanto, nestas linhagens a tradução e o degradação de mRNA não sofrem alterações, o que gera dúvidas sobre a função e importância destes corpúsculos.

Interessantemente, um estudo demonstrou haver uma relação entre a formação do *P bodies* e os microtúbulos em *S. cerevisiae* (SWEET et al., 2007). Neste trabalho, foi mostrado que ao romper os microtúbulos, pela ação do droga benomil ou em uma linhagem mutante da α -tubulina, a formação dos *P bodies* é estimulada e favorecida. Ainda, foi verificado que durante a desestabilização dos microtúbulos, a proteína Tub1 co-localiza com os *P bodies*. Nestas condições de formação dos *P bodies*, não foram observadas alterações na estabilidade do mRNA nem na tradução de uma maneira geral. Portanto, estes dados revelaram que a agregação

dos *P bodies* está relacionada à rede intracelular de microtúbulos, independentemente da degradação ou da tradução dos mRNAs (SWEET et al., 2007).

Além dos *P bodies*, outros corpúsculos citoplasmáticos contendo mRNPs já foram descritos em eucariotos, como os grânulos de estresse (*Stress granules* - SGs) (ANDERSON; KEDERSHA, 2008), diversos grânulos de células germinativas (ANDERSON; KEDERSHA, 2006), grânulos neuronais (BARBEE et al., 2006) e grânulos de mRNPs importantes para a via secretória (DECKER; PARKER, 2006). Acredita-se que a característica em comum destes corpúsculos é que eles promovem uma repressão da tradução restrita a um determinado momento e local. Entretanto, se estes grânulos possuem uma função na regulação ou repressão da tradução, ou na remoção do capacete 7mG, ou na degradação de mRNA, ainda permanece obscura (Franks e Lykke-Andersen, 2008).

Em *S. cerevisiae*, além dos *P bodies* (BRENGUES; PARKER, 2007), foram descritos os grânulos de estresse (BUCHAN; MUHLRAD; PARKER, 2008; GROUSL et al., 2009; SWISHER; PARKER, 2010) e os *EGP bodies* (HOYLE et al., 2007). Estes corpúsculos diferem quanto aos componentes presentes e/ou ausentes em cada um deles, quanto ao tipo de estresse que induza sua formação e pela dependência da fosforilação de eIF2 α e da quinase Gcn2 (THOMAS et al., 2011).

Recentemente, os grânulos de estresse foram descritos para *S. cerevisiae* e apresentam em sua composição geral os fatores do complexo de pré-iniciação 48S. Mais especificamente, estes corpúsculos contêm: mRNAs não traduzidos (mRNPs) ligados a Pab1, fatores de início de tradução (eIF2, eIF3, eIF4A, eIF4E, eIF4G), a subunidade ribossomal 40S, proteínas envolvidas com tradução (Pub1, Ngr1), proteínas envolvidas com a degradação de mRNA (Dcp2, Dhh1, Xrn1, Lsm12, Sus1), e por fim, proteínas de função desconhecida e ligantes de Lsm12 (Pbp1, Pbp4) (KEDERSHA et al., 2002; KEDERSHA et al., 2005; ANDERSON; KEDERSHA, 2006; BUCHAN; MUHLRAD; PARKER, 2008; BALAGOPAL; PARKER, 2009; GROUSL et al., 2009; BUCHAN; NISSAN; PARKER, 2010; CUENCA-BONO et al., 2010; SWISHER; PARKER, 2010). Logo, a composição destes corpúsculos bem como as condições que induzem ou suprimem sua agregação continuam sendo alvo de investigação. Alguns trabalhos de revisão sobre o assunto foram publicados recentemente (KEDERSHA; ANDERSON, 2009; BUCHAN; NISSAN; PARKER, 2010; THOMAS et al., 2011).

Tanto os *P bodies* como os grânulos de estresse são estruturas dinâmicas e formam-se simultaneamente em células submetidas a estresses ambientais e

apresentam proteínas em comum, como Xrn1 e eIF4E (KEDERSHA et al., 2005; HOYLE et al., 2007; BRENGUES; PARKER, 2007). Entretanto, os *P bodies* e os grânulos de estresse diferem nos seguintes aspectos: 1) apenas os *P bodies* são observados em células em fase exponencial de crescimento e sem estresse, 2) apenas a formação dos grânulos de estresse necessita da fosforilação de eIF2 α induzida por estresse e 3) os grânulos de estresse são definidos pelos fatores de início da tradução (complexo de pré-iniciação 48S: eIF3, eIF4A, Pab1 e subunidade ribossomal 40S), enquanto que os *P bodies* são definidos pelos componentes da maquinaria de degradação de mRNA Dcp1, Dcp2 e Edc3 (TEIXEIRA et al., 2005; KEDERSHA et al., 2005; BUCHAN; PARKER, 2009; KEDERSHA; ANDERSON, 2009). Portanto, os mRNAs agregados nos *P bodies* seriam direcionados para a degradação, enquanto que os mRNAs presentes nos grânulos de estresse estariam mais propensos a retornar para a tradução após remoção do estresse (Figura 7).

Muitas proteínas já foram identificadas por se agregarem em grânulos de estresse após aplicação de estresse, tanto para mamíferos como para leveduras, e a lista destas está em constante reformulação (KEDERSHA; ANDERSON, 2009; THOMAS et al., 2011). Para leveduras, além das proteínas do complexo de pré-iniciação 48S, foram identificadas outras proteínas envolvidas na degradação de mRNA, como Dhh1 (GROUSL et al., 2009; SWISHER; PARKER, 2010) e Sus1 (CUENCA-BONO et al., 2010). Em mamíferos, foi mostrado que eIF5A hipusinado é necessário para promover a formação de grânulos de estresse induzidos por arsenito (LI et al., 2010), o que sugere uma importância da hipusinação, e talvez de eIF5A, na formação destes agregados citoplasmáticos. Ainda, foi verificada a localização citoplasmática de eIF5A nos grânulos de estresse induzidos por diferentes estresses, como tratamentos com drogas (arsenito e clotrimazol) e por choque térmico (LI et al., 2010). Estes dados da literatura, somados à identificação de outros fatores de alongação nos grânulos de estresse, entre eles eEF3 e eEF1B(γ) (HAŠEK, J.)¹, despertaram o interesse de investigar a presença de eIF5A nestes corpúsculos induzidos por choque térmico.

Recentemente, foi descrito que a formação dos grânulos de estresse em levedura pode ser induzida por vários fatores, entre eles, choque térmico a 46°C (GROUSL et al., 2009), depleção de glicose (BUCHAN; MUHLRAD; PARKER, 2008;

¹ HAŠEK, J. (Institute of Microbiology - Academy of Sciences of the Czech Republic) Comunicação pessoal, 2010.

SWISHER; PARKER, 2010), adição de arsenito (SWISHER; PARKER, 2010), adição de NaN_3 0,5% (BUCHAN; YOON; PARKER, 2011) e adição de etanol 15% (KATO et al., 2011). Ainda, segundo o tipo de estresse aplicado nas células, o conteúdo dos grânulos de estresse formados apresenta proteínas específicas (KEDERSHA; ANDERSON, 2009; BUCHAN; NISSAN; PARKER, 2010; THOMAS et al., 2011). Portanto, sabe-se que sua composição pode variar, entretanto, sua função celular não está eluciada, o que torna interessante a investigação de quais os componentes dos grânulos de estresse são essenciais para sua formação.

Como representado na Figura 7, os *P bodies* e grânulos de estresse podem estar co-localizados. Em células de mamíferos, foi verificado que estes corpúsculos estão ancorados, já em levedura estes estariam sobrepostos e são estruturas independentes (KEDERSHA et al., 2005; BUCHAN; MUHLRAD; PARKER, 2008). Em *S. cerevisiae*, a formação dos *P bodies* e grânulos de estresse pode ser suprimida ou modificada em diversas linhagens mutantes, o que torna a levedura um modelo de estudo interessante (COLLER; PARKER, 2005; DECKER; TEIXEIRA; PARKER, 2007; TEIXEIRA; PARKER, 2007; BUCHAN; MUHLRAD; PARKER, 2008; NISSAN; PARKER, 2008). Baseado nos estudos dessas linhagens, foi proposto que a formação dos grânulos de estresse é favorecida quando há *P bodies* pré-existentes, o que sugere uma relação funcional entre eles (BUCHAN; MUHLRAD; PARKER, 2008).

Apesar de eIF5A ter sido envolvido recentemente com a elongação da tradução (GREGIO et al., 2009; SAINI et al., 2009), o mecanismo pelo qual eIF5A exerce sua função permanece ainda indeterminado. Além disso, os efeitos de eIF5A na degradação de mRNA (ZUK; JACOBSON, 1998; VALENTINI et al., 2002) e na repressão da tradução mediada por estresse (LI et al., 2010) também precisam ser esclarecidos.

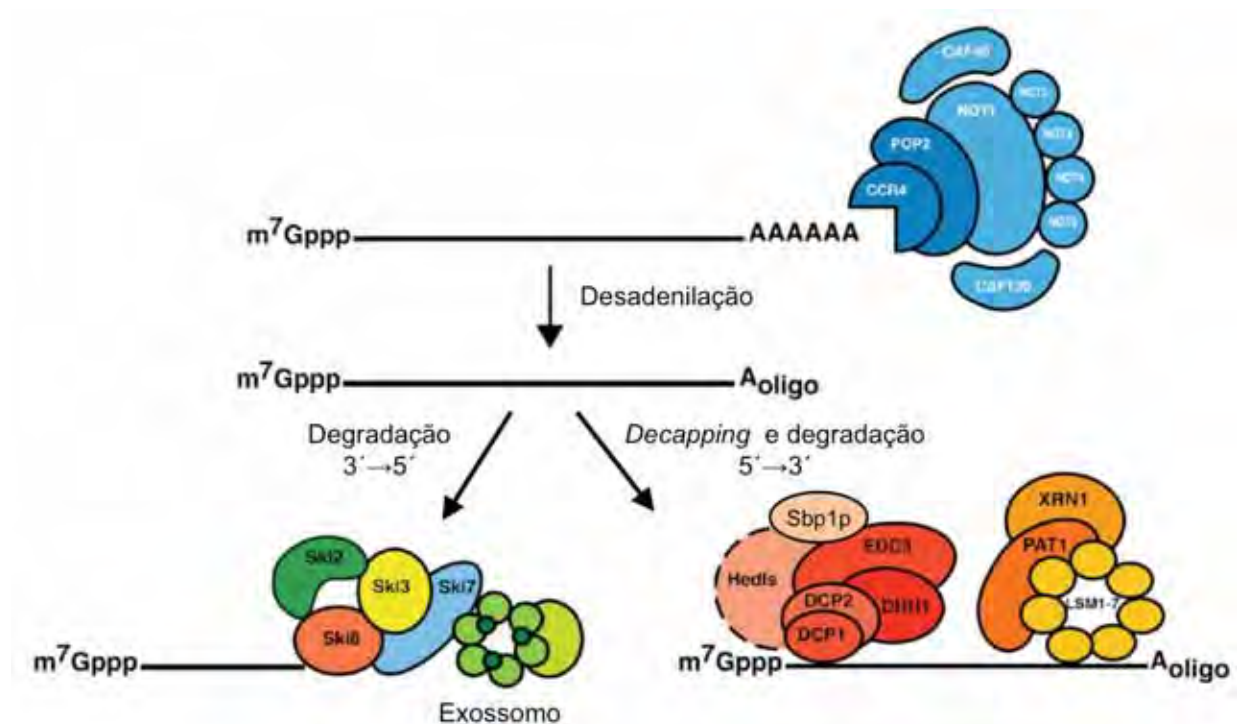


Figura 6. Principais vias de degradação do mRNA eucariótico. O mRNA é primeiramente submetido à remoção da cauda de poli(A)⁺ pelo complexo Ccr4/Not1-5/Pop2, posteriormente este pode ser degradado por uma das vias mostradas. O capacete é removido pelo complexo Dcp1/Dcp2, então o mRNA é degradado no sentido 5'→3' por Xrn1. Alternativamente, a degradação ocorre no sentido 3'→5' pelo complexo do exossomo (adaptada de PARKER; SHETH, 2007).

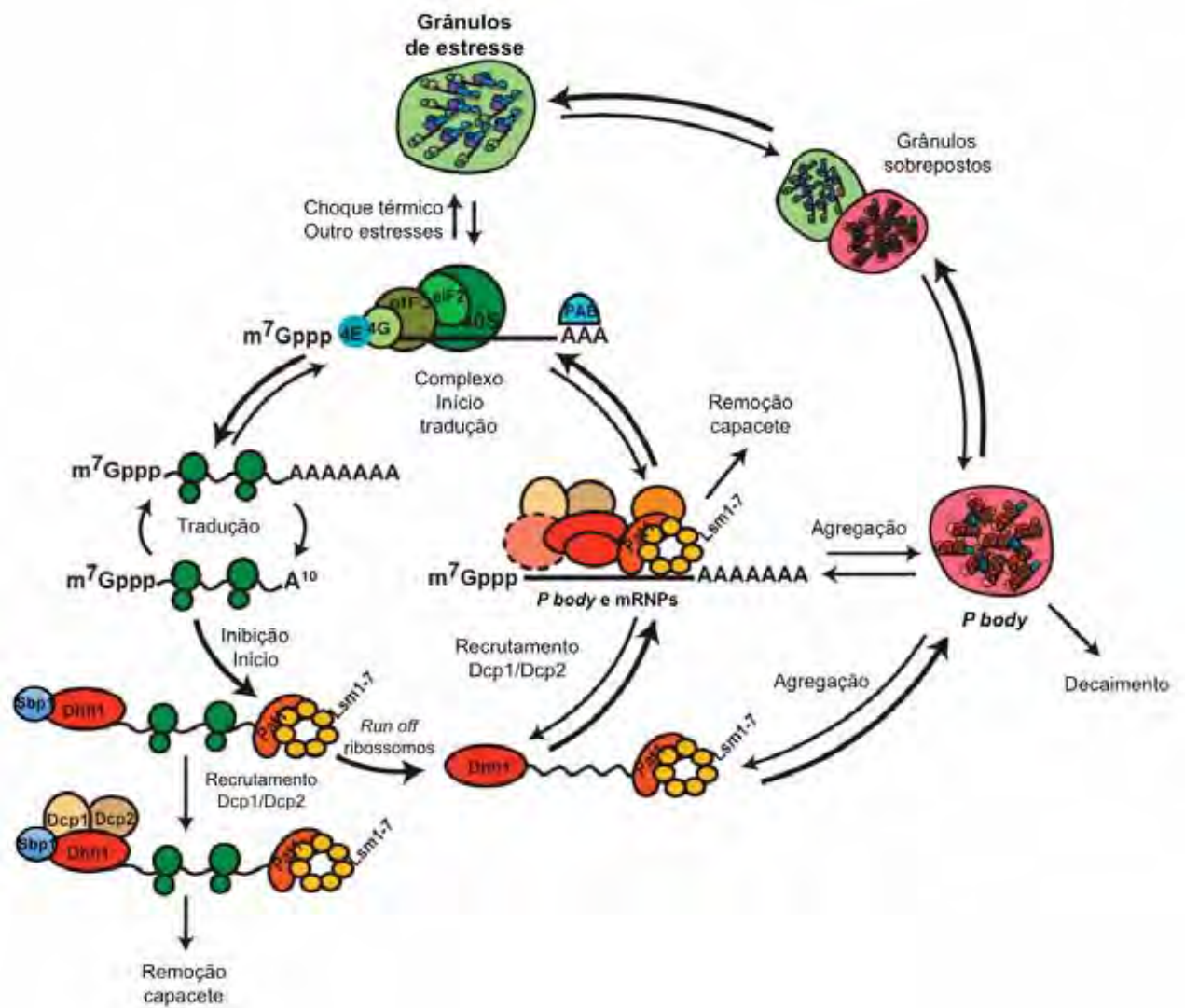


Figura 7. Metabolismo de mRNA. O mRNA pode existir em ao menos três locais no citoplasma: nos polissomos, nos *P bodies* ou nos grânulos de estresse. O recrutamento de repressores da tradução, como Dhh1 e Pat1, podem induzir movimento do mRNA para o estado de não-tradução. Uma competição cinética ocorre entre as seguintes etapas: saída dos mRNAs da tradução (*run-off*), recrutamento da maquinaria de tradução, remoção do capete 7mG, degradação do transcrito, agregação dos *P bodies* e retorno do mRNA para a tradução. Condições limitantes do início da tradução podem levar à agregação dos grânulos de estresse, onde a concentração de proteínas da tradução é alta (adaptada de BALAGOPAL; PARKER, 2009).

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi ampliar a compreensão dos efeitos celulares de eIF5A na inter-relação das etapas da tradução, sua repressão e degradação de mRNA em *S. cerevisiae*.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Como descrito acima, as etapas de tradução, repressão da tradução e da degradação dos mRNAs estão relacionadas. Uma vez que eIF5A já foi envolvido com os processos de tradução e degradação, estes objetivos específicos foram estabelecidos para melhor entender o papel de eIF5A nesse contexto.

- 3.1.** Estudar a localização subcelular de proteínas para determinar a relação de eIF5A com a organização dos *P bodies*;
- 3.2.** Analisar o perfil polissomal de eIF5A em condições de repressão da tradução induzida por depleção de glicose;
- 3.3.** Analisar a existência de interação genética sintética entre mutantes de eIF5A e mutantes de fatores envolvidos com a repressão da tradução e/ou degradação de mRNA;
- 3.4.** Avaliar a relação entre os grânulos de estresse, eIF5A e Sbp1;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

Os materiais (linhagens, plasmídeos e oligonucleotídeos) utilizados neste trabalho estão listados na tabelas 1, 2 e 3, respectivamente.

Tabela 1. Linhagens utilizadas nos experimentos.

Linhagem	Outros nomes	Genótipo	Origem
SVL8		<i>MAT_a ade2 trp1 ura3 leu2 his can1 cyt1::HIS3</i>	Coleção do laboratório
SVL10		<i>MAT_a ade2 trp1 ura3 leu2 his3 can1 cyt1::HIS3 tif51A-1 (tif51A^{P83S})</i>	Coleção do laboratório
SVL14	SVY144 e PSY8-35	<i>MAT_a ade2 his3 leu2 trp1 ura3 can1 tif51A-1 (tif51A^{P83S})</i>	(VALENTINI et al., 2002)
SVL17		<i>MAT_a ade2 trp1 ura3 leu2 his3 can1 tif51A-1 (tif51A^{P83S})</i>	Coleção do laboratório
SVL55		<i>MAT_a ura3 trp1 leu2</i>	Pamela Silver
SVL73	SVY479 e PSY1176	<i>MAT_a leu2 ade2 ade3 ura3 lys2 can1</i>	Pamela Silver
SVL100	PSY1190	<i>MAT_a ade2 his3 leu2 lys2 trp1 ura3 xrn1::URA3</i>	Pamela Silver
SVL101	PSY1757	<i>MAT_a ade leu2 trp1 ura3 tif51A-1 (tif51A^{P83S}) xrn1::URA3</i>	Pamela Silver
SVL114		<i>MAT_a leu2-3 ade2-1 ade3 his3-11-15 trp1-1 tif51A-3 (tif51A^{C39Y/G118D})</i>	(FRIGIERI et al., 2007)
SVL132		<i>MAT_a his3 leu2 ura3 trp1 tif51A::HIS3 [TIF51A/URA3/CEN]</i>	Coleção do laboratório

SVL323		<i>MATα his3 leu2 ura3 trp1 tif51A::HIS3 [tif51A-1/LEU2/CEN] (tif51A^{P83S})</i>	Coleção do laboratório
SVL445		<i>MATα ade2 ura3 his3 leu2 lys2 trp1 tif51A-3::URA3 (tif51A^{C39Y/G118D}) ssd1::LEU2</i>	Coleção do laboratório
SVL447		<i>MATα ade2 ura3 his3 leu2 lys2 trp1 can1 tif51A-3::URA3 (tif51A^{C39Y/G118D}) ssd1::LEU2</i>	Coleção do laboratório
SVL513		<i>MATα trp1 his3 leu2 ura3 ade2 tif51A-1 (tif51A^{P83S}) ssd1::LEU2</i>	Coleção do laboratório
SVL529		<i>MATα his3 leu2 ura3 trp1 tif51A::HIS3 [tif51A-3/LEU2/CEN] (tif51A^{C39Y/G118D})</i>	Coleção do laboratório
SVL595	yAS2324	<i>MATα ade2 his 3 leu2 trp1 ura3 lsm1::LEU2</i>	Charles Cole
SVL596		<i>MATα his3 leu2 ura3 pat1::kanMX4</i>	Charles Cole
SVL599		<i>MATα his3 leu2 ura3 trp1 tif51A::HIS3 [tif51A^{Q22H/L93F}/TRP1/CEN]</i>	Coleção do laboratório
SVL634		<i>MATα his3 leu2 ura3 trp1 tif51A::HIS3 [tif51A^{K56A}/LEU2/CEN]</i>	Coleção do laboratório
VZL781		<i>MATα his3 leu2 ura3 dhh1::kanMX4</i>	Coleção de nocautes
VZL784		<i>MATα his3 leu2 ura3 sbp1::kanMX4</i>	Coleção de nocautes
VZL789		<i>MATα leu2 trp1 ura3 his4 cup1::LEU2/PGK1pGIMFA2pG DCP2-GFP</i>	(SHETH; PARKER, 2003)
VZL801	yRP1345	<i>MATα his4 leu2 lys 2 ura3 dcp1-2::TRP1 ski8::URA3</i>	(DUNCKLEY ; TUCKER; PARKER, 2001)

VZL910		<i>MATα leu2 trp1 his3 ura3 cca1-1 DCP2-GFP (NEO)</i>	Este trabalho
VZL912		<i>MATα leu2 trp1 his3 his4 ura3 ade2 ade3 DCP2-GFP (NEO)</i>	Este trabalho
VZL915		<i>MATα leu2 trp1 his3 ura3 tif51A-3 DCP2-GFP (NEO)</i>	Este trabalho
VZL996		<i>MATα leu2 lys2 ura3 dcp1-2::TRP1 tif51A::HIS3 [tif51A-1/LEU2/CEN] (tif51A^{P83S})</i>	Este trabalho
VZL1109	Sbp1-GFP	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 SBP1-GFP::HIS3MX6</i>	GFP collection
VZL1110	CRY204	<i>MATα ura3 leu2 his3 trp1 lys2 suc2 RPG1-GFP::kanMX</i>	Jiří Hašek
VZL1111	CRY255	<i>MATα ura3 leu2 his3 trp1 lys2 suc2 RPG1-mRFP::kanMX</i>	Jiří Hašek
VZL1112		<i>MATα his3 leu2 ura3 trp1 lys2 RPG1-mRFP::kanMX tif51A::HIS3 [TIF51A/URA3/CEN]</i>	Este trabalho
VZL1113		<i>MATα his3 leu2 ura3 trp1 RPG1-mRFP::kanMX tif51A::HIS3 [tif51A^{Q22H/L93F}/TRP1/CEN]</i>	Este trabalho
VZL1114		<i>MATα his3 leu2 ura3 trp1 lys2 RPG1-mRFP::kanMX tif51A::HIS3 [tif51A^{K56A}/LEU2/CEN]</i>	Este trabalho
VZL1115		<i>MATα his3 leu2 ura3 trp1 lys2 RPG1-mRFP::kanMX tif51A::HIS3 [tif51A-3/LEU2/CEN] (tif51A^{C39Y/G118D})</i>	Este trabalho
VZL1116		<i>MATα his3 leu2 ura3 trp1 lys2 met15 SBP1-GFP::HIS3MX6 RPG1-mRFP::kanMX</i>	Este trabalho
VZL1117		<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 dcp2-mCherry::norseotricina [pSV137]</i>	Este trabalho
VZL1118		<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 ngr1-mCherry::norseotricina [pSV137]</i>	Este trabalho

VZL1119	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 yef3-mCherry::norseotricina</i> [pSV137]	Este trabalho
VZL1124	<i>MATα his3 leu2 ura3 trp1 lys2 RPG1-mRFP::kanMX tif51A::HIS3 yef3-mCherry::norseotricina</i> [TIF51A/URA3/CEN]	Este trabalho
VZL1125	<i>MATα his3 leu2 ura3 trp1 RPG1-mRFP::kanMX tif51A::HIS3 yef3-mCherry::norseotricina</i> [tif51A-3/LEU2/CEN] (<i>tif51A</i> ^{C39Y/G118D})	Este trabalho
VZL1126	<i>MATα his3 leu2 ura3 trp1 RPG1-mRFP::kanMX tif51A::HIS3 yef3-mCherry::norseotricina</i> [tif51A ^{Q22H/L93F} /TRP1/CEN]	Este trabalho

Tabela 2. Plasmídeos utilizados nos experimentos.

Plasmídeo	Outros nomes	Descrição	Origem
pSV59	pRS315	Vetor <i>LEU2/CEN</i>	(SIKORSKI; HIETER, 1989)
pSV60	pRS316	Vetor <i>URA3/CEN</i>	(SIKORSKI; HIETER, 1989)
pSV65	pRS426	Vetor <i>URA3/2μ</i>	(CHRISTIANSON et al., 1992)
pSV76	pPS808	Vetor <i>URA3/2μ</i> para expressão em fusão com GFP (N-terminal, GALp)	Pamela Silver
pSV137		<i>TIF51A</i> clonado em vetor GALp-GFP (pSV76)	Coleção do laboratório
pSV138		<i>TIF51A</i> clonado em vetor pSV60	Coleção do laboratório
pSV300		<i>EFT2</i> clonado no vetor pSV64	Coleção do laboratório

pVZ955	pRP1175	Fusão <i>DCP2-GFP</i> clonada em vetor <i>LEU2/2μ</i>	(COLLER; PARKER, 2005)
pVZ1104		Dominante negativo de eEF2, <i>eft2^{H699K}</i> , gerado por mutação sítio dirigida a partir do pSV300	Coleção do laboratório
pVZ1181	pFM699	Plasmídeo pFM699 contruído a partir do pFA6a-natNT2 (JANKE et al., 2004) com cassete de mCherry clonado nos sítios de <i>Bam</i> HI e <i>Sal</i> I	Marian Farkasovsky e Roger Tsein

Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos.

Oligonucleotídeo	Sequência
VZO912	5' - CGA ATG GAA CTT CAG GGT CTA ATG AAT TAT TAA GCA TTT TGC ATA GGA AGC GTA CGC TGC AGG TCG AC - 3'
VZO913	5' - CGG CTG CCT TCA TTT ACA GTG TGT CTA TAA AAC GTA TAA CAC TTA TTC TT - 3'
VZO914	5' - TCC TAA TAG GAA CAA TGT TCC GCC AAT TCA TCC TTC TCT TCT ACA TCG TAC GCT GCA GGT CGA C - 3'
VZO915	5' - CGT AGA GAC GCA GAT AAA ACT GCG GAC AAG ATT AAA ATT TTC TTT TTT TGT CTT TTG TAA ATC GAT GAA TTC GAG CTC G - 3'
VZO916	5' - TCT TTT TGA TCA CTG CTT TCA CAG TTT TCT TTA AGA TTT TTA TTG CGT ACG CTG CAG GTC GAC - 3'
VZO917	5' - TTG ATC AAT AAA AAT CTT AAA GAA AAC TGT GAA AGC AGT GAT CAA AAA GAA TCG ATG AAT TCG AGC TCG - 3'

4.2. MÉTODOS

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

4.2.1. Transformação de *S. cerevisiae*

Uma colônia da linhagem de interesse foi inoculada em 5 mL de meio adequado e incubada a 30°C sob agitação por toda a noite. Um volume de 1,5 mL da cultura foi centrifugado na velocidade máxima por 5 s. Após a remoção do sobrenadante, as células foram lavadas com 1 mL de água ultrapura estéril, suspensas em 1 mL de solução de acetato de lítio 100 mM e então incubadas por 5 min a 30°C. As células foram coletadas por centrifugação e o sobrenadante foi removido. Foram adicionados, na seguinte ordem, 240 µL de PEG 50%, 36 µL de acetato de lítio 1 M, 25 µL de DNA de esperma de salmão (2 mg/mL) e 5 µL de DNA plasmidial (100 ng a 5 µg), completando-se o volume de reação com 45 µL de água ultrapura estéril. O microtubo foi então agitado vigorosamente (vortex) por 1 min e incubado a 42°C por 20 min. Os microtubos foram centrifugados na velocidade máxima por 10 s. Após o sobrenadante ter sido removido, as células foram suspensas em 150 µL de água ultrapura estéril e então plaqueadas em meio seletivo apropriado. As placas foram incubadas a 30°C até o aparecimento de colônias.

4.2.2. Reação de PCR

As reações de PCR foram realizadas em microtubos de 0,5 mL contendo 1 µM de cada oligonucleotídeo, 1 µL de uma mistura de desoxiribonucleotídeos 100 µM cada (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 1 µL de DNA genômico de levedura e 2 U da enzima *Taq Hifi DNA Polimerase (Invitrogen)*, num volume final de reação de 50 µL. 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 min. Os produtos das reações foram então analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TAE (Tris 40 mM, ácido acético glacial 0,11% e EDTA 1 mM).

4.2.3. Extração de DNA genômico de levedura

A linhagem de interesse foi cultivada até a saturação em 10 mL de meio YPD líquido a 30°C, sob agitação. O volume total de cultura foi submetido à centrifugação a 3.000 *xg* por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células suspensas em 500 µL de água ultrapura e transferidas para um microtubo de 1,5 mL. O tubo foi submetido à centrifugação a 13.000 *xg* por 1 min, o sobrenadante foi descartado e as células suspensas no líquido residual. A esse tubo foram adicionados 200 µL de tampão de lise (Triton X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM), 200 µL de solução PCI (Fenol:Clorofórmio:Álcool isoamílico a 25:24:1) e aproximadamente 300 mg de pérolas de vidro. A mistura foi agitada em vortex por 3 min. Posteriormente, foram adicionados 200 µL de tampão TE pH 8,0 (Tris 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM pH 8,0). O tubo foi agitado em vortex e submetido à centrifugação a 13.000 *xg* por 5 min. Após esse procedimento, a fase aquosa foi transferida para um microtubo de 1,5 mL ao qual foram adicionados 200 µL de solução PCI. A mistura foi agitada novamente, submetida à centrifugação a 13.000 *xg* por 5 min e a fase aquosa transferida para um novo microtubo de 1,5 mL. Esse procedimento de extração foi repetido duas vezes. A seguir, foi adicionado ao tubo 1 mL de etanol absoluto gelado e o conteúdo homogeneizado por inversão. O tubo foi centrifugado a 13.000 *xg* por 2 min a 4°C e o sobrenadante descartado. O precipitado foi suspenso em 400 µL de TE pH 8,0 e foram adicionados 3 µL de RNase (10 mg/mL). A suspensão foi incubada por 30 min a 37°C. Em seguida, foram adicionados 200 µL de solução PCI e o tubo foi agitado brevemente em vortex. A mistura foi submetida à centrifugação a 13.000 *xg* por 5 min a 4°C e a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL. Ao tubo foram adicionados 10 µL de acetato de amônio 4 M e 1 mL de etanol absoluto gelado. O conteúdo dos tubos foi misturado por inversão e estes foram centrifugados a 13.000 *xg* por 2 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 400 µL de etanol 75% gelado. Após a secagem, o precipitado foi suspenso em 50 µL de TE pH 8,0. A concentração do DNA genômico foi determinada por espectrofotometria a 260 nm, e a relação entre as absorbâncias a 260/280 nm foi analisada. Como parâmetro de qualidade, foram consideradas adequadas amostras com valor da razão entre 1,8-2,0. Este DNA foi armazenado em freezer a -20°C até o momento do uso.

4.2.4. Microscopia de fluorescência para GFP, RFP e mCherry

Para a análise da formação de *P bodies*, células de diferentes linhagens de interesse expressando a fusão Dcp2-GFP, um marcador de *P bodies*, foram cultivadas em meio apropriado a 25°C ou 30°C até D.O._{600nm} = 0,6 (TEIXEIRA et al., 2005). Quando o plasmídeo pSV137 (VALENTINI et al., 2002) foi utilizado, a expressão de GFP-eIF5A foi induzida com galactose 4% por 1 a 2 h em meio apropriado. Já quando mutantes termossensíveis foram utilizados, as células foram submetidas a 38°C por 1 a 4 h para induzir a depleção de eIF5A (VALENTINI et al., 2002). Então, as células foram coletadas (13.000 xg por 1 min), lavadas com tampão PBS 1x (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 10 mM; KH₂PO₄ 1,8 mM pH 7,4), ressuspensas em 1 mL de solução PBS 1x e incubadas por 10 min sob agitação e na temperatura adequada, para induzir a formação dos *P bodies*. Para analisar a distribuição dos *P bodies*, a proteína de fusão Dcp2-GFP foi analisada com uso do microscópio de fluorescência *Nikon Eclipse TE300* com objetiva de 100x.

Nos experimentos de formação de grânulos de estresse foram utilizadas proteínas consideradas marcadores destes corpúsculos em fusão com GFP (verde), RFP (vermelho) ou mCherry (vermelho). Para gerar as fusões com a proteína mCherry foi utilizado o plasmídeo pFM699 (pVZ1181), o qual foi construído por Marian Farkasovsky e Roger Tsien, do *Institute of Molecular Biology - Slovak Academy of Sciences* (Bratislava, República Eslovaca). As fusões de Dcp2, Ngr1 e eEF3 à proteína mCherry foram realizadas por PCR utilizando os oligonucleotídeos VZO912/913, VZO914/915, VZO916/917, respectivamente. As células foram cultivadas em meio apropriado até D.O._{600nm} = 0,6 a 25°C ou 30°C, coletadas por centrifugação, ressuspensas em meio pré-aquecido a 46°C e incubadas nesta temperatura por 10 min. Em seguida, para a visualização dos corpúsculos, as células foram lavadas com meio SC com glicose. Para fixação das células nas lâminas foram utilizadas finas camadas de meio SC com glicose contendo agarose 1%. A distribuição das proteínas de fusão com GFP, RFP ou mCherry foram analisadas com uso do microscópio invertido *Olympus IX-71* com objetiva de 100x, e as imagens foram captadas e processadas pelo software *Olympus Cell R*.

4.2.5. Perfil polissomal

4.2.5.1. Preparo do gradiente de sacarose.

Os gradientes de sacarose foram preparados adicionando-se, subsequentemente, em tubo de polialômero (14 x 89 mm/13,2 mL - *Beckman*) 2,1 mL de soluções de sacarose 10%, 20%, 30%, 40% e 50% em tampão adequado (Tris-HCl 20 mM pH 7,5; acetato de potássio 50 mM; MgCl₂ 10 mM; DTT 1 mM; ciclo-heximida 100 µg/mL), partindo-se da menor concentração e em sentido crescente de concentração, utilizando-se uma seringa de 3 mL e agulha de extremidade não-perfurante de 15 cm. Em seguida, os gradientes foram incubados a 4°C durante a noite para permitir o equilíbrio entre as fases.

4.2.5.2. Preparo do extrato e centrifugação dos gradientes.

Cada linhagem de interesse foi crescida em 100 mL de meio YPD até D.O._{600nm} = 0,4 a 0,6 a 25°C. Quando necessário, as culturas foram transferidas para um banho com agitação a 38°C por 3 h. A maquinaria de tradução foi bloqueada adicionando-se ciclo-heximida para uma concentração final de 100 µg/mL de meio e as culturas foram incubadas a 38°C por 5 min. As culturas foram centrifugadas a 3.500 *xg* por 5 min a 4°C. Em seguida, as células foram lavadas, suspendidas em 2,5 mL de tampão de lise (Tris-HCl 20 mM pH 7,5; KCl 50 mM; MgCl₂ 10 mM; DTT 1 mM; ciclo-heximida 100 µg/mL), transferidas para tubo cônico de 15 mL e centrifugadas a 3.500 *xg* por 5 min a 4°C. Para realizar a lise, o precipitado de células foi suspenso em 350 µL de tampão de lise adicionado de inibidores de protease (*EDTA-free, Complete Protease Inhibitors Cocktail* - Roche) e inibidor de RNase (1 µL/mL de *RNasin* - Promega). O precipitado foi transferido para um microtubo de 1,5 mL, adicionado de 1 g de pérolas de vidro geladas e as células foram quebradas em vortex com 8 ciclos de 20 s de lise seguidos de 60 s de incubação em banho de gelo. Com uma agulha, o fundo do microtubo foi furado e encaixado em novo microtubo de 1,5 mL. Os tubos foram colocados em um tubo cônico de 15 mL e centrifugados momentaneamente a 3.000 *xg* para transferir o lisado para o novo microtubo. Em seguida, o lisado transferido foi centrifugado a 13.000 *xg* por 15 min a 4°C, para clarificação da amostra. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL. A concentração da amostra foi determinada por espectrofotometria a 260 nm, e a relação entre as absorbâncias a 260/280 nm foi analisada. Como parâmetro de qualidade, foram consideradas adequadas as amostras com valor da razão entre 1,8-2,0.

4.2.5.3. Fracionamento dos gradientes e coleta das frações.

O volume de amostra equivalente a 10 ou 20 D.O._{260nm} foi aplicado sobre o gradiente de sacarose do item 4.2.5.1. e centrifugado a 39.000 rpm por 3 h a 4°C em rotor SW41Ti, utilizando ultracentrífuga Beckman. Para fracionamento e coleta dos gradientes de sacarose contendo o extrato de levedura separado por densidade, foi utilizado um sistema *Econo Gradient Pump Kit (Bio-Rad Laboratories)*, utilizando um fluxo contínuo de 1 mL/min de solução de sacarose 60% para empurrar a amostra do gradiente. A análise das amostras levou em conta a leitura de absorbância a 254 nm, que deu origem aos traçados do perfil polissomal.

4.2.6. Teste de sensibilidade a temperatura

As linhagens de interesse foram inoculadas em 10 mL de meio apropriado e crescidas até atingir a concentração de 1 a 2×10^7 células/mL (D.O._{600 nm} = 0,6 a 0,9). Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação (600 *xg* por 7 min) e suspendidas para uma concentração final de $2,5 \times 10^8$ células/mL para todas as amostras testadas. 200 µL da suspensão de células foram transferidos para o primeiro poço da microplaca (96 poços). Cinco diluições seriadas da ordem de 10x foram feitas utilizando um micropipetador multicanal. Em seguida, 4 µL de cada diluição foram aplicados nas placas com os meios a serem testados e incubou-se por 2 a 3 dias na(s) temperatura(s) adequada(s).

5. RESULTADOS

5.1. eIF5A e a organização dos *P bodies*

Os *P bodies* são estruturas microscópicas, visualizadas na forma de corpúsculos (pontos) ou agregados dinâmicos presentes no citoplasma, os quais são compostos por fatores ativadores da remoção do capacete de 7mG e de degradação de mRNA. Como mencionado anteriormente, quando ocorre aumento da desassociação de mRNAs com os ribossomos devido à inibição do início da tradução (por alelos condicionais de fatores de início da tradução, por exemplo), os *P bodies* aumentam em tamanho e quantidade. Por outro lado, quando os mRNAs são retidos nos ribossomos (pelo tratamento das células com ciclo-heximida, que bloqueia a elongação da tradução), ocorre diminuição significativa dos *P bodies* (PARKER; SHETH, 2007).

Apesar de eIF5A já ter sido envolvido como o processo de degradação de mRNA, não existe uma concordância a respeito de como esse envolvimento ocorre, ou seja, se ocorre de maneira direta ou indireta (ZUK; JACOBSON, 1998; VALENTINI et al., 2002). Assim, uma vez que eIF5A está envolvido com tradução e degradação de mRNAs, torna-se interessante verificar se esse fator está presente nos *P bodies*.

Para isto, foram realizados experimentos utilizando proteínas de fusão com GFP (*Green Fluorescent Protein*). Primeiramente, foram realizados estudos de localização celular utilizando células de uma linhagem selvagem (SVL55) contendo um plasmídeo que expressa GFP-eIF5A sob regulação do promotor de galactose (pSV137). Como foi verificado anteriormente (VALENTINI et al., 2002), a proteína de fusão GFP-eIF5A é funcional, o que confirma que a estrutura e a localização desta fusão é semelhante à eIF5A sem o tag de GFP. Como marcador dos *P bodies*, utilizou-se uma linhagem selvagem que possui Dcp2-GFP como única fonte de Dcp2 na célula. Na Figura 8, é possível observar imagens da microscopia destas células em diferentes condições de estresse celular que inibem transientemente o início da tradução. Após indução com galactose, a linhagem expressando a proteína GFP-eIF5A apresentou uma distribuição citoplasmática uniforme da fluorescência, mesmo após condições de estresse celular, como depleção de glicose ou de aminoácidos e adição de butanol. Já nas células contendo Dcp2-GFP, foi observada a presença dos *P bodies* na condição controle, e depois de aplicados os estresses, foram observados acúmulo desta proteína nos *P bodies* e aumento no tamanho destes. Estes dados estão em concordância com trabalhos prévios, nos quais foi observado

um acúmulo de Dcp2 nos *P bodies* e aumento destes na retirada de glicose (BRENGUES; TEIXEIRA; PARKER, 2005; TEIXEIRA et al., 2005; TEIXEIRA; PARKER, 2007). Baseado nestas observações, conclui-se que eIF5A não se localiza nos *P bodies*, mesmo em condições de estresse celular. Estes resultados, apesar de não excluïrem, afastam a possibilidade de uma ação direta de eIF5A na degradação de mRNAs, pois a desaceleração da tradução nos mutantes de eIF5A pode gerar acúmulo de mRNAs. Portanto estes dados reforçam a idéia de que o defeito de estabilização de mRNAs de mutantes de eIF5A ocorra de maneira indireta.

Uma vez que eIF5A está envolvido com a maquinaria de tradução e, mesmo que indiretamente, com a degradação de mRNA nas células (ZUK; JACOBSON, 1998; VALENTINI et al., 2002), foi verificado o efeito da depleção de eIF5A no acúmulo dos *P bodies*. Para isto, foi utilizada uma linhagem mutante de eIF5A (*tif51A-3*), a qual após ser submetida a temperatura não permissiva (38°C), apresenta fenótipo bastante severo de depleção de eIF5A (VALENTINI et al., 2002). Foi introduzido nesta linhagem um plasmídeo que contém o gene da fusão *DCP2-GFP* (pVZ955). Como mostrado na Figura 9, ambas as linhagens selvagem e mutante após depleção de glicose (tratamento com PBS 1x) acumulam *P bodies* a 25°C. Entretanto, apenas a linhagem selvagem é capaz de formar *P bodies* a 38°C. Esta ausência de *P bodies* na linhagem *tif51A-3* após depleção de eIF5A é idêntica ao observado para a linhagem selvagem tratada com ciclo-heximida, um inibidor da elongação da tradução. Portanto, este fenótipo reforça o papel de eIF5A nesta etapa da tradução. Este resultado, juntamente com outras evidências da atuação de eIF5A na elongação da tradução, fazem parte de um artigo publicado na revista *Biochemical and Biophysical Research Communications* (GREGIO et al., 2009), do qual sou co-autora.

A fim de ampliar os estudos de formação de *P bodies* foram utilizadas outras linhagens mutantes. Inicialmente, foi utilizado um mutante do gene *CCA1*, o qual codifica para a tRNA nucleotidiltransferase, enzima necessária para a maturação de tRNAs. O mutante *cca1-1* apresenta defeitos na elongação da tradução e também acumula mRNAs na condição restritiva (PELTZ; DONAHUE; JACOBSON, 1992), de maneira semelhante ao mutante *tif51A-3* de eIF5A (VALENTINI et al., 2002; GREGIO et al., 2009). Como pode ser visto na Figura 10, a linhagem selvagem é capaz de formar *P bodies* em ambas as temperaturas testadas após depleção de glicose (PBS 1x). Interessantemente, de maneira semelhante com o mutante *tif51A-3*, o mutante

cca1-1 não forma *P bodies* na temperatura restritiva. Este resultado complementa a semelhança entre os fenótipos observados para os mutantes de eIF5A e Cca1, ambos fatores envolvidos no processo de elongação da tradução.

Posteriormente, foi utilizado o mutante de elongação *eft2*^{H699K}, um mutante dominante negativo do fator de elongação da tradução 2 (eEF2) (ORTIZ; KINZY, 2005). Para gerar este mutante em nosso laboratório, foi realizada uma mutação sítio dirigida no plasmídeo pSV300 (contendo *EFT2* selvagem em vetor *LEU2/2μ*), a qual foi confirmada por sequenciamento. Como controle neste experimento, foi utilizada a linhagem selvagem expressando Dcp2-GFP (VZL912) e uma linhagem mutante de eIF5A (*tif51A-3*, VZL915), ambas contendo o plasmídeo vazio (*LEU2/2μ*). O fenótipo de sensibilidade à temperatura das linhagens mutantes foi confirmado (dados não mostrados). Como pode ser visto na Figura 11, a linhagem selvagem é capaz de formar *P bodies* em ambas as temperaturas testadas após depleção de glicose (PBS 1x). Da mesma forma que *tif51A-3*, a linhagem selvagem contendo o dominante negativo *eft2*^{H699K} apresenta agregação de *P bodies* na temperatura de 25°C, mas não é capaz de formar os *P bodies* normalmente a 38°C. Este dado fortalece a relação funcional entre eIF5A e eEF2 e o seu envolvimento com elongação da tradução.

A não localização de eIF5A nos *P bodies* e a incapacidade do mutante de eIF5A e de outros fatores envolvidos na elongação da tradução em agregar estes corpúsculos na temperatura não permissiva evidenciam que o defeito de acúmulo de mRNA por mutantes de eIF5A (ZUK; JACOBSON, 1998; VALENTINI et al., 2002) seja secundário ao defeito na tradução.

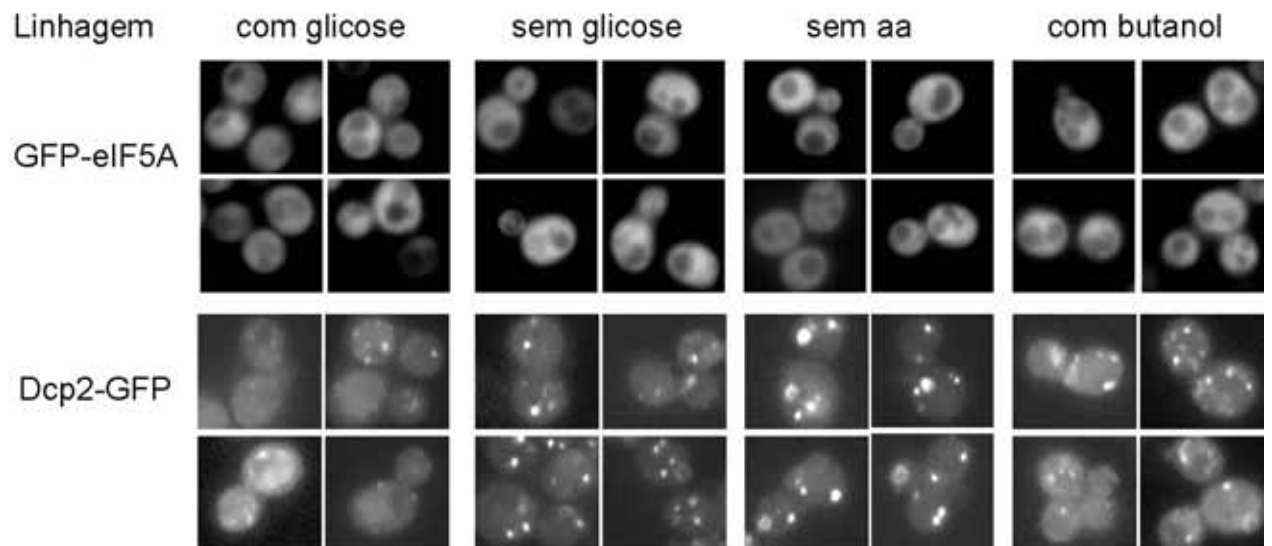


Figura 8. eIF5A não se localiza nos *P bodies* em diferentes condições de estresse. A linhagem selvagem (SVL55) expressando GFP-eIF5A (pSV137) e a linhagem expressando Dcp2-GFP (VZL789) foram coletadas e ressuspensas no meio indicado por 10 min. As células foram visualizadas com uso do microscópio de fluorescência *Nikon Eclipse TE300* e objetiva de 100x.

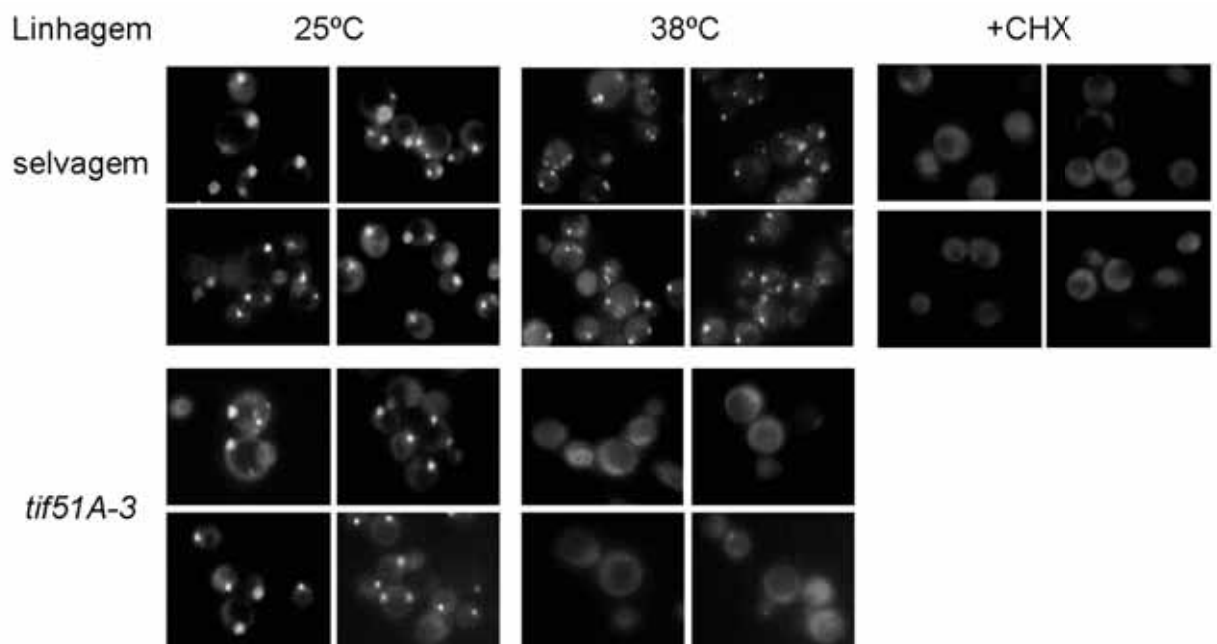


Figura 9. O mutante *tif51A-3* não forma *P bodies* na temperatura não permissiva. As linhagens selvagem (SVL73) e mutante *tif51A-3* (SVL114) expressando Dcp2-GFP (pVZ955) foram cultivadas em meio SC contendo glicose nas temperaturas permissiva (25°C) e não permissiva (38°C) como indicado, seguido de tratamento com PBS 1x (sem glicose) para induzir a formação dos *P bodies*. Como controle, a linhagem selvagem foi incubada com 100 µg/mL de ciclo-heximida por 10 min a 25°C para bloquear a formação dos *P bodies* (+CHX). As células foram visualizadas com uso do microscópio de fluorescência *Nikon Eclipse TE300* e objetiva de 100x.

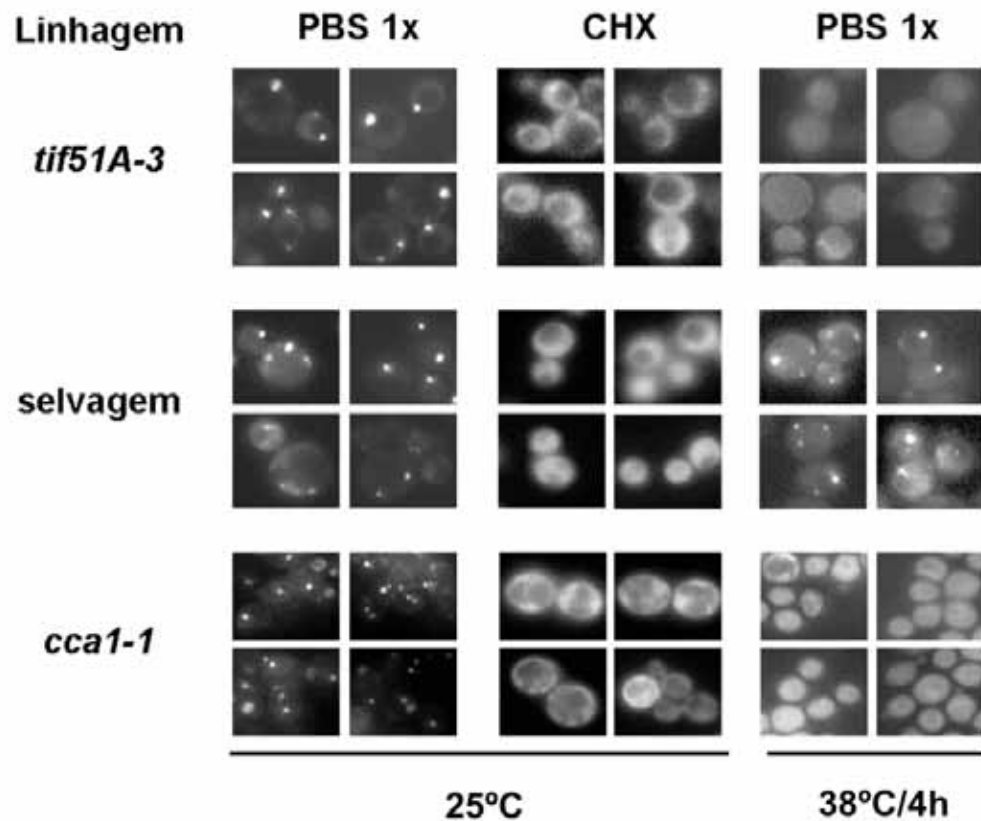


Figura 10. O mutante *cca1-1* não forma *P bodies* na temperatura não permissiva. As linhagens selvagem (SVL73), *tif51A-3* (SVL114) e *cca1-1* (VZL910) expressando Dcp2-GFP foram cultivadas em meio SC contendo glicose nas temperaturas permissiva (25°C) e não permissiva (38°C), como indicado, seguido de tratamento com PBS 1x (sem glicose) para induzir a formação dos *P bodies*. Como controle, as linhagens foram incubadas com 100 µg/mL de ciclo-heximida por 10 min a 25°C para bloquear a formação dos *P bodies* (+CHX). As células foram visualizadas com uso do microscópio de fluorescência *Nikon Eclipse TE300* e objetiva de 100x.

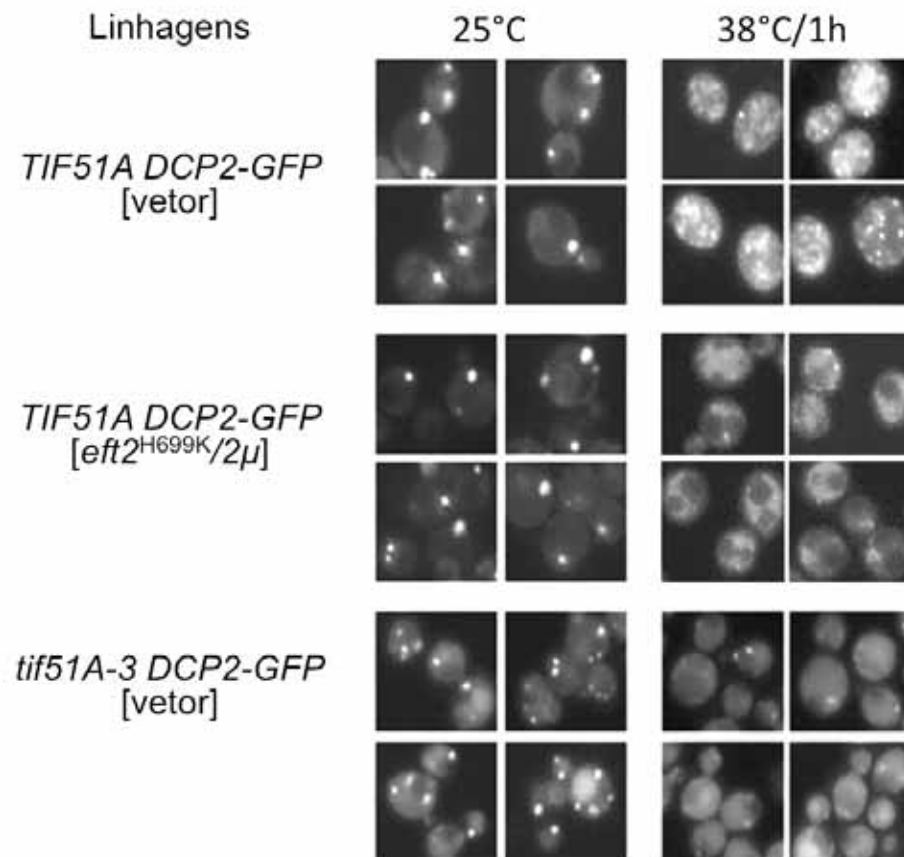


Figura 11. O dominante negativo *eft2*^{H699K} apresenta diminuída formação de *P bodies* na temperatura não permissiva. A linhagem selvagem expressando Dcp2-GFP (VZL912) e contendo plasmídeo vazio (pSV59) ou o dominante negativo *eft2*^{H699K} (pVZ1104), e a linhagem *tif51A-3* expressando Dcp2-GFP (VZL915) e contendo plasmídeo vazio (pSV59) foram cultivadas em meio SC-leu contendo glicose a 25°C até D.O._{600nm} = 0,6, e parte da cultura foi transferida para a temperatura não permissiva (38°C) por 1 h, como indicado, seguido de tratamento com PBS 1x (sem glicose) para induzir a formação dos *P bodies*. As células foram visualizadas com uso do microscópio de fluorescência *Nikon Eclipse TE300* e objetiva de 100x.

5.2. Análise do perfil polissomal de mutantes de eIF5A e *xrn1Δ* em condição de repressão da tradução

Diferentes tipos de estresse celular, como depleção de glicose ou de aminoácidos e presença de álcoois de cadeia longa, por exemplo, levam a uma inibição do início da tradução em *S. cerevisiae*. Assim, através da análise do perfil polissomal de células submetidas a diferentes condições de estresse, é possível verificar a inibição do início da tradução pelo aumento significativo de 80S com simultânea diminuição das frações polissomais (HOLMES et al., 2004). Como esperado, para linhagens mutantes de início da tradução, a retomada do processo de tradução após retirada do estresse ocorre de maneira defeituosa ou não ocorre (BRENGUES; TEIXEIRA; PARKER, 2005). Por outro lado, mutantes com defeitos na retirada do capacete de metilguanosina ou na degradação 5'→3' do mRNA apresentam os mesmos níveis de repressão da tradução nas condições de estresse citadas, quando comparados com selvagem (HOLMES et al., 2004).

No intuito de analisar a resposta de mutantes de eIF5A a este tipo de repressão do início da tradução, foram realizados ensaios de perfil polissomal com a linhagem mutante de eIF5A *tif51A-1* (SVL14 + pSV65), em comparação com a linhagem selvagem (SVL14 + pSV138) e com a linhagem mutante *xrn1Δ* (SVL100). O gene *XRN1* codifica a exorribonuclease 5'→3' atuante na degradação de mRNAs e a linhagem nocaute é incapaz de reprimir a tradução por depleção de glicose (HOLMES et al., 2004). Para estes experimentos foi escolhida a situação de estresse por depleção da glicose por ser mais amplamente utilizada na literatura. Como pode ser visto na Figura 12, tanto na condição de não repressão da tradução (+ glicose), quanto na repressão (- glicose), os mutantes *tif51A-1* e *xrn1Δ* apresentam maior acúmulo de polissomos, o que pode ser notado visualmente, ou pela razão das áreas dos polissomos e de 80S (poli/80S). Os painéis mostrados são gráficos representativos de experimentos realizados em triplicata de amostra.

Os dados relativos a *xrn1Δ* estão de acordo com a literatura e o maior acúmulo de polissomos pode ser explicado devido ao fato deste mutante ser quase totalmente resistente à repressão da tradução (HOLMES et al., 2004). Por outro lado, o aumento nos polissomos no mutante de eIF5A (*tif51A-1*) deve refletir uma menor velocidade de elongação da tradução, uma vez que resultados recentes mostram

que mutantes de eIF5A possuem uma redução no tempo de trânsito ribossomal (GREGIO et al., 2009; SAINI et al., 2009). Assim, nossos resultados sugerem que mutantes de elongação da tradução e mutantes de degradação de mRNA possuem fenótipos semelhantes de aumento de polissomos, tanto em condições de não repressão da tradução como em repressão da tradução. Curiosamente, outro fenótipo compartilhado por esses dois tipos de mutantes é justamente o fenótipo de acúmulo de mRNAs (PELTZ; DONAHUE; JACOBSON, 1992; PARKER; SHETH, 2007), o qual também já foi observado para mutantes de eIF5A (ZUK; JACOBSON, 1998; VALENTINI et al., 2002). No entanto, para o caso de mutantes de eIF5A, os dados de redução de síntese protéica celular e perda de *P bodies* (GREGIO et al., 2009) afastam eIF5A de uma função direta na degradação de mRNAs.

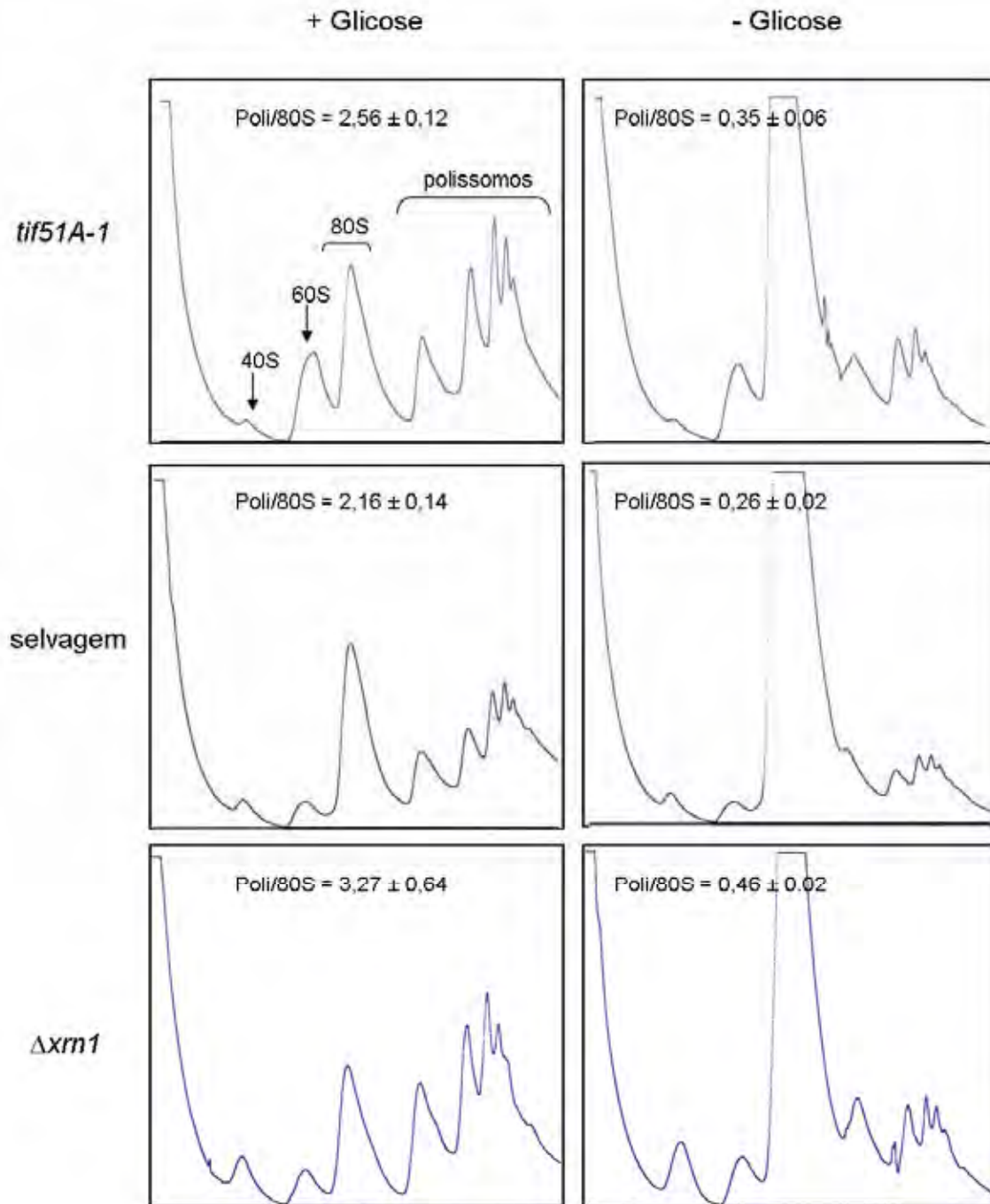


Figura 12. Resposta à repressão da tradução dos mutantes *tif51A-1* e *xrn1* Δ induzida por depleção de glicose. Extratos protéicos das linhagens selvagem e mutantes indicadas foram submetidos à ultracentrifugação em gradiente de sacarose, seguida de análise das frações por absorbância a 254 nm. A razão entre as áreas do polissomo e da fração 80S está indicada, juntamente com o desvio padrão da média.

5.3. Avaliação da interação genética entre mutantes de eIF5A e de fatores de repressão da tradução e/ou degradação de mRNA

A análise da interação genética sintética entre mutantes de eIF5A e de fatores de repressão da tradução e/ou degradação de mRNA visa contribuir para o estabelecimento das relações funcionais entre eIF5A e os processos de tradução, repressão e degradação de mRNA. Para isto, foram escolhidos sete genes de fatores que atuam em diferentes etapas da degradação de mRNA, como remoção do capacete de metilguanosina (*DCP1*, *PAT1*, *LSM1*, *DHH1* e *SBP1*), degradação 5'→3' (*XRN1*) e degradação 3'→5' (*SKI8*). As proteínas Lsm1, Pat1, Dhh1 e Sbp1 atuam como fatores de repressão da tradução (BONNEROT; BOECK; LAPEYRE, 2000; THARUN et al., 2000; COLLIER et al., 2001; THARUN; PARKER, 2001; SEGAL; DUNCKLEY; PARKER, 2006).

A primeira análise genética realizada foi entre *TIF51A* e *XRN1*, utilizando as linhagens SVL8 (selvagem), SVL10 (*tif51A-1*), SVL100 (*xrn1Δ*) e SVL101 (*xrn1Δ tif51A-1*). A linhagem *xrn1Δ* não apresenta fenótipo de sensibilidade a temperatura descrito na literatura, já o alelo *tif51A-1* é termossensível (*ts*). Assim, a avaliação fenotípica da linhagem *xrn1Δ tif51A-1* poderia revelar piora ou melhora no fenótipo de sensibilidade a temperatura do mutante de *TIF51A*. Na Figura 13, pode-se observar que o duplo mutante *xrn1Δ tif51A-1* (SVL101) apresentou uma diminuição no crescimento a 35°C quando comparado com a linhagem SVL10 (*tif51A-1*), sendo que o painel a 36°C apenas ilustra a termossensibilidade do mutante *tif51A-1*. No entanto, apesar de sutil, esta diferença no crescimento se manteve nas três repetições do ensaio realizadas, mostrando que ocorre uma interação entre os alelos *tif51A-1* e *xrn1Δ*, a qual acentua o defeito no fenótipo de sensibilidade a temperatura de *tif51A-1*. Portanto, conclui-se que existe interação genética do tipo sintético doente (*synthetic sick*) entre os mutantes *tif51A-1* e *xrn1Δ*, o que pode significar uma correlação funcional entre estes genes.

Em seguida, foi analisada a interação genética entre *TIF51A* e *LSM1*. Para isso, foram utilizadas as linhagens SVL17 (*tif51A-1*) e SVL595 (*lsm1Δ*), sendo que a linhagem *lsm1Δ* é *ts*. No painel A da Figura 14, verifica-se que os haplóides contendo *lsm1Δ* têm seu crescimento diminuído já a 25°C, tanto na ausência, quanto na presença de *tif51A-1*. Portanto, não há interação genética entre os mutantes *lsm1Δ* e *tif51A-1*.

Na análise genética de *DCP1* e *SKI8* foi utilizado o duplo mutante *dcp1-2 ski8Δ*, o qual apresenta fenótipo *ts*. Inicialmente, foi gerada uma linhagem com genótipo *tif51A-1 dcp1-2* (VZL996) a partir do cruzamento da VZL801 (*dcp1-2 ski8Δ*) e SVL323 (*tif51A-1*). Em seguida, essa linhagem foi cruzada com a linhagem parental VZL801 (*dcp1-2 ski8Δ*). No painel B da Figura 14, verifica-se que o haplóide contendo *dcp1-2 ski8Δ* apresenta crescimento diminuído a 36°C, fenótipo em acordo com a literatura (ANDERSON; PARKER, 1998). Entretanto, este fenótipo não foi alterado por *tif51A-1*, sugerindo que não ocorre interação genética entre o mutante *tif51A-1* e o duplo mutante *dcp1-2 ski8Δ*.

A análise da interação genética entre *SBP1* e *TIF51A* foi realizada pelo cruzamento da linhagem VZL784 (*sbp1Δ*) com a linhagem SVL513 (*tif51A-1 ssd1Δ*), uma vez que o fenótipo dos alelos de *TIF51A* são mais pronunciados na ausência de *SSD1* (ZANELLI; VALENTINI, 2005). No painel A da Figura 15, é possível observar que o haplóide *tif51A-1 sbp1Δ* apresenta melhora significativa no crescimento a 36°C, em comparação com o haplóide *tif51A-1* contendo *SBP1* selvagem, o que revelou uma interação genética sintética por supressão parcial do defeito de crescimento entre *TIF51A* e *SBP1*.

Para complementar, a análise da interação genética sintética utilizando o mutante *tif51A-3* de *eIF5A* também foi avaliada. Para isso, um cruzamento entre VZL784 (*sbp1Δ*) e SVL447 (*tif51A-3 ssd1Δ*) foi realizado. No painel B da Figura 15, podemos observar que o haplóide *tif51A-3 sbp1Δ* também demonstra melhora significativa no fenótipo *ts* a 36°C em comparação ao haplóide *tif51A-3 SBP1*. Este resultado reforça a interação genética sintética entre *TIF51A* e *SBP1*, e uma vez que esta interação foi observada para os alelos *tif51A-1* e *tif51A-3*, a interação sintética não é alelo específica. É possível que a ausência de *SBP1* deve induzir estados fisiológicos favoráveis ao crescimento de mutantes de *eIF5A*, talvez devido a uma desregulação e consequente diminuição de repressão da tradução que pode ser induzida por *Sbp1* (SEGAL; DUNCKLEY; PARKER, 2006), o que é discutido abaixo.

Para a análise genética entre *DHH1* e *TIF51A*, foi utilizada a linhagem VZL781 (*dhh1Δ*) para cruzamento com o mutante de *eIF5A*. No entanto, após a realização do cruzamento, houve baixa taxa de esporulação e, após dissecação de tétrades, foi baixo o número de haplóides viáveis. Problemas na esporulação são descritos para nocautes de *DHH1* (ENYENIHI; SAUNDERS, 2003). Então foi construído um cassete integrativo para deleção do gene *DHH1* na linhagem SVL513 (*tif51A-1*

ssd1Δ). Após integração e confirmação do nocaute, a linhagem resultante obtida foi transformada com plasmídeos contendo os genes de cada uma das mutações, *TIF51A*, *DHH1* ou *SSD1*. Na Figura 16 é possível observar que o triplo mutante (*tif51A-1 dhh1Δ ssd1Δ*) contendo *DHH1* plasmidial apresenta termossensibilidade a 36°C, enquanto que com o vetor vazio foi observada uma termossensibilidade a 37°C. Portanto, houve uma melhora no fenótipo de termossensibilidade da linhagem *tif51A-1 dhh1Δ ssd1Δ* em relação ao mutante *tif51A-1 ssd1Δ*, indicando uma interação genética sintética por supressão parcial do defeito de crescimento entre *TIF51A* e *DHH1*.

Finalmente, a análise da interação genética entre *PAT1* e *TIF51A* foi realizada com as linhagens SVL596 (*pat1Δ*) e SVL445 (*tif51A-3 ssd1Δ*). Na Figura 17, podemos verificar que o duplo mutante *tif51A-3 pat1Δ* também apresenta melhora do crescimento a 35°C em relação ao haplóide *tif51A-3 PAT1* (termossensível a 35°C), indicando uma interação genética sintética por supressão parcial do defeito de crescimento entre *TIF51A* e *PAT1*.

Dessa forma nos ensaios de interações genética sintética realizados não foram observadas interações sintéticas entre mutantes de *TIF51A* e dos genes *LSM1*, *DCP1* e *SKI8*, que atuam diretamente na degradação de mRNA. Curiosamente, a interação genética entre os mutantes *tif51A-1* e *xrn1Δ* o fator que atua também de forma diretamente na degradação de mRNA revelou uma piora no crescimento (sintético doente). Por outro lado, as interações entre *tif51A-1* e *sbp1Δ*, *tif51A-3* e *sbp1Δ*, *tif51A-3* e *dhh1Δ* e *tif51A-3* e *pat1Δ* revelaram uma melhora no defeito do crescimento dos mutantes de eIF5A, sugerindo interação genética por supressão extragênica. Os resultados obtidos neste ensaios de interações genéticas estão resumidos na Tabela 4.

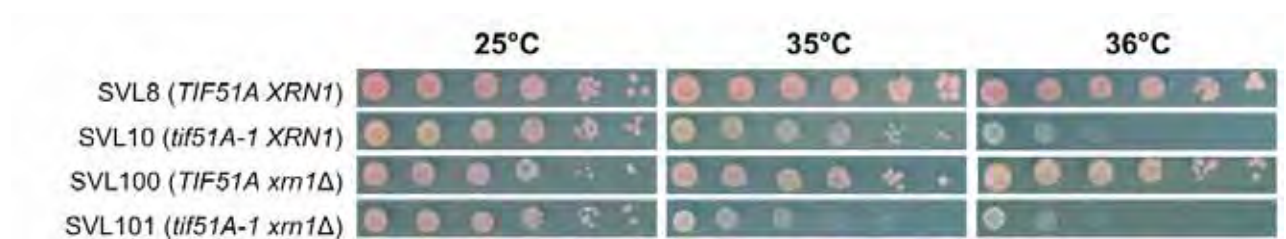


Figura 13. Os mutantes *tif51A-1* e *xrn1Δ* são sintético doentes. Diluições seriadas (10x) das linhagens selvagem (SVL8), *tif51A-1* (SVL10), *xrn1::URA3* (SVL100) e *xrn1::URA3 tif51A-1* (SVL101) foram aplicadas em meio YPD e incubadas a 25°C, 35°C e 36°C por 2 dias.

A



B

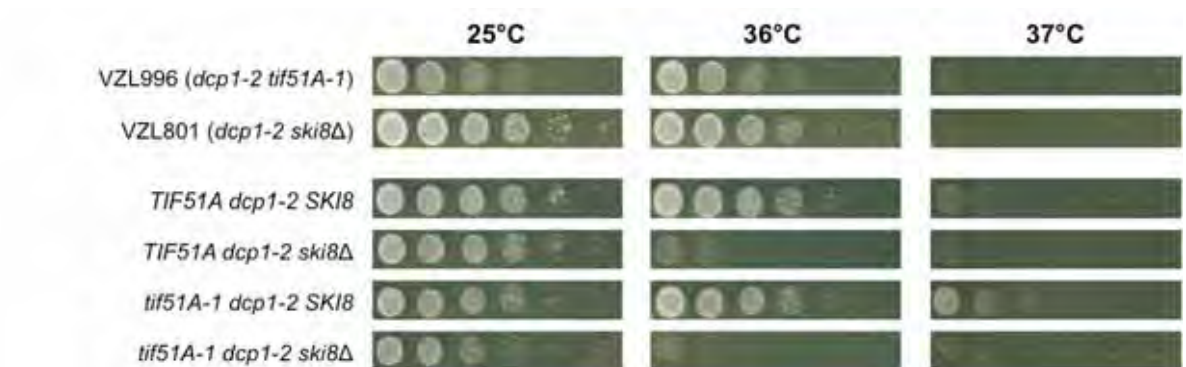
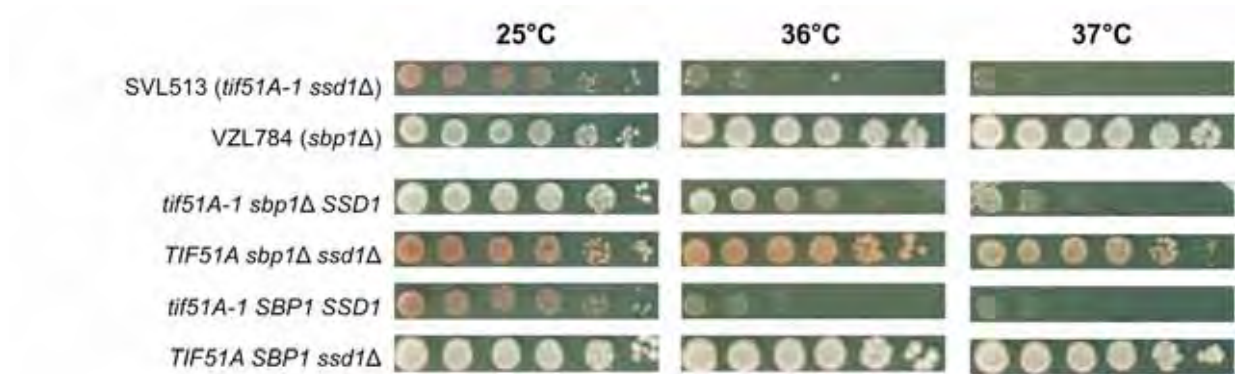


Figura 14. Os mutantes duplo *tif51A-1 lsm1Δ* e triplo *tif51A-1 dcp1-2 ski8Δ* não apresentam interação genética sintética. **Painel A:** Diluições seriadas (10x) de 4 haplóides de uma tétrade do cruzamento *lsm1Δ* x *tif51A-1* foram aplicadas em meio SC-leu e incubadas a 25°C, 30°C e 38°C por 2 dias. **Painel B:** Diluições seriadas (10x) das linhagens *dcp1-2 tif51A-1* (VZL996), *dcp1-2 ski8Δ* (VZL801) e dos haplóides de uma mesma tétrade do cruzamento *dcp1-2 tif51A-1* x *dcp1-2 ski8Δ* foram aplicados em YPD e incubadas a 25°C, 36°C e 37°C por 3 dias.

A



B

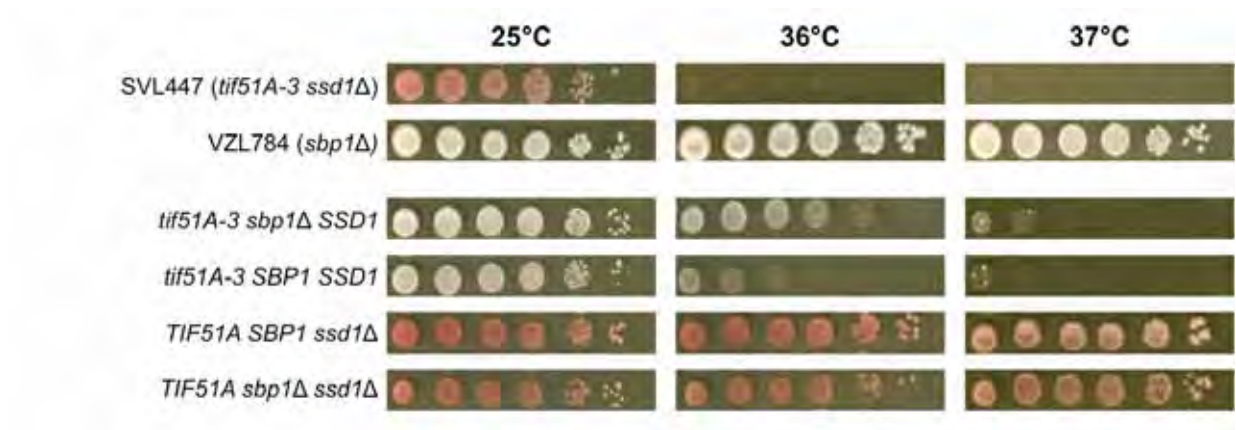


Figura 15. Os mutantes duplos *tif51A-1* ou *tif51A-3* e *sbp1Δ* apresentam interações genéticas sintéticas por supressão parcial do defeito de crescimento. Painel A: Diluições seriadas (10x) das linhagens *tif51A-1 ssd1Δ* (SVL513), *sbp1Δ* (VZL784) e haplóides de uma mesma tétrade do cruzamento entre SVL513 e VZL784. **Painel B:** Diluições seriadas (10x) das linhagens *tif51A-3 ssd1Δ* (SVL447), *sbp1Δ* (VZL784) e haplóides de uma mesma tétrade do cruzamento entre SVL447 e VZL784. Em ambos experimentos, culturas líquidas das linhagens foram aplicadas em meio YPD e incubadas a 25°C, 36°C e 37°C por 3 dias.

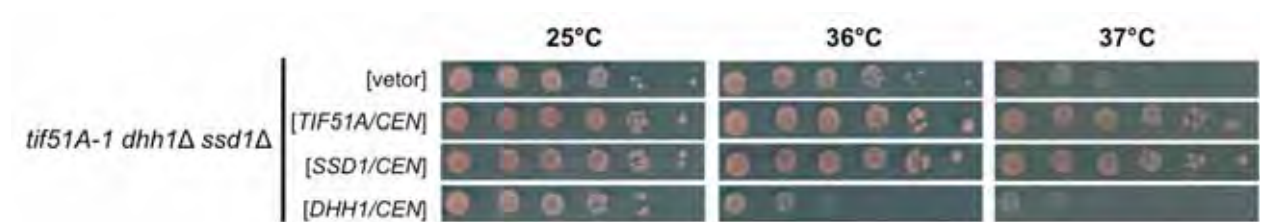


Figura 16. O mutante duplo *tif51A-1 dhh1Δ* apresenta interação genética sintética por supressão parcial do defeito de crescimento. Diluições seriadas (10x) da linhagem duplo mutante *tif51A-1 dhh1Δ* resultante da deleção de *DHH1* na linhagem SVL513 (*DHH1 tif51A-1*) com os genes selvagens para cada mutação complementados por plasmídeos. As culturas foram aplicadas em meio SC-ura e incubadas a 25°C, 36°C e 37°C por 3 dias.

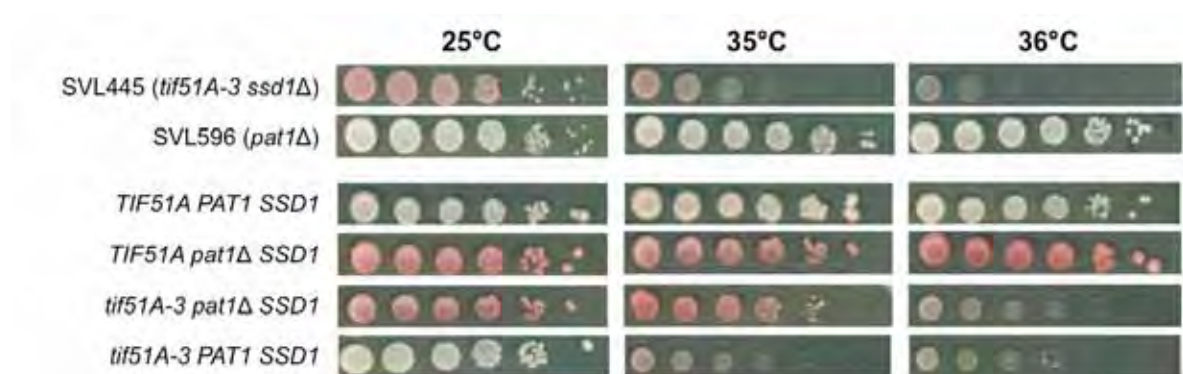


Figura 17. O mutante duplo *tif51A-3* e *pat1Δ* apresenta interação genética sintética por supressão parcial do defeito de crescimento. Diluições seriadas (10x) de 4 haplóides de uma mesma tétrade foram aplicadas em meio YPD e incubadas 25°C, 35°C e 36°C por 3 dias. As linhagens parentais, *tif51A-3* (SVL445) e *pat1Δ* (SVL596), foram usadas como controle de crescimento nas temperaturas testadas.

Tabela 4. Resultados da interações genéticas sintéticas.

Tipo de interação genética	Mutantes utilizados	Funções das proteínas envolvidas*
Sem interação	<i>lsm1Δ</i> e <i>tif51A-1</i>	degradação de mRNA e remoção do capacete
Sem interação	<i>dcp1-2 ski8Δ</i> e <i>tif51A-1</i>	degradação de mRNA e remoção do capacete
Sintético doente	<i>xrn1Δ</i> e <i>tif51A-1</i>	degradação de mRNA
Supressão extragênica	<i>sbp1Δ</i> e <i>tif51A-1</i>	degradação de mRNA e repressão da tradução
Supressão extragênica	<i>sbp1Δ</i> e <i>tif51A-3</i>	degradação de mRNA e repressão da tradução
Supressão extragênica	<i>dhh1Δ</i> e <i>tif51A-1</i>	degradação de mRNA e repressão da tradução
Supressão extragênica	<i>pat1Δ</i> e <i>tif51A-3</i>	degradação de mRNA e repressão da tradução

*Exceto para eIF5A.

5.4. Avaliação da relação entre os grânulos de estresse, eIF5A e Sbp1

Como apresentado anteriormente, os grânulos de estresse são formados por fatores presentes no complexo de pré-iniciação 48S, o qual inclui mRNA ligado a Pab1, fatores de início de tradução e a subunidade ribossomal 40S, sendo os grânulos de estresse intimamente relacionados aos *P bodies* (KEDERSHA; ANDERSON, 2009). Em *S. cerevisiae*, os grânulos de estresse induzidos por choque térmico a 46°C também contêm as subunidades de eIF3 (eIF3a, eIF3b e eIF3c), além de outras proteínas como Dcp2 e Ngr1 (GROUSL et al., 2009), e outros fatores de elongação como eEF3 e eEF1B(γ) (HAŠEK, J.)².

Recentemente, foi mostrado que é necessária a presença de eIF5A hipusinado para haver a formação dos grânulos de estresse induzidos por arsenito em células de mamíferos (LI et al., 2010). Neste estudo foi mostrado que a enzima ODC (ornitina descarboxilase), a qual está envolvida na via de síntese das poliaminas, é necessária para a formação dos grânulos de estresse induzidos por arsenito. Ainda, foi mostrado que eIF5A localiza-se nos grânulos de estresse nas células de mamíferos testadas, sob diferentes condições de estresse (LI et al., 2010). Estas evidências tornam interessante investigar a influência de eIF5A na formação destes corpúsculos em levedura, e para isso, foram utilizados alguns dos mutantes condicionais de eIF5A.

Para a análise da formação de grânulos de estresse, foi estabelecida uma colaboração com o Dr. Jiří Hašek do *Laboratory of Cell Reproduction*, da *Academy of Sciences of the Czech Republic*. Os resultados descritos a seguir foram obtidos durante o estágio de doutorado sanduíche no período de julho a dezembro de 2010.

Nesta análise da formação de grânulos de estresse, utilizamos a subunidade eIF3a, codificada pelo gene *RPG1*, em fusão com GFP, como marcador destes corpúsculos. Para induzir a agregação dos grânulos de estresse, as células foram submetidas a um forte choque térmico a 46°C por 10 min, chamado de *Robust Heat Shock* (GROUSL et al., 2009). Linhagens mutantes de eIF5A contendo a fusão *RPG1-GFP* foram geradas por cruzamento, e as linhagens resultantes foram avaliadas para a formação destes corpúsculos.

² HAŠEK, J. (*Institute of Microbiology - Academy of Sciences of the Czech Republic*) Comunicação pessoal, 2010.

Uma linhagem nocauteada para *TIF51A* contendo diferentes plasmídeos expressando eIF5A selvagem ou mutadas foram utilizadas, com isso foi possível obter todas as linhagens utilizadas com o mesmo *background* genético. Cruzamentos foram realizados entre a linhagem com expressão cromossomal de *RPG1-GFP* (VZL1110) e os mutantes *tif51A*^{Q22H/L93F} (SVL599), *tif51A*^{K56A} (SVL634) e a linhagem selvagem (SVL132). Estes mutantes de eIF5A (*tif51A*^{Q22H/L93F} e *tif51A*^{K56A}) não apresentam depleção da proteína na temperatura não permissiva (DIAS et al., 2008). A mutação *tif51A*^{K56A} está no último resíduo da alça de hipusinação, e para o mutante *tif51A*^{Q22H/L93F} as mutações são em regiões expostas dos domínios N e C-terminal de eIF5A, respectivamente (DIAS et al., 2008). Por serem mutantes estáveis na condição restritiva, estes podem apresentar fenótipos específicos diferentes daqueles mostrados por um mutante que tenha perda total de função, como *tif51A-3* (VALENTINI et al., 2002), o que contribuiria com o estudo do papel desta proteína.

Como podemos verificar na Figura 18, as linhagens resultantes dos cruzamentos contendo *RPG1-GFP* e um dos alelos do gene de eIF5A, *TIF51A* (VZL1112), *tif51A*^{Q22H/L93F} (VZL1113) e *tif51A*^{K56A} (VZL1114) foram avaliadas para a formação de grânulos de estresse após choque térmico a 46°C por 10 min. A linhagem selvagem apresenta um padrão normal de agregação, comparável ao apresentado na literatura (GROUSL et al., 2009), enquanto que as linhagens mutantes de eIF5A apresentam uma formação reduzida de grânulos de estresse. Nas linhagens mutantes, a agregação de eIF3a é menos intensa, o que gera grânulos menores e mais dispersos pelo citoplasma. Verificamos ainda, que houve uma diferença no padrão de agregação entre as duas linhagens mutantes utilizadas, sendo que a redução do mutante *tif51A*^{Q22H/L93F} foi mais intensa do que para o mutante *tif51A*^{K56A}.

A fim de ampliar os estudos de formação de grânulos de estresse, foi realizado outro cruzamento com a linhagem expressando *RPG1-GFP* (VZL1110) e o mutante *tif51A-3* (*tif51A*^{C39Y/G118D}, SVL529) (VALENTINI et al., 2002), o que gerou a linhagem contendo *tif51A-3* e eIF3a-GFP (VZL1115). Estas linhagens mutantes de eIF5A *tif51A-3* (VZL1115), *tif51A*^{Q22H/L93F} (VZL1113) e a linhagem selvagem (VZL1112), todas expressando eIF3a fusionada a GFP, foram submetidas à integração cromossomal de outro marcador de grânulos de estresse. Para este outro experimento, foi introduzido o fator de alongação eEF3 fusionado à proteína

mCherry, através de um cassete integrativo com a marca de seleção de nourseotricina (FARKASOVSKY, M.; TSEIN, R.)³. Este outro fator de alongação foi identificado nos grânulos de estresse induzidos por choque térmico (HAŠEK, J.)⁴.

As linhagens selvagem (VZL1124), mutante *tif51A-3* (VZL1125) e mutante *tif51A*^{Q22H/L93F} (VZL1126) foram avaliadas para a agregação dos grânulos de estresse, induzidos por choque térmico, através de ensaios de co-localização de GFP e mCherry. Como pode ser visto na Figura 19, ambos os marcadores estão presentes nos grânulos das células selvagens, entretanto, observamos que o mutante *tif51A*^{Q22H/L93F} apresenta reduzida formação de grânulos, e o mutante *tif51A-3* forma os grânulos de estresse em tamanho e número extremamente reduzidos em relação à selvagem. Esta formação dos grânulos é menos intensa e isso foi verificado pela diminuição de pontos amarelos, indicados pelas setas azuis, gerados pela co-localização entre eIF3a-GFP e eEF3-mCherry. Este defeito de agregação também não está comparável ao observado para células tratadas com ciclo-heximida, onde não há agregação dos grânulos (GROUSL et al., 2009), o que indica que não está correlacionado apenas à função de eIF5A na alongação da tradução.

Ao compararmos o resultado obtido para o mutante *tif51A-3* com o mutante *tif51A*^{Q22H/L93F}, apresentado nas Figuras 18 e 19, e com o mutante *tif51A*^{K56A}, apresentado na Figura 18, observa-se que o mutante *tif51A-3* apresenta maior defeito na formação de grânulos de estresse, o qual poderia estar correlacionado à mutação em eIF5A que é diferente para cada um dos mutantes testados. Possivelmente, as mutações C39Y/G118D da linhagem *tif51A-3* (Valentini, Casolari et al., 2002) altera a estrutura de eIF5A de maneira a interferir mais em alguma outra função de eIF5A, do que as mutações Q22H/L93F ou K56A (DIAS et al., 2008) dos outros mutantes testados. Considerando que eIF5A funcional e hipusina é necessária para a formação de tais grânulos em mamíferos (LI et al., 2010), e que diferentes mutantes de eIF5A em *S. cerevisiae* apresentam defeito na formação de grânulos de estresse, podemos concluir que estes dados reforçam o envolvimento de eIF5A com o controle da repressão da tradução induzido por estresse.

Como a ciclo-heximida inibe a alongação da tradução por ligar-se à subunidade 60S do ribossomo (ALAMGIR et al., 2010; SCHNEIDER-POETSCH et al.,

³ FARKASOVSKY, M.; TSEIN, R. (*Institute of Molecular Biology - Slovak Academy of Sciences*) Comunicação pessoal, 2010.

⁴ HAŠEK, J. (*Institute of Microbiology - Academy of Sciences of the Czech Republic*) Comunicação pessoal, 2010.

2010), células tratadas com ciclo-heximida apresentam estabilização de polissomos. Portanto, se a inibição da formação de grânulos de estresse nos mutantes de eIF5A fosse um efeito análogo ao da ciclo-heximida, ao analisar o perfil polissomal iríamos observar presença de polissomos. Em Grousl e cols. (2009) também foi descrito que, após um forte choque térmico, células selvagens apresentam perfil polissomal com aumento de 80S e *run-off* de polissomos, além da formação dos grânulos de estresse. Com o intuito de confirmar se a diminuição na formação dos grânulos de estresse nestes mutantes se deve diretamente à perda de alguma função específica de eIF5A, e não indiretamente devido ao fato dos mRNAs estarem fortemente ligados aos polissomos, pelo efeito de eIF5A na elongação da tradução, foram realizados ensaios de perfil polissomal após forte choque térmico. Os perfis polissomais das linhagens selvagem (*TIF51A*) e mutantes de eIF5A (*tif51A*^{Q22H/L93F}, *tif51A*^{K56A} e *tif51A-3*) foram realizados em condições normais (25°C) e após forte choque térmico (46°C por 10 min) e estão mostrados na Figura 20. É possível observar que todas as linhagens testadas apresentam aumento da fração 80S e *run-off* de polissomos após estresse. Esta observação está de acordo com a hipótese de que a diminuição na formação dos grânulos de estresse é devida a uma função direta de eIF5A na agregação dos grânulos de estresse. Portanto, a diminuição na formação de grânulos de estresse nos mutantes de eIF5A não é comparável ao fenótipo observado para células tratadas com ciclo-heximida.

Como apresentado anteriormente, apesar de eIF5A já ter sido envolvido com o processo de degradação de mRNA (ZUK; JACOBSON, 1998; VALENTINI et al., 2002), esta parece ser uma função secundária de eIF5A, sendo sua principal função na elongação da tradução (GREGIO et al., 2009; SAINI et al., 2009). Ainda, foi mostrado acima (Figura 8) que eIF5A não se localiza nos *P bodies*. Entretanto, ficou claro pelos dados apresentados nas Figuras 18 e 19 que eIF5A também pode estar envolvida com a formação de grânulos de estresse. Assim, torna-se interessante verificar se eIF5A está presente nesses grânulos.

Com o intuito de verificar se eIF5A está presente nos grânulos de estresse em levedura, os seguintes experimentos foram realizados. Ensaios de co-localização de proteínas marcadores de grânulos de estresse, bem como eIF5A, foram utilizadas na forma de proteínas de fusão com GFP ou mCherry. As proteínas utilizadas Dcp2, Ngr1 e eEF3 estão presentes em grânulos de estresse após choque

térmico (GROUSL et al., 2009; HAŠEK, J.⁵). A linhagem selvagem BY4742 (EuroSCARF) foi transformada com diferentes cassetes integrativos contendo as fusões *DCP2-mCHERRY*, *NGR1-mCHERRY* ou *YEF3-mCHERRY*, e as três linhagens resultantes foram transformadas com um plasmídeo que expressa GFP-eIF5A funcional sob regulação do promotor de galactose (pSV137) (VALENTINI et al., 2002). Então, as linhagens obtidas VZL1117 (GFP-eIF5A e Dcp2-mCherry), VZL1118 (GFP-eIF5A e Ngr1-mCherry) e VZL1119 (GFP-eIF5A e eEF3-mCherry) foram utilizadas nos experimentos de co-localização celular.

Na Figura 21, pode ser verificado que a proteína Dcp2 apresenta agregação na condição normal, em corpúsculos que seriam os *P bodies*, mas deve ser lembrado que Dcp2 também está presente nos grânulos de estresse. Após choque térmico, obtivemos a formação dos grânulos de estresse contendo Dcp2, os quais se co-localizam com eIF5A, como pode ser observado pelos pontos em amarelo, que representam a sobreposição das duas proteínas em questão, e estão indicados pelas setas azuis. Na Figura 22, verifica-se a agregação em menor quantidade dos grânulos de estresse contendo Ngr1, uma vez que esta proteína é mais expressa quando as células estão em condições de crescimento estacionário. Entretanto, ainda é possível verificar a co-localização de Ngr1 com eIF5A, como indicado pelas setas azuis. Por fim, na Figura 23, está apresentada a co-localização de eEF3 e eIF5A nos grânulos de estresse após choque térmico. Apesar de algumas células apresentarem uma expressão desigual ou irregular da fusão GFP-eIF5A, verifica-se que eIF5A está nos grânulos de estresse induzidos por choque térmico em levedura (setas azuis indicando pontos amarelos). Como eIF5A, outros fatores de alongação da tradução foram observados nos grânulos de estresse nesta condição, entre eles eEF3 e eEF1B(γ) (HAŠEK, J.)⁵.

Diversas proteínas envolvidas com repressão da tradução e/ou degradação de mRNA já foram identificadas nos grânulos de estresse, entre elas Xrn1 (KEDERSHA et al., 2005), Dhh1 (SWISHER; PARKER, 2010) e Sus1 (CUENCA-BONO et al., 2010). Destas, Xrn1 e Dhh1 também estão presentes nos *P bodies* (SHETH; PARKER, 2003; TEIXEIRA; PARKER, 2007). Uma vez que a proteína Sbp1 também está presente nos *P bodies* (SEGAL; DUNCKLEY; PARKER, 2006), torna-se interessante verificar se Sbp1 está presente nos grânulos de estresse.

⁵ HAŠEK, J. (Institute of Microbiology - Academy of Sciences of the Czech Republic) Comunicação pessoal, 2010.

Para isto, foram realizados experimentos de co-localização das proteínas Sbp1 e eIF3a após choque térmico utilizando proteínas de fusão com GFP ou mRFP. Um cruzamento entre a linhagem que possui *SBP1-GFP* (VZL1109) e a linhagem com *RPG1-mRFP* (VZL1111) foi realizado, e a linhagem resultante expressando ambas proteínas de fusão foi utilizada nestes experimentos de co-localização celular. As células foram submetidas a um forte choque térmico (46°C por 10 min). Na Figura 24, é possível observar que Sbp1 fusionada a GFP co-localiza com Rpg1-mRFP presente nos grânulos de estresse induzidos pelo choque térmico a 46°C (setas azuis indicando pontos amarelos). Portanto, estes resultados evidenciam pela primeira vez que Sbp1 é mais um fator envolvido com degradação de mRNA que está presente nos grânulos de estresse induzidos pelo choque térmico.

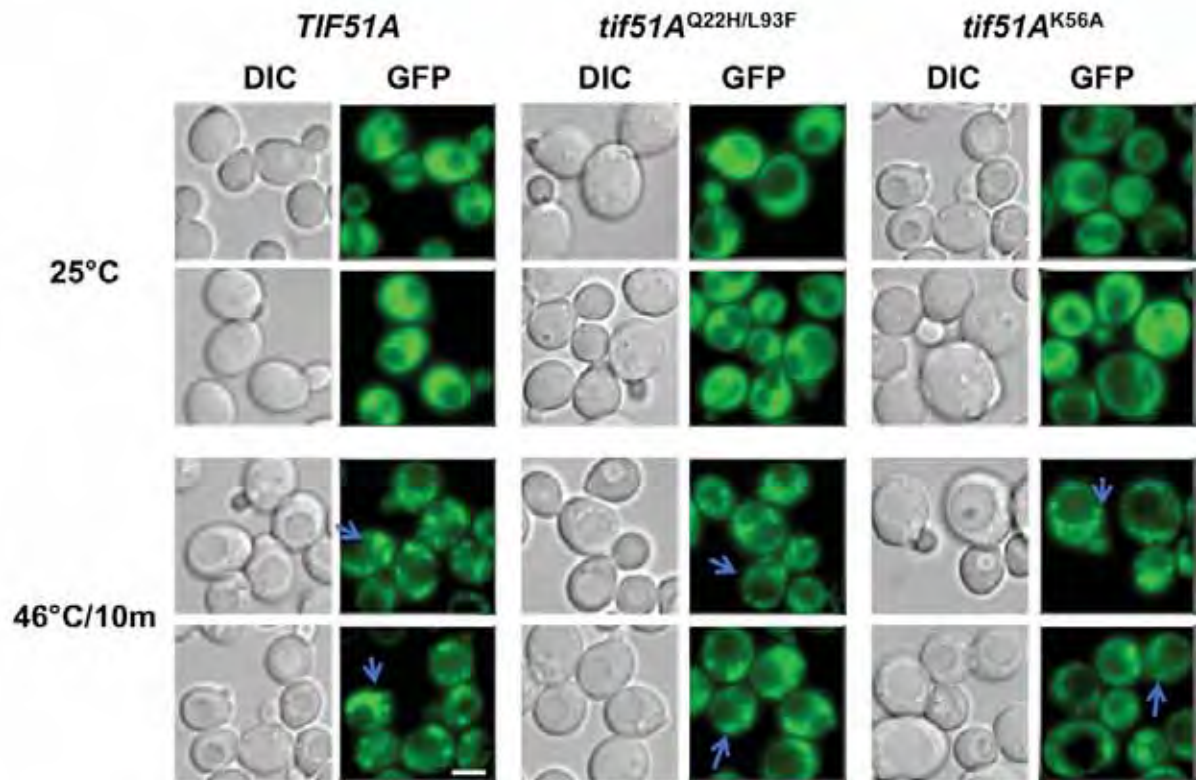


Figura 18. Os mutantes estáveis de eIF5A possuem defeito na formação de grânulos de estresse induzidos por choque térmico. As linhagens selvagem (VZL1112), *tif51A*^{Q22H/L93F} (VZL1113) e *tif51A*^{K56A} (VZL1114) expressando eIF3a-GFP foram cultivadas a 30°C em meio YPD. As células foram coletadas e transferidas para meio pré-aquecido a 46°C, e mantidas nesta temperatura por 10 min para induzir a formação dos grânulos de estresse e lavadas com meio SC antes da observação. As setas azuis apontam os grânulos de estresse. As células foram visualizadas por microscopia de fluorescência e objetiva de 100x, e as imagens foram captadas e processadas pelo software *Olympus Cell R*. Escala = 5 µm.

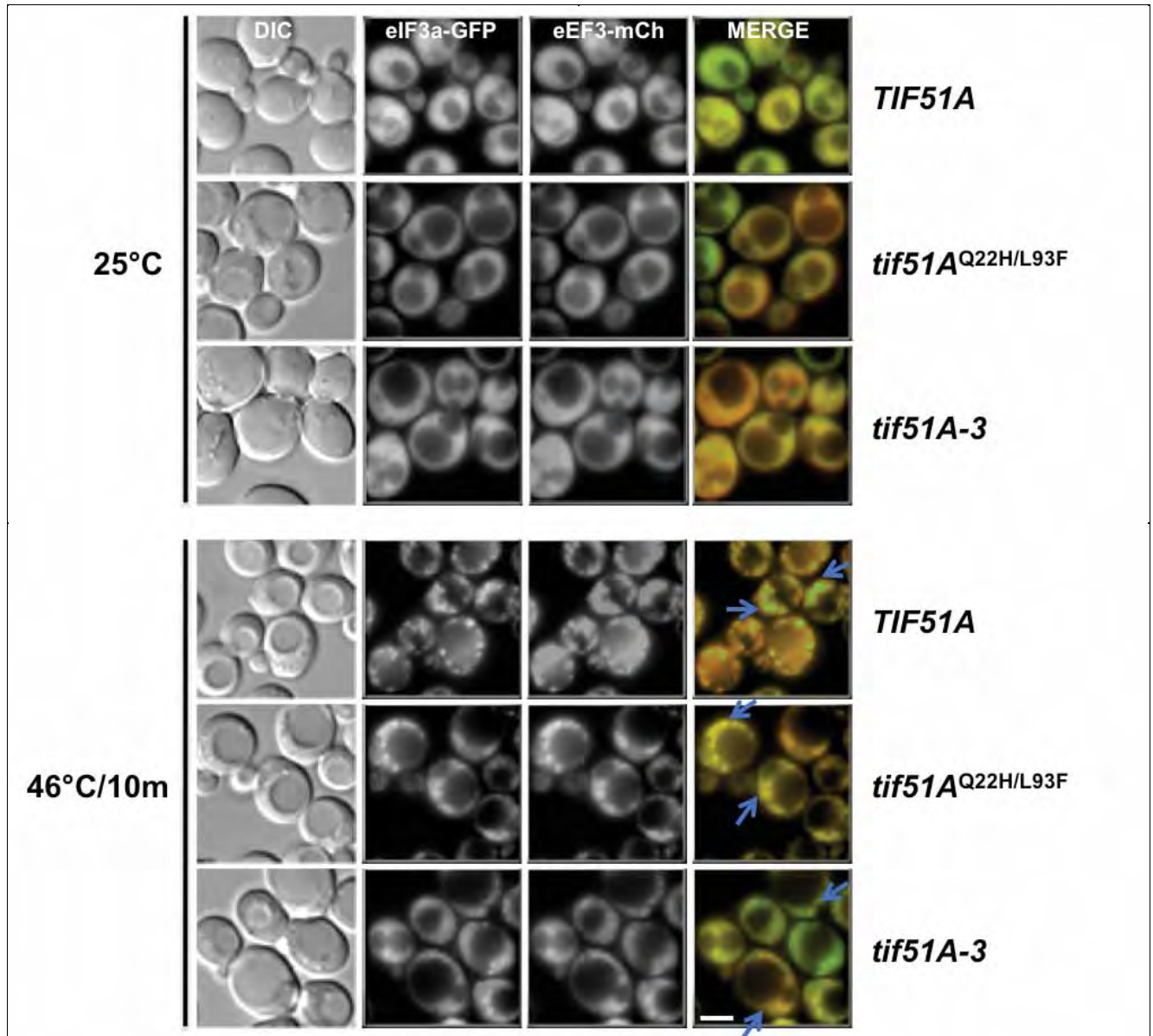


Figura 19. Os mutantes *tif51A-3* e *tif51A^{Q22H/L93F}* apresentam defeito na formação de grânulos de estresse induzidos por choque térmico. As linhagens selvagem (VZL1124), *tif51A-3* (VZL1125) e *tif51A^{Q22H/L93F}* (VZL1126) expressando eIF3a-GFP e eEF3-mCherry foram cultivadas a 25°C em meio YPD. As células foram coletadas e transferidas para meio pré-aquecido a 46°C, e mantidas nesta temperatura por 10 min para induzir a formação dos grânulos de estresse e lavadas com meio SC antes da observação. As setas azuis apontam os grânulos de estresse. As células foram visualizadas por microscopia de fluorescência e objetiva de 100x, e as imagens foram captadas e processadas pelo software *Olympus Cell R*. Escala = 5 µm.

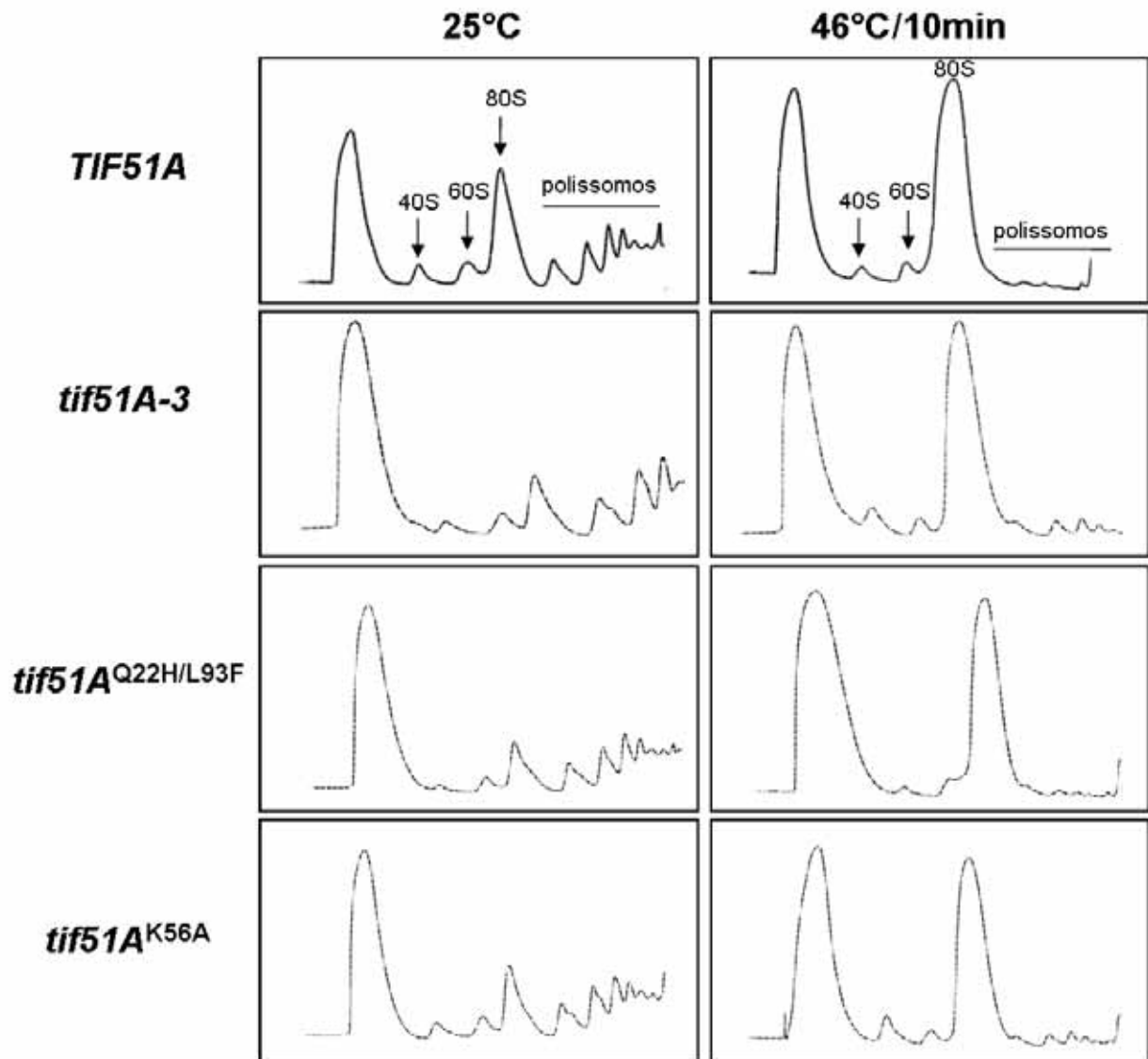


Figura 20. Os mutantes de eIF5A apresentam parada no início da tradução após choque térmico. Extratos protéicos das linhagens selvagem (VZL1112), *tif51A*^{Q22H/L93F} (VZL1113), *tif51A*^{K56A} (VZL1114) e *tif51A-3* (VZL1115) em condições normais (25°C) e após choque térmico (46°C por 10 min) foram submetidos a ultracentrifugação em gradiente de sacarose 5-45%, seguida de análise das frações por absorvância a 254 nm.

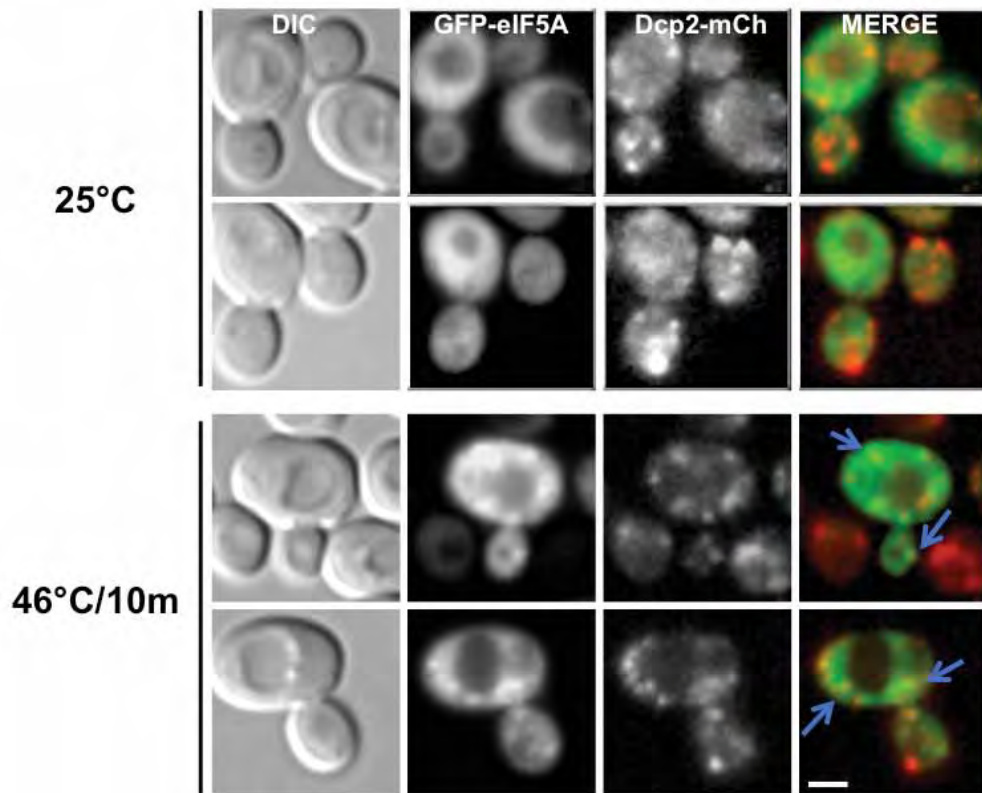


Figura 21. Co-localização de eIF5A com a proteína Dcp2 nos grânulos de estresse. A linhagem expressando GFP-eIF5A com Dcp2-mCherry (VZL1117) foi cultivada a 25°C em SC-ura com rafinose até $D.O_{600nm} = 0,4$, e a expressão do gene codificador de GFP-eIF5A, contendo promotor de galactose, foi induzida por 2 h em galactose 2%. Para induzir a formação dos grânulos de estresse, as células foram coletadas e transferidas para meio pré-aquecido a 46°C, mantidas nesta temperatura por 10 min e lavadas com meio SC antes da observação. As setas azuis apontam os grânulos de estresse. As células foram visualizadas por microscopia de fluorescência e objetiva de 100x, e as imagens foram captadas e processadas pelo software *Olympus Cell R*. Escala = 2,5 μm .

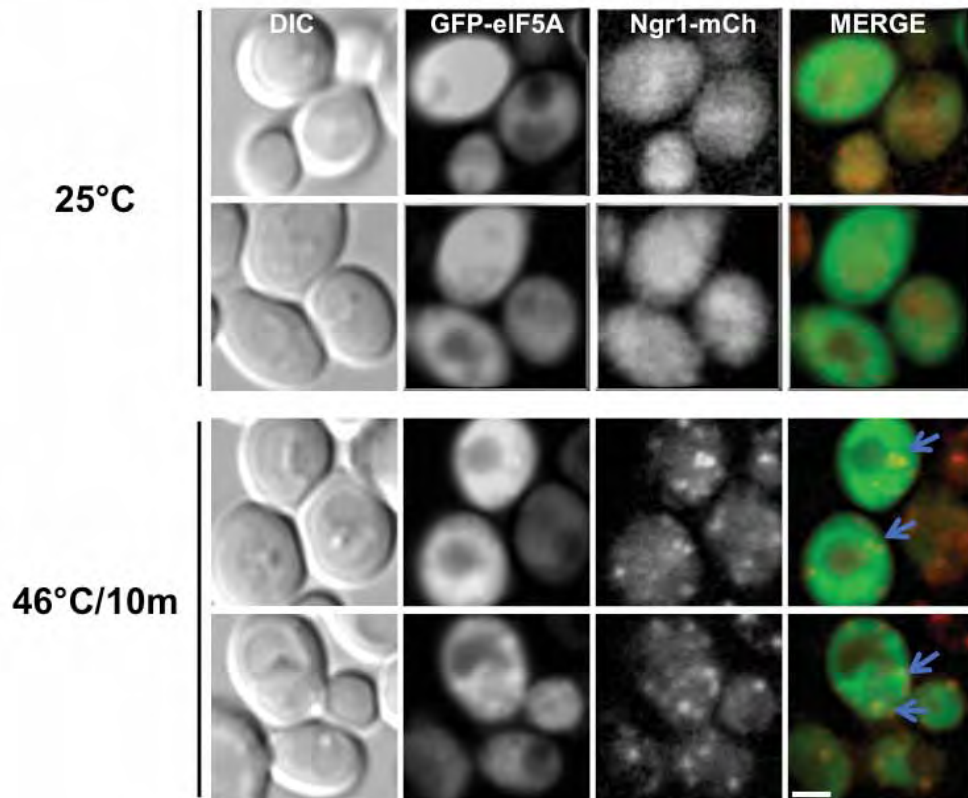


Figura 22. Co-localização de eIF5A com a proteína Ngr1 nos grânulos de estresse. A linhagem expressando GFP-eIF5A com Ngr1-mCherry (VZL1118) foi cultivada a 25°C em SC-ura com rafinose até $D.O_{600nm} = 0,4$, e a expressão do gene codificador de GFP-eIF5A, contendo promotor de galactose, foi induzida por 2 h em galactose 2%. Para induzir a formação dos grânulos de estresse, as células foram coletadas e transferidas para meio pré-aquecido a 46°C, mantidas nesta temperatura por 10 min e lavadas com meio SC antes da observação. As setas azuis apontam os grânulos de estresse. As células foram visualizadas por microscopia de fluorescência e objetiva de 100x, e as imagens foram captadas e processadas pelo software *Olympus Cell R*. Escala = 2,5 μm .

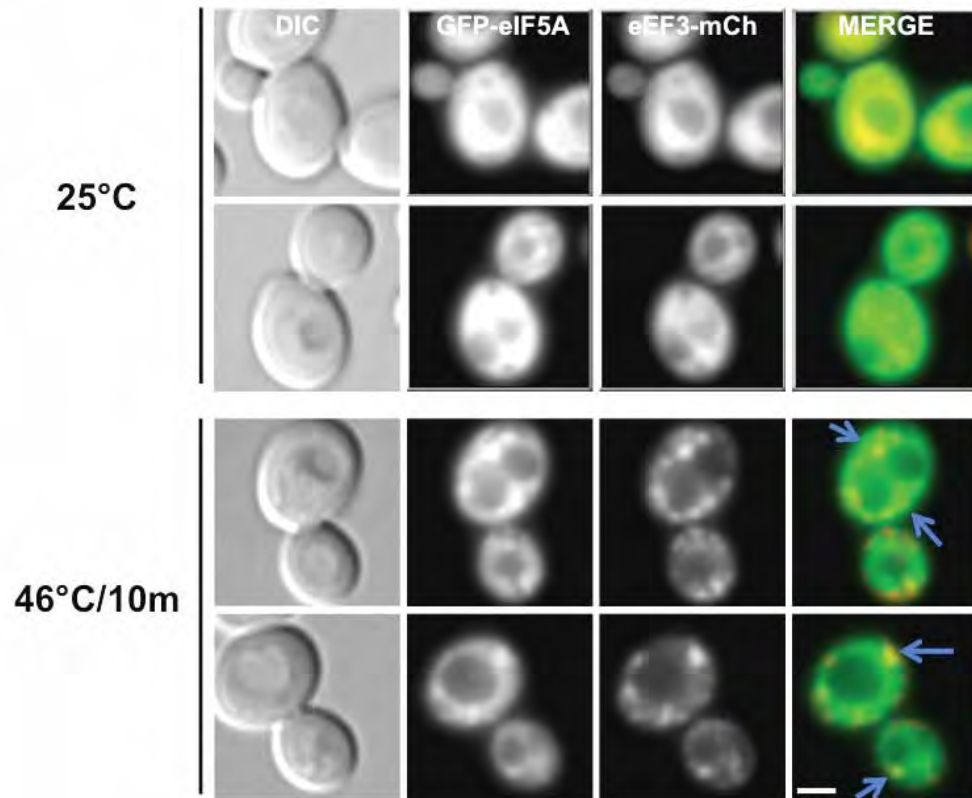


Figura 23. Co-localização de eIF5A com a proteína eEF3 nos grânulos de estresse. A linhagem expressando GFP-eIF5A com eEF3-mCherry (VZL1119) foi cultivada a 25°C em SC-ura com rafinose até $D.O_{600nm} = 0,4$, e a expressão do gene codificador de GFP-eIF5A, contendo promotor de galactose, foi induzida por 2 h em galactose 2%. Para induzir a formação dos grânulos de estresse, as células foram coletadas e transferidas para meio pré-aquecido a 46°C, mantidas nesta temperatura por 10 min e lavadas com meio SC antes da observação. As setas azuis apontam os grânulos de estresse. As células foram visualizadas por microscopia de fluorescência e objetiva de 100x, e as imagens foram captadas e processadas pelo software *Olympus Cell R*. Escala = 2,5 μm .

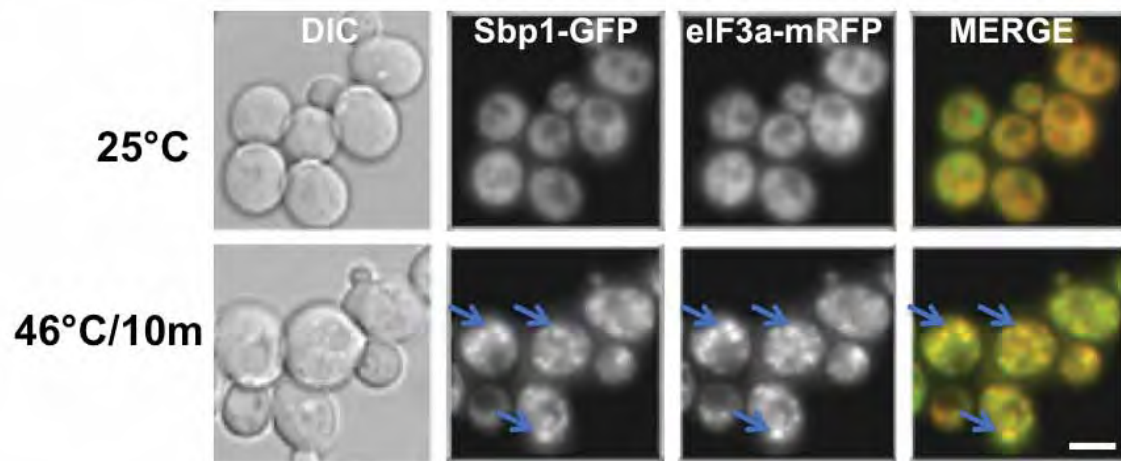


Figura 24. Presença de Sbp1 nos grânulos de estresse induzidos por choque térmico.

A linhagem contendo *SBP1-GFP* e *RPG1-mRFP* (VZL1116) foi cultivada a 30°C em meio YPD. As células foram coletadas, transferidas para meio pré-aquecido a 46°C, mantidas nesta temperatura por 10 min e lavadas com meio SC antes da observação. As setas azuis apontam os grânulos de estresse. As células foram visualizadas por microscopia de fluorescência e objetiva de 100x e as imagens foram captadas e processadas pelo software *Olympus Cell R*. Escala = 5 µm.

6. DISCUSSÃO

Em 2007, quando este trabalho foi iniciado, ainda não estava descrito na literatura o envolvimento do fator eIF5A com a elongação da tradução (GREGIO et al., 2009; SAINI et al., 2009). Como apresentado anteriormente, as evidências iniciais mostraram uma função para eIF5A na etapa de início da tradução de proteínas (BENNE; HERSHEY, 1978) e em decorrência disso foi denominada como fator de início da tradução 5A (eIF5A - *Eukaryotic translation Initiation Factor 5A*). Entretanto, em um estudo posterior, foi verificado que a depleção de eIF5A em *S. cerevisiae* causa apenas uma pequena redução nos níveis de síntese protéica total e foi sugerido que eIF5A atue na tradução específica de mensageiros envolvidos na transição G1/S do ciclo celular, uma vez que a depleção de eIF5A leva a um aumento do número de células paradas em G1 (KANG; HERSHEY, 1994).

Dessa forma, eIF5A continuou sendo alvo de diversos estudos que tentaram atribuir funções diretas ou não para este fator, o qual acabou sendo envolvido com outros processos celulares, além da tradução. Entre as associações descritas para eIF5A destacam-se: 1) proliferação celular e controle do ciclo celular em *Drosophila* (LEE et al., 2001), 2) cofator celular da proteína Rev do vírus HIV-1 e exportação de mensageiros tardios deste vírus (RUHL et al., 1993; BEVEC et al., 1996; BEVEC; HAUBER, 1997; ELFGANG et al., 1999; ROSORIUS et al., 1999), 3) degradação de mRNA (ZUK; JACOBSON, 1998; VALENTINI et al., 2002), 4) polarização do citoesqueleto de actina e progressão do ciclo celular em *S. cerevisiae* (ZANELLI; VALENTINI, 2005), 5) degradação de mRNA via NMD (SCHRADER et al., 2006) e 6) secreção de proteínas necessárias para a formação do broto na fase G1/S do ciclo celular (FRIGIERI et al., 2007; FRIGIERI et al., 2008).

6.1. eIF5A no contexto dos *P bodies*

Como foi mostrado que mutantes de eIF5A acumulam mRNA na temperatura não permissiva (ZUK; JACOBSON, 1998; VALENTINI et al., 2002), novos experimentos foram propostos neste estudo para esclarecer o envolvimento de eIF5A com a degradação de mRNA. Uma vez que foi sugerido que a degradação de mRNA bem como as etapas de remoção do capacete ⁷mG ocorram em corpúsculos de processamento chamados *P bodies* (SHETH; PARKER, 2003), estes agregados citoplasmáticos se tornaram o nosso principal alvo.

Como descrito anteriormente, em *S. cerevisiae*, os *P bodies* foram envolvidos com diversos processos celulares e são agregados citoplasmáticos compostos principalmente de mRNPs, fatores de remoção do capacete 7mG, de repressão da tradução e de degradação de mRNA (SHETH; PARKER, 2003; COUGOT et al., 2004; EULALIO et al., 2007; PARKER; SHETH, 2007).

Com o intuito de verificar se eIF5A está presente nos *P bodies*, o que reforçaria a possibilidade deste fator estar envolvido com a etapa de degradação de mRNA, foram realizados ensaios de localização subcelular de GFP-eIF5A funcional em levedura (VALENTINI et al., 2002), em condições de indução da agregação dos *P bodies*. Entretanto, nas condições de estresse testadas, não foi possível evidenciar agregados citoplasmáticos indicando que eIF5A não está sendo direcionada para os *P bodies* (Figura 8). Esta evidência afasta uma função direta para eIF5A na degradação de mRNA e sugere que o defeito de degradação de mRNA observado para os mutantes de eIF5A seja secundário. Entretanto, deve ser lembrado que a degradação de mRNA não ocorre exclusivamente nos *P bodies*.

A adição do antibiótico ciclo-heximida, o qual é inibidor da elongação da tradução, impede a formação dos *P bodies* em culturas de *S. cerevisiae* (SHETH; PARKER, 2003). Em 2006, evidências iniciais de uma função para eIF5A na elongação ao invés de início da tradução foram reveladas pelo nosso laboratório (ZANELLI et al., 2006). Portanto, a utilização do mutante termossensível *tif51A-3* (VALENTINI et al., 2002) em ensaios de agregação de *P bodies*, tornou-se interessante para comparar o efeito observado nesse mutante com aquele induzido por ciclo-heximida. As células depletadas de eIF5A bem como aquelas que foram interrompidas na elongação da tradução pelo tratamento com ciclo-heximida não foram capazes de agregar *P bodies* (Figura 9). Esses resultados obtidos fortalecem a hipótese de participação indireta de eIF5A na degradação de mRNA.

Com o objetivo de fortalecer os dados obtidos e apresentados até agora, outras linhagens mutantes de fatores envolvidos com elongação da tradução foram utilizadas em ensaios de agregação de *P bodies*. As linhagens selecionadas foram o mutante *cca1-1* (PELTZ; DONAHUE; JACOBSON, 1992) e o dominante negativo *eft2*^{H699K} (ORTIZ; KINZY, 2005). Analogamente ao observado para o mutante *tif51A-3*, os mutantes *cca1-1* e *eft2*^{H699K} não foram capazes de agregar *P bodies* em níveis normais (Figura 10 e 11), evidenciando que alterações na elongação da tradução inibem a formação destes corpúsculos.

Os resultados obtidos com o estudo da relação entre eIF5A e a agregação de *P bodies* além de evidenciar o efeito indireto de eIF5A no acúmulo de mRNA, sugerem uma relação funcional entre eIF5A e eEF2, que juntamente com outros resultados obtidos por nós (GREGIO et al., 2009) e por outros (SAINI et al., 2009) sugeriram uma função para eIF5A na etapa de elongação da tradução.

6.2. eIF5A no contexto dos fatores de repressão da tradução e/ou degradação de mRNA

Uma vez que a possibilidade de uma função direta para eIF5A na degradação de mRNA foi enfraquecida, tornou-se interessante verificar se existe envolvimento de eIF5A com a repressão da tradução. Uma das condições que promovem a repressão da tradução é a depleção de glicose, a qual acarreta alterações no perfil polissomal, com aumento do pico de 80S e *run-off* das frações polissomais (HOLMES et al., 2004). Portanto, foi analisada a resposta à repressão da tradução de uma linhagem mutante de eIF5A (*tif51A-1*) e da linhagem mutante da exorribonuclease 5'→3' Xrn1 (*xrn1Δ*), a qual foi utilizada como controle de resistência à repressão da tradução após a depleção de glicose (HOLMES et al., 2004). Neste ensaio foi verificado que ambas linhagens apresentam defeito na repressão da tradução, o que pode ser observado pela razão entre as áreas dos polissomos/80S (poli/80S) (Figura 12). Entretanto, uma correlação funcional direta entre essas proteínas não pode ser levada em consideração, uma vez que provavelmente os mutantes analisados, *tif51A-1* e *xrn1Δ*, apresentam defeitos na repressão da tradução por mecanismos distintos.

Como mencionado anteriormente, alguns dos fatores de degradação de mRNA também apresentam função na repressão da tradução, entre eles, podemos citar os fatores Sbp1, Dhh1 e Pat1 (BONNEROT; BOECK; LAPEYRE, 2000; COLLIER et al., 2001; SEGAL; DUNCKLEY; PARKER, 2006). Considerando que neste estudo foi mostrado defeito na repressão da tradução em mutante de eIF5A (Figura 12), ensaios de interação genética sintética foram realizados entre linhagens mutantes de eIF5A e de mutantes de sete fatores envolvidos com repressão da tradução e/ou degradação de mRNA, a saber: Sbp1 (SEGAL; DUNCKLEY; PARKER, 2006), Dhh1 (COLLER et al., 2001), Pat1 (BONNEROT; BOECK; LAPEYRE, 2000), Lsm1 (THARUN et al.,

2000; THARUN; PARKER, 2001), Dcp1 (BEELMAN et al., 1996; LAGRANDEUR; PARKER, 1998), Ski8 (BROWN; BAI; JOHNSON, 2000) e Xrn1 (HSU; STEVENS, 1993).

O mutante *tif51A-1* não interagiu geneticamente com os mutantes de fatores que atuam diretamente na remoção do capacete de ⁷mG (Lsm1, Dcp1) e na via de degradação 3'→5' (Ski8) (Figura 14), o que contribui para afastar a hipótese de existir uma função direta de eIF5A na degradação de mRNA. Curiosamente, foi identificada uma interação genética de piora no crescimento entre o mutante *tif51A-1* e a linhagem *xrn1Δ* (Figura 13), como dito anteriormente um fator envolvido diretamente com a degradação de mRNA. Entretanto, deve ser lembrado que Xrn1 tem um papel secundário na maturação de ribossomos (GEERLINGS; VOS; RAUÉ, 2000), o que provavelmente deve influenciar indiretamente a função de eIF5A na tradução, explicando o surgimento do fenótipo sintético doente entre *tif51A-1* e *xrn1Δ*.

Finalmente, foi possível mostrar que as linhagens nocaute de *dhh1Δ* e *pat1Δ* apresentaram interações genéticas sintética por supressão parcial do defeito de crescimento dos mutantes de eIF5A, *tif51A-1* e *tif51A-3*, respectivamente (Figuras 16 e 17). Em concordância, a combinação das mutações existentes nos mutantes de eIF5A, *tif51A-1* e *tif51A-3*, com o nocaute de Sbp1 (*sbp1Δ*) também levou à supressão parcial do defeito de crescimento nos mutantes de eIF5A (Figura 15), o que comprova que esta interação genética não é alelo específica. Esses resultados são bastante interessantes, pois na sequência de eventos relacionados à degradação de mRNA, Sbp1 parece agir juntamente com Dhh1 e Pat1 no controle da repressão da tradução e envio de mRNAs para degradação nos *P bodies* (SEGAL; DUNCKLEY; PARKER, 2006), sendo que Dhh1 e Pat1 parecem agir por vias parcialmente paralelas na célula (COLLER; PARKER, 2005). Portanto, a ocorrência de interação genética de melhora do fenótipo de termossensibilidade dos mutantes de eIF5A sugere que as mutações nestes fatores de repressão da tradução estejam atuando como supressores extragênicos dos alelos mutados de eIF5A. Ainda, esses resultados de supressão extragênica sugerem também que eIF5A tenha uma função oposta a esses fatores, atuando como um fator ativador da tradução.

6.3. eIF5A e Sbp1 no contexto dos grânulos de estresse

Como apresentado na Introdução, além dos *P bodies* existem os grânulos de estresse que se agregam em *S. cerevisiae* e em outros eucariotos. Estes são formados por fatores presentes no complexo de pré-iniciação 48S, o qual inclui mRNA ligado a Pab1, fatores de início de tradução, a subunidade ribossomal 40S, além de alguns fatores de repressão da tradução e/ou degradação de mRNA (PARKER; SHETH, 2007; EULALIO et al., 2007; GROUSL et al., 2009; BUCHAN; NISSAN; PARKER, 2010). Os grânulos de estresse agregam-se sob diversas condições de estresse, como depleção de glicose, choque térmico, entre outros, portanto não ocorrem naturalmente nas células (ANDERSON; KEDERSHA, 2002; 2006; BUCHAN; PARKER, 2009; GROUSL et al., 2009; BUCHAN; YOON; PARKER, 2011}.

Como mostrado anteriormente, o mutante de eIF5A *tif51A-3* não é capaz de agregar *P bodies* na temperatura não permissiva (Figura 9), de maneira semelhante ao efeito observado pelo bloqueio da elongação da tradução com o tratamento com ciclo-heximida. Como ocorre com os *P bodies*, o tratamento das células com ciclo-heximida inibe também completamente a agregação dos grânulos de estresse, tanto em células de mamíferos quanto em leveduras (ANDERSON; KEDERSHA, 2006; GROUSL et al., 2009). Ainda, em outro estudo ficou comprovada a importância da hipusinação de eIF5A para a agregação dos grânulos de estresse (LI et al., 2010). Portanto, foi investigado se ocorre a agregação dos grânulos de estresse nas linhagens mutantes de eIF5A de *S. cerevisiae*.

Os mutantes de eIF5A inicialmente selecionados foram *tif51A*^{Q22H/L93F} e *tif51A*^{K56A}, os quais produzem eIF5A estável na temperatura não permissiva (DIAS et al., 2008), e como marcador dos grânulos de estresse foi utilizada a fusão eIF3a-GFP (GROUSL et al., 2009). Foi verificado que estes mutantes de eIF5A apresentam diminuição na formação dos grânulos de estresse após choque térmico (Figura 18), sendo mais acentuado o fenótipo para o mutante *tif51A*^{Q22H/L93F}.

Com intuito de melhorar nosso estudo, outro mutante de eIF5A *tif51A-3* (VALENTINI et al., 2002) foi selecionado e utilizado em paralelo com o mutante *tif51A*^{Q22H/L93F}. Para verificar a diminuição na agregação dos grânulos de estresse dois marcadores destes corpúsculos, eEF3-mCherry (HAŠEK, J.)⁶ e eIF3a-GFP (GROUSL et al., 2009), foram utilizados em ensaios de co-localização. Neste ensaio foi revelado que o mutante termossensível de eIF5A (*tif51A-3*) apresentou fenótipo

⁶ HAŠEK, J. (Institute of Microbiology - Academy of Sciences of the Czech Republic) Comunicação pessoal, 2010.

mais severo de diminuição na agregação dos grânulos de estresse que o mutante estável (*tif51A*^{Q22H/L93F}) (Figura 19).

Foi descrito previamente que algumas linhagens mutantes de eIF5A apresentam alterações nos níveis de hipusinação (DIAS et al., 2008). Portanto, o fenótipo de diminuição na agregação dos grânulos de estresse dos mutantes de eIF5A pode estar relacionado às mutações presentes neste fator, as quais influenciam na hipusinação de eIF5A (DIAS et al., 2008) e, conseqüentemente, poderiam ser responsáveis por esta deficiência de agregação dos corpúsculos.

Como os grânulos de estresse possuem em sua composição os mRNAs traducionalmente reprimidos (mRNPs) (BUCHAN; PARKER, 2009), estes poderiam estar aprisionados nos polissomos, o que justificaria a diminuição do padrão de agregação. Entretanto, os fenótipos de reduzida formação na agregação de grânulos de estresse estão acompanhados de *run-off* dos polissomos das células submetidas ao choque térmico (Figura 20), de acordo com dados mostrados previamente na literatura (GROUSL et al., 2009). Portanto podemos concluir que, a redução na formação dos grânulos de estresse nos mutantes de eIF5A no estado de choque térmico não está relacionada com acúmulo de polissomos e sim com as mutações no fator eIF5A.

De acordo com os dados obtidos em nosso estudo, o fator eIF5A selvagem que apresenta níveis adequados de hipusinação é necessário para a agregação dos grânulos de estresse em levedura. Corroborando com os nossos resultados, foi mostrado que eIF5A hipusinado é necessário para a agregação dos grânulos de estresse em mamíferos (LI et al., 2010). Apesar de os grânulos de estresse não possuírem função definida, estes parecem ser importantes para as células retornarem ao metabolismo normal após cessado o estresse (GROUSL et al., 2009). Portanto, as evidências em levedura de que os mutantes de eIF5A não são capazes de agregar os grânulos de estresse, de maneira semelhante ao selvagem, evidenciam o envolvimento de eIF5A com a tradução, atuando como um ativador.

Como mencionado anteriormente, foi observado que eIF5A localiza-se nos grânulos de estresse sob diferentes condições de estresse em células de mamíferos (LI et al., 2010). Com intuito de verificar se eIF5A está presente nestes corpúsculos em levedura foram realizados ensaios de co-localização de GFP-eIF5A com proteínas conhecidamente presentes nos grânulos de estresse. A presença de

eIF5A nos grânulos de estresse induzidos por choque térmico foi revelada (Figuras 21, 22 e 23).

Como outros fatores de repressão da tradução e degradação de mRNA foram observados nos grânulos de estresse, por exemplo Dhh1 (SWISHER; PARKER, 2010), e não existe informação na literatura sobre a presença de Sbp1 nestes corpúsculos, o experimento de co-localização de Sbp1-GFP e eIF3a-mRFP foi realizado. Foi verificado que Sbp1 também se agrega nos grânulos de estresse induzidos por choque térmico (Figura 24).

Os nossos resultados revelaram pela primeira vez que eIF5A e Sbp1 agregam-se nos grânulos de estresse induzidos pelo choque térmico, acrescentando mais dois fatores na lista crescente dos componentes destes corpúsculos em *S. cerevisiae*.

Considerando que eIF5A é um fator de elongação da tradução, os nossos resultados evidenciam um efeito secundário para eIF5A na degradação de mRNA. Ainda, foi verificado que eIF5A não está presente nos *P bodies*, porém está presente nos grânulos de estresse, os quais são corpúsculos que contêm fatores envolvidos com a tradução e sua repressão. Finalmente, os dados apresentados neste trabalho revelaram uma função oposta de eIF5A aos fatores de repressão da tradução, reforçam uma função secundária para eIF5A na degradação de mRNA, e comprovam a função de eIF5A como um fator ativador da tradução.

7. CONCLUSÕES

7.1. eIF5A não se localiza nos *P bodies* em diversas condições de estresse, afastando a hipótese de eIF5A ter uma função direta na degradação de mRNA.

7.2. Mutantes de eIF5A e outros fatores envolvidos na elongação da tradução não agregam *P bodies* na temperatura não permissiva, evidenciando a função para eIF5A na elongação da tradução e sugerindo que o acúmulo de mRNAs nos mutantes de eIF5A seja secundário ao defeito na tradução.

7.3. Não existe interação genética sintética entre mutantes de eIF5A e mutantes dos genes *LSM1*, *DCP1* e *SKI8* que codificam proteínas que atuam diretamente na degradação de mRNA.

7.4. Nocaute do gene codificador da exonuclease Xrn1 intensifica o fenótipo de termossensibilidade do mutante de eIF5A (*tif51A-1*).

7.5. Nocauteamento dos genes codificadores das proteínas Sbp1, Dhh1 e Pat1 envolvidos na repressão da tradução suprime parcialmente o fenótipo de termossensibilidade de mutantes de eIF5A, evidenciando que eIF5A tem uma função oposta a estes fatores, uma vez que é um fator de elongação da tradução.

7.6. Mutantes de eIF5A apresentam defeito na agregação dos grânulos de estresse induzidos por choque térmico.

7.7. As proteínas Sbp1 e eIF5A são componentes novos dos grânulos de estresse induzidos por choque térmico em levedura.

REFERÊNCIAS

ALAMGIR, M.; ERUKOVA, V.; JESSULAT, M.; AZIZI, A.; GOLSHANI, A. Chemical-genetic profile analysis of five inhibitory compounds in yeast. **BMC Chem. Biol.**, v. 10, p. 6, 2010.

ANDERSEN, C. B.; BECKER, T.; BLAU, M.; ANAND, M.; HALIC, M.; BALAR, B.; MIELKE, T.; BOESEN, T.; PEDERSEN, J. S.; SPAHN, C. M. T.; KINZY, T. G.; ANDERSEN, G. R.; BECKMANN, R. Structure of eEF3 and the mechanism of transfer RNA release from the E-site. **Nature**, v. 443, n. 7112, p. 663-668, 2006.

ANDERSON, J. S.; PARKER, R. P. The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. **EMBO J.**, v. 17, n. 5, p. 1497-1506, 1998.

ANDERSON, P.; KEDERSHA, N. Stressful initiations. **J. Cell Sci.**, v. 115, n. Pt 16, p. 3227-3234, 2002.

ANDERSON, P.; KEDERSHA, N. RNA granules. **J. Cell Biol.**, v. 172, n. 6, p. 803-808, 2006.

ANDERSON, P.; KEDERSHA, N. Stress granules: the Tao of RNA triage. **Trends Biochem. Sci.**, v. 33, n. 3, p. 141-150, 2008.

AOKI, H.; XU, J.; EMILI, A.; CHOSAY, J. G.; GOLSHANI, A.; GANOZA, M. C. Interactions of elongation factor EF-P with the *Escherichia coli* ribosome. **FEBS J.**, v. 275, n. 4, p. 671-681, 2008.

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: Willey, 2004.

BALAGOPAL, V.; PARKER, R. Polysomes, P bodies and stress granules: states and fates of eukaryotic mRNAs. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 21, n. 3, p. 403-408, 2009.

BARBEE, S. A.; ESTES, P. S.; CZIKO, A. M.; HILLEBRAND, J.; LUEDEMAN, R. A.; COLLIER, J. M.; JOHNSON, N.; HOWLETT, I. C.; GENG, C.; UEDA, R.; BRAND, A. H.; NEWBURY, S. F.; WILHELM, J. E.; LEVINE, R. B.; NAKAMURA, A.; PARKER, R.; RAMASWAMI, M. Staufen- and FMRP-containing neuronal RNPs are structurally and functionally related to somatic P bodies. **Neuron**, v. 52, n. 6, p. 997-1009, 2006.

BASHKIROV, V. I.; SCHERTHAN, H.; SOLINGER, J. A.; BUERSTEDDE, J. M.; HEYER, W. D. A mouse cytoplasmic exoribonuclease (mXRN1p) with preference for G4 tetraplex substrates. **J. Cell Biol.**, v. 136, n. 4, p. 761-773, 1997.

BECKHAM, C.; HILLIKER, A.; CZIKO, A. M.; NOUEIRY, A.; RAMASWAMI, M.; PARKER, R. The DEAD-box RNA helicase Ded1p affects and accumulates in *Saccharomyces cerevisiae* P-bodies. **Mol. Biol. Cell**, v. 19, n. 3, p. 984-993, 2008.

BEELMAN, C. A.; PARKER, R. Differential effects of translational inhibition in cis and in trans on the decay of the unstable yeast MFA2 mRNA. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 13, p. 9687-9692, 1994.

BEELMAN, C. A.; STEVENS, A.; CAPONIGRO, G.; LAGRANDEUR, T. E.; HATFIELD, L.; FORTNER, D. M.; PARKER, R. An essential component of the decapping enzyme required for normal rates of mRNA turnover. **Nature**, v. 382, n. 6592, p. 642-646, 1996.

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.; 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.

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

BHATTACHARYYA, S. N.; HABERMACHER, R.; MARTINE, U.; CLOSS, E. I.; FILIPOWICZ, W. Stress-induced reversal of microRNA repression and mRNA P-body localization in human cells. **Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.**, v. 71, p. 513-521, 2006.

BONNEROT, C.; BOECK, R.; LAPEYRE, B. The two proteins Pat1p (Mrt1p) and Spb8p interact *in vivo*, are required for mRNA decay, and are functionally linked to Pab1p. **Mol. Cell. Biol.**, v. 20, n. 16, p. 5939-5946, 2000.

BRENGUES, M.; PARKER, R. Accumulation of polyadenylated mRNA, Pab1p, eIF4E, and eIF4G with P-bodies in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Biol. Cell**, v. 18, n. 7, p. 2592-2602, 2007.

BRENGUES, M.; TEIXEIRA, D. ; PARKER, R. Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. **Science**, v. 310, n. 5747, p. 486-489, 2005.

BROGNA, S.; WEN, J. Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) mechanisms. **Nat. Struct. Mol. Biol.**, v. 16, n. 2, p. 107-113, 2009.

BROWN, J. T.; BAI, X.; JOHNSON, A. W. The yeast antiviral proteins Ski2p, Ski3p, and Ski8p exist as a complex in vivo. **RNA**, v. 6, n. 3, p. 449-57, 2000.

BUCHAN, J. R.; PARKER, R. Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. **Mol. Cell**, v. 36, n. 6, p. 932-941, 2009.

BUCHAN, J. R.; MUHLRAD, D.; PARKER, R. P bodies promote stress granule assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Cell Biol.**, v. 183, n. 3, p. 441-55, 2008.

BUCHAN, J. R.; NISSAN, T.; PARKER, R. Analyzing P-bodies and stress granules in *Saccharomyces cerevisiae*. **Methods Enzymol.**, v. 470, p. 619-640, 2010.

BUCHAN, J. R.; YOON, J. H.; PARKER, R. Stress-specific composition, assembly and kinetics of stress granules in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Cell Sci.**, v. 124, p. 228-239, 2011.

CAO, D.; PARKER, R. Computational modeling of eukaryotic mRNA turnover. **RNA**, v. 7, n. 9, p. 1192-1212, 2001.

CHANG, Y. F.; IMAM, J. S.; WILKINSON, M. F. The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 76, p. 51-74, 2007.

CHAUDHURI, J.; CHOWDHURY, D.; MAITRA, U. Distinct functions of eukaryotic translation initiation factors eIF1A and eIF3 in the formation of the 40 S ribosomal preinitiation complex. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 25, p. 17975-17980, 1999.

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.

CHRISTIANSON, T. W.; SIKORSKI, R. S.; DANTE, M. ; SHERO, J. H.; HIETER, P. Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. **Gene**, v. 110, n. 1, p. 119-122, 1992.

COLLER, J.; PARKER, R. Eukaryotic mRNA decapping. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 73, p. 861-890, 2004.

COLLER, J.; PARKER, R. General translational repression by activators of mRNA decapping. **Cell**, v. 122, n. 6, p. 875-886, 2005.

COLLER, J. M.; TUCKER, M.; SHETH, U.; VALENCIA-SANCHEZ, M. A.; PARKER, R. The DEAD box helicase, Dhh1p, functions in mRNA decapping and interacts with both the decapping and deadenylase complexes. **RNA**, v. 7, n. 12, p. 1717-1727, 2001.

COUGOT, N.; VAN DIJK, E.; BABAJKO, S.; SÉRAPHIN, B. 'Cap-tabolism'. **Trends Biochem. Sci.**, v. 29, n. 8, p. 436-444, 2004.

CUENCA-BONO, B.; GARCÍA-MOLINERO, V.; PASCUAL-GARCÍA, P.; GARCÍA-OLIVER, E.; LLOPIS, A.; RODRÍGUEZ-NAVARRO, S. A novel link between Sus1 and the cytoplasmic mRNA decay machinery suggests a broad role in mRNA metabolism. **BMC Cell Biol.**, v. 11, p. 19, 2010.

DECKER, C. J.; PARKER, R. A turnover pathway for both stable and unstable mRNAs in yeast: evidence for a requirement for deadenylation. **Genes Dev.**, v. 7, n. 8, p. 1632-1643, 1993.

DECKER, C. J.; PARKER, R. CAR-1 and trailer hitch: driving mRNP granule function at the ER? **J. Cell Biol.**, v. 173, n. 2, p. 159-163, 2006.

DECKER, C. J.; TEIXEIRA, D.; PARKER, R. Edc3p and a glutamine/asparagine-rich domain of Lsm4p function in processing body assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Cell Biol.**, v. 179, n. 3, p. 437-449, 2007.

DELOCHE, O.; DE LA CRUZ, J.; KRESSLER, D.; DOÈRE, 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.

DENIS, C. L.; CHIANG, Y. C.; CUI, Y.; CHEN, J. Genetic evidence supports a role for the yeast CCR4-NOT complex in transcriptional elongation. **Genetics**, v. 158, n. 2, p. 627-634, 2001.

DIAS, C. A.; CANO, V. S.; RANGEL, S. M.; APPONI, L. H.; FRIGIERI, M. C.; MUNIZ, J. R.; GARCIA, W.; PARK, M. H.; GARRATT, R. C.; ZANELLI, C. F.; VALENTINI, S. R. Structural modeling and mutational analysis of yeast eukaryotic translation initiation factor 5A reveal new critical residues and reinforce its involvement in protein synthesis. **FEBS Journal**, v. 275, n. 8, p. 1874-1888, 2008.

DIAS, C. A. O.; GREGIO, A. P. B.; ROSSI, D.; GALVÃO, F. C.; WATANABE, T. F.; PARK, M. H.; VALENTINI, S. R.; ZANELLI, C. F. eIF5A functionally interacts with eEF2. **Aminoacids**, 2011. In press.

DUNCAN, R. F.; HERSHEY, J. W. Changes in eIF-4D hypusine modification or abundance are not correlated with translational repression in HeLa cells. **J. Biol. Chem.**, v. 261, n. 27, p. 12903-12906, 1986.

DUNCKLEY, T.; TUCKER, M.; PARKER, R. Two related proteins, Edc1p and Edc2p, stimulate mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 157, n. 1, p. 27-37, 2001.

EHRENBERG, M.; HAURYLIUK, V.; CRIST, C. G.; NAKAMURA, Y. Translation termination, the prion [PSI⁺], and ribosomal recycling. In: MATHEWS, M. B.; SONENBERG, N.; HERSHEY, J. W. B. (Ed.). **Translational control in biology and medicine**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2007. v. 1, cap. 7, p. 173-196.

ELFGANG, C.; ROSORIUS, O.; HOFER, L.; JAKSCHE, H.; HAUBER, J.; BEVEC, D. Evidence for specific nucleocytoplasmic transport pathways used by leucine-rich nuclear export signals. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 96, n. 11; p. 6229-6234, 1999.

ENYENIHI, A. H.; SAUNDERS, W. S. Large-scale functional genomic analysis of sporulation and meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 163, n. 1, p. 47-54, 2003.

EULALIO, A.; BEHM-ANSMANT, I.; SCHWEIZER, D.; IZAURRALDE, E. P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing. **Mol. Cell. Biol.**, v. 27, n. 11, p. 3970-3981, 2007.

EYSTATHIOY, T.; CHAN, E. K.; TENENBAUM, S. A.; KEENE, J. D.; GRIFFITH, K.; FRITZLER, M. J. A phosphorylated cytoplasmic autoantigen, GW182, associates with a unique population of human mRNAs within novel cytoplasmic speckles. **Mol. Biol. Cell**, v. 13, n. 4, p. 1338-1351, 2002.

FAN-MINOQUE, H.; DU, M.; PISAREV, A. V.; KALLMEYER, A. K.; SALAS-MARCO, J.; KEELING, K. M.; THOMPSON, S. R.; PESTOVA, T. V.; BEDWELL, D. M. Distinct eRF3 requirements suggest alternate eRF1 conformations mediate peptide release during eukaryotic translation termination. **Mol. Cell**, v. 30, n. 5, p. 599-609, 2008.

FENGER-GRØN, M.; FILLMAN, C.; NORRILD, B.; LYKKE-ANDERSEN, J. Multiple processing body factors and the ARE binding protein TTP activate mRNA decapping. **Mol. Cell**, v. 20, n. 6, p. 905-915, 2005.

FRANKS, T. M.; LYKKE-ANDERSEN, J. The control of mRNA decapping and P-body formation. **Mol. Cell**, v. 32, n. 5, p. 605-615, 2008.

FRIGIERI, M. C.; JOÃO LUIZ, M. V.; APPONI, L. H.; ZANELLI, C. F.; VALENTINI, S. R. Synthetic lethality between eIF5A and Ypt1 reveals a connection between translation and the secretory pathway in yeast. **Mol. Genet. Genomics**, v. 280, n. 3, p. 211-221, 2008.

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.

GEERLINGS, T. H.; VOS, J. C.; RAUÉ, H. A. The final step in the formation of 25S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae* is performed by 5'→3' exonucleases. **RNA**, v. 6, n. 12, p. 1698-1703, 2000.

GINGRAS, A. C.; RAUGHT, B.; SONENBERG, N. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 68, p. 913-963, 1999.

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.

GREGIO, A. P. B.; CANO, V. S. P.; AVACA, J. S.; VALENTINI, S. R.; ZANELLI, C. F. eIF5A has a function in the elongation step of translation in yeast. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 380, n. 4, p. 785-790, 2009.

GROUSL, T.; IVANOV, P.; FRÝDLOVÁ, I.; VASICOVÁ, P.; JANDA, F.; VOJTOVÁ, J.; MALÍNSKÁ, K.; MALCOVÁ, I.; NOVÁKOVÁ, L.; JANOSKOVÁ, D.; VALÁSEK, L.; HASEK, J. Robust heat shock induces eIF2 α -phosphorylation-independent assembly of stress granules containing eIF3 and 40S ribosomal subunits in budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Cell Sci.**, v. 122, n. Pt 12, p. 2078-2088, 2009.

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. E. **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.

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.

HERSHEY, J. W. Regulation of protein synthesis and the role of eIF3 in cancer. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 43, n. 10, p. 920-930, 2010.

HILLEREN, P.; PARKER, R. Mechanisms of mRNA surveillance in eukaryotes. **Annu. Rev. Genet.**, v. 33, p. 229-260, 1999.

HOLMES, L. E.; CAMPBELL, S. G.; DE LONG, S. K.; SACHS, A. B.; ASHE, M. P. Loss of translational control in yeast compromised for the major mRNA decay pathway. **Mol. Cell Biol.**, v. 24, n. 7, p. 2998-3010, 2004.

HOQUE, M.; HANAUSKE-ABEL, H. M.; PALUMBO, P.; SAXENA, D.; D'ALLIESSI GANDOLFI, D.; PARK, M. H.; PE'ERY, T.; MATHEWS, M. B. Inhibition of HIV-1 gene expression by Ciclopirox and Deferiprone, drugs that prevent hypusination of eukaryotic initiation factor 5A. **Retrovirology**, v. 6, p. 90, 2009.

HOYLE, N. P.; CASTELLI, L. M.; CAMPBELL, S. G.; HOLMES, L. E.; ASHE, M. P. Stress-dependent relocalization of translationally primed mRNPs to cytoplasmic granules that are kinetically and spatially distinct from P-bodies. **J. Cell Biol.**, v. 179, n. 1, p. 65-74, 2007.

HSU, C. L.; STEVENS, A. Yeast cells lacking 5'→3' exoribonuclease 1 contain mRNA species that are poly(A) deficient and partially lack the 5' cap structure. **Mol. Cell Biol.**, v. 13, n. 8, p. 4826-4835, 1993.

INGELFINGER, D.; ARNDT-JOVIN, D. J.; LÜHRMANN, R.; ACHSEL, T. The human LSm1-7 proteins colocalize with the mRNA-degrading enzymes Dcp1/2 and Xrn1 in distinct cytoplasmic foci. **RNA**, v. 8, n. 12, p. 1489-1501, 2002.

JACKSON, R. J.; HELLEN, C. U.; PESTOVA, T. V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 11, n. 2, p. 113-127, 2010.

JANKE, C.; MAGIERA, M. M.; RATHFELDER, N.; TAXIS, C.; REBER, S.; MAEKAWA, H.; MORENO-BORCHART, A.; DOENGES, G.; SCHWOB, E.; SCHIEBEL, E.; KNOP, M. A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. **Yeast**, v. 21, n. 11, p. 947-962, 2004.

JAO, D. L.; CHEN, K. Y. Subcellular localization of the hypusine-containing eukaryotic initiation factor 5A by immunofluorescent staining and green fluorescent protein tagging. **J. Cell. Biochem.**, v. 86, n. 3, p. 590-600, 2002.

JAO, D. L.; CHEN, K. Y. Tandem affinity purification revealed the hypusine-dependent binding of eukaryotic initiation factor 5A to the translating 80S ribosomal complex. **J. Cell. Biochem.**, v. 97, n. 3, p. 583-98, 2006.

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. 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.

KAPP, L. D.; LORSCH, J. R. The molecular mechanics of eukaryotic translation. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 73, p. 657-704, 2004.

KATO, K.; YAMAMOTO, Y.; IZAWA, S. Severe ethanol stress induces assembly of stress granules in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 28, n. 5, p. 339-347, 2011.

KEDERSHA, N.; ANDERSON, P. Chapter 4 regulation of translation by stress granules and processing bodies. **Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.**, v. 90, p. 155-185, 2009.

KEDERSHA, N.; CHEN, S.; GILKS, N.; LI, W.; MILLER, I. J.; STAHL, J.; ANDERSON, P. Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNA(i)(Met))-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules. **Mol. Biol. Cell**, v. 13, n. 1, p. 195-210, 2002.

KEDERSHA, N.; STOECKLIN, G.; AYODELE, M.; YACONO, P.; LYKKE-ANDERSEN, J.; FRITZLER, M. J.; SCHEUNER, D.; KAUFMAN, R. J.; GOLAN, D. E.; ANDERSON, P. Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. **J. Cell Biol.**, v. 169, n. 6, p. 871-884, 2005.

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.

KLIER, H.; WOHL, T.; ECKERSKORN, C.; MAGDOLEN, V.; LOTTSPREICH, 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.

KSHIRSAGAR, M.; PARKER, R. Identification of Edc3p as an enhancer of mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 166, n. 2, p. 729-739, 2004.

KURATA, S.; NIELSEN, K. H.; MITCHELL, S. F.; LORSCH, J. R.; KAJI, A. Ribosome recycling step in yeast cytoplasmic protein synthesis is catalyzed by eEF3 and ATP. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 107, n. 24, p. 10854-10859, 2010.

LAGRANDEUR, T. E.; PARKER, R. Isolation and characterization of Dcp1p, the yeast mRNA decapping enzyme. **EMBO J.**, v. 17, n. 5, p. 1487-96, 1998.

LANDAU, G.; BERCOVICH, Z.; PARK, M. H.; KAHANA, C. The role of polyamines in supporting growth of mammalian cells is mediated through their requirement for translation initiation and elongation. **J. Biol. Chem.**, v. 285, n. 17, p. 12474-12481, 2010.

LEE, L. A.; ELFRING, L. K.; BOSCO, G.; ORR-WEAVER, T. L. A genetic screen for suppressors and enhancers of the *Drosophila* PAN GU cell cycle kinase identifies cyclin B as a target. **Genetics**, v. 158, n. 4, p. 1545-1556, 2001.

LEE, S. B.; PARK, J. H.; KAEVEL, J.; SRAMKOVA, M.; WEIGERT, R.; PARK, M. H. The effect of hypusine modification on the intracellular localization of eIF5A. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 383, n. 4, p. 497-502, 2009.

LI, C. H.; OHN, T.; IVANOV, P.; TISDALE, S.; ANDERSON, P. eIF5A promotes translation elongation, polysome disassembly and stress granule assembly. **PLoS One**, v. 5, n. 4, p. e9942, 2010.

LIU, J.; HENAO-MEJIA, J.; LIU, H.; ZHAO, Y.; HE, J. J. Translational regulation of HIV-1 replication by HIV-1 Rev cellular cofactors Sam68, eIF5A, hRIP, and DDX3. **J. Neuroimmune Pharmacol.**, v. 6, n. 2, p. 308-321, 2011.

MAGDOLEN, V.; KLIER, H.; WOHL, T.; KLINK, F.; HIRT, H.; HAUBER, J.; LOTTSPEICH, 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.

MAJUMDAR, R.; BANDYOPADHYAY, A.; MAITRA, U. Mammalian translation initiation factor eIF1 functions with eIF1A and eIF3 in the formation of a stable 40 S preinitiation complex. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 8, p. 6580-6587, 2003.

MATHEWS, M. B.; SONENBERG, N.; HERSHEY, J. W. B. Origins and principles of translational control. In: MATHEWS, M. B.; SONENBERG, N.; HERSHEY, J. W. B. (Ed.). **Translational control in biology and medicine**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2007. v. 1, cap. 1, p. 1-40.

MERRICK, W. C. Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis. **Microbiol. Rev.**, v. 56, n. 2, p. 291-315, 1992.

MOORE, M. J. From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. **Science**, v. 309, n. 5740, p. 1514-1518, 2005.

MUHLRAD, D.; DECKER, C. J.; PARKER, R. Deadenylation of the unstable mRNA encoded by the yeast MFA2 gene leads to decapping followed by 5'→3' digestion of the transcript. **Genes Dev.**, v. 8, n. 7, p. 855-866, 1994.

MUHLRAD, D.; DECKER, C. J.; PARKER, R. Turnover mechanisms of the stable yeast PGK1 mRNA. **Mol. Cell. Biol.**, v. 15, n. 4, p. 2145-2156, 1995.

NISSAN, T.; PARKER, R. Analyzing P-bodies in *Saccharomyces cerevisiae*. **Methods Enzymol.**, v. 448, p. 507-520, 2008.

NISSAN, T.; RAJYAGURU, P.; SHE, M.; SONG, H.; PARKER, R. Decapping activators in *Saccharomyces cerevisiae* act by multiple mechanisms. **Mol. Cell**, v. 39, n. 5, p. 773-783, 2010.

ORTIZ, P. A.; KINZY, T. G. Dominant-negative mutant phenotypes and the regulation of translation elongation factor 2 levels in yeast. **Nucleic Acids Res.**, v. 33, n. 15, p. 5740-5748, 2005.

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

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.; 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, 1993.

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.

PARKER, R.; SHETH, U. P bodies and the control of mRNA translation and degradation. **Mol. Cell**, v. 25, n. 5, p. 635-646, 2007.

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.

PELTZ, S. W.; DONAHUE, J. L.; JACOBSON, A. A mutation in the tRNA nucleotidyltransferase gene promotes stabilization of mRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.**, v. 12, n. 12, p. 5778-5784, 1992.

PESTOVA, T. V.; KOLUPAEVA, V. G.; LOMAKIN, I. B.; PILIPENKO, E. V.; SHATSKY, I. N.; AGOL, V. I.; HELLEN, C. U. Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 98, n. 13, p. 7029-7036, 2001.

PESTOVA, T. V.; LORSCH, J. R.; HELLEN, C. U. T. The mechanism of translation initiation in eukaryotes. In: MATHEWS, M. B.; SONENBERG, N.; HERSHEY, J. W. B. (Ed.). **Translational control in biology and medicine**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2007. v. 1, cap. 4, p. 87-128.

PILKINGTON, G. R.; PARKER, R. Pat1 contains distinct functional domains that promote P-body assembly and activation of decapping. **Mol. Cell. Biol.**, v. 28, n. 4, p. 1298-1312, 2008.

REIJNS, M. A.; ALEXANDER, R. D.; SPILLER, M. P.; BEGGS, J. D. A role for Q/N-rich aggregation-prone regions in P-body localization. **J. Cell Sci.**, v. 121, n. Pt 15, p. 2463-2472, 2008.

ROSORIUS, O.; REICHART, B.; KRATZER, F.; HEGER, P.; DABAUVALLE, M. C.; HAUBER, J. Nuclear pore localization and nucleocytoplasmic transport of eIF-5A: evidence for direct interaction with the export receptor CRM1. **J. Cell Sci.**, v. 112, n. Pt 14, p. 2369-2380, 1999.

RUHL, M.; HIMMELSPACH, M.; BAHR, G. M.; HAMMERSCHMID, F.; JAKSCHE, H.; WOLFF, B.; ASCHAUER, H.; FARRINGTON, G. K.; PROBST, H.; BEVEC, D.; HAUBER, J. 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.

SAINI, P.; EYLER, D. E.; GREEN, R.; DEVER, T. E. Hypusine-containing protein eIF5A promotes translation elongation. **Nature**, v. 459, n. 7243, p. 118-121, 2009.

SALAS-MARCO, J.; BEDWELL, D. M. GTP hydrolysis by eRF3 facilitates stop codon decoding during eukaryotic translation termination. **Mol. Cell. Biol.**, v. 24, n. 17, p. 7769-7778, 2004.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **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.

SCHELLER, N.; RESA-INFANTE, P.; DE LA LUNA, S.; GALAO, R. P.; ALBRECHT, M.; KAESTNER, L.; LIPP, P.; LENGAUER, T.; MEYERHANS, A.; DíEZ, J. Identification of PatL1, a human homolog to yeast P body component Pat1. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1773, n. 12, p. 1786-1792, 2007.

SCHNEIDER-POETSCH, T.; JU, J.; EYLER, D. E.; DANG, Y.; BHAT, S.; MERRICK, W. C.; GREEN, R.; SHEN, B.; LIU, J. O. Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. **Nat. Chem. Biol.**, v. 6, n. 3, p. 209-217, 2010.

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.; LOTTSPREICH, 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.

SCHWARTZ, D. C.; PARKER, R. Mutations in translation initiation factors lead to increased rates of deadenylation and decapping of mRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.**, v. 19, n. 8, p. 5247-5256, 1999.

SCHWARTZ, D. C.; PARKER, R. mRNA decapping in yeast requires dissociation of the cap binding protein, eukaryotic translation initiation factor 4E. **Mol. Cell. Biol.**, v. 20, n. 21, p. 7933-7942, 2000.

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.

SEGAL, S. P.; DUNCKLEY, T.; PARKER, R. Sbp1p affects translational repression and decapping in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.**, v. 26, n. 13, p. 5120-5130, 2006.

SHETH, U.; PARKER, R. Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. **Science**, v. 300, n. 5620, p. 805-808, 2003.

SHETH, U.; PARKER, R. Targeting of aberrant mRNAs to cytoplasmic processing bodies. **Cell**, v. 125, n. 6, p. 1095-1109, 2006.

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.

SIKORSKI, R. S.; HIETER, P. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 122, n. 1, p. 19-27, 1989.

SONENBERG, N.; HINNEBUSCH, A. G. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 731-745, 2009.

SWEET, T. J.; BOYER, B.; HU, W.; BAKER, K. E.; COLLIER, J. Microtubule disruption stimulates P-body formation. **RNA**, v. 13, n. 4, p. 493-502, 2007.

SWISHER, K. D.; PARKER, R. Localization to, and effects of Pbp1, Pbp4, Lsm12, Dhh1, and Pab1 on stress granules in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS One**, v. 5, n. 4, p. e10006, 2010.

TAYLOR, D. J.; FRANK, J.; KINZY, T. G. Structure and function of the eukaryotic ribosome and elongation factors. In: MATHEWS, M. B.; SONENBERG, N.; HERSHEY, J. W. B. (Ed.). **Translational control in biology and medicine**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2007. v. 1, cap. 3, p. 59-86.

TAYLOR, D. J.; DEVKOTA, B.; HUANG, A. D.; TOPF, M.; NARAYANAN, E.; SALI, A.; HARVEY, S. C.; FRANK, J. Comprehensive molecular structure of the eukaryotic ribosome. **Structure**, v. 17, n. 12, p. 1591-1604, 2009.

TEIXEIRA, D.; PARKER, R. Analysis of P-body assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Biol. Cell**, v. 18, n. 6, p. 2274-2287, 2007.

TEIXEIRA, D.; SHETH, U.; VALENCIA-SANCHEZ, M. A.; BRENGUES, M.; PARKER, R. Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. **RNA**, v. 11, n. 4, p. 371-382, 2005.

THARUN, S.; PARKER, R. Targeting an mRNA for decapping: displacement of translation factors and association of the Lsm1p-7p complex on deadenylated yeast mRNAs. **Mol. Cell**, v. 8, n. 5, p. 1075-1083, 2001.

THARUN, S.; HE, W.; MAYES, A. E.; LENNERTZ, P.; BEGGS, J. D.; PARKER, R. Yeast Sm-like proteins function in mRNA decapping and decay. **Nature**, v. 404, n. 6777, p. 515-518, 2000.

THOMAS, M. G.; LOSCHI, M.; DESBATS, M. A.; BOCCACCIO, G. L. RNA granules: the good, the bad and the ugly. **Cell Signal**, v. 23, n. 2, p. 324-334, 2011.

TONG, Y.; PARK, I.; HONG, B. S.; NEDYALKOVA, L.; TEMPEL, W.; PARK, H. W. Crystal structure of human eIF5A1: insight into functional similarity of human eIF5A1 and eIF5A2. **Proteins**, v. 75, n. 4, p. 1040-1045, 2009.

TRIANA-ALONSO, F. J.; CHAKRABURTTY, K.; NIERHAUS, K. H. The elongation factor 3 unique in higher fungi and essential for protein biosynthesis is an E site factor. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 35, p. 20473-20478, 1995.

TUCKER, M.; VALENCIA-SANCHEZ, M. A.; STAPLES, R. R.; CHEN, J.; DENIS, C. L.; PARKER, R. The transcription factor associated Ccr4 and Caf1 proteins are components of the major cytoplasmic mRNA deadenylase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Cell**, v. 104, n. 3, p. 377-386, 2001.

UNTERHOLZNER, L.; IZAURRALDE, E. SMG7 acts as a molecular link between mRNA surveillance and mRNA decay. **Mol. Cell**, v. 16, n. 4, p. 587-596, 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.

VAN DIJK, E.; LE HIR, H.; SÉRAPHIN, B. DcpS can act in the 5'-3' mRNA decay pathway in addition to the 3'-5' pathway. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 100, n. 21, p. 12081-12086, 2003.

VAN DIJK, E.; COUGOT, N.; MEYER, S.; BABAJKO, S.; WAHLE, E.; SÉRAPHIN, B. Human Dcp2: a catalytically active mRNA decapping enzyme located in specific cytoplasmic structures. **EMBO J.**, v. 21, n. 24, p. 6915-6924, 2002.

VASUDEVAN, S.; PELTZ, S. W. Regulated ARE-mediated mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell**, v. 7, n. 6, p. 1191-1200, 2001.

WILUSZ, C. J.; WILUSZ, J. Bringing the role of mRNA decay in the control of gene expression into focus. **Trends Genet.**, v. 20, n. 10, p. 491-497, 2004.

WILUSZ, C. J.; WORMINGTON, M.; PELTZ, S. W. The cap-to-tail guide to mRNA turnover. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 2, n. 4, p. 237-246, 2001.

WOHL, T.; BAUR, M.; FRIEDL, A. A.; LOTTSPEICH, 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.; LOTTSPEICH, 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.

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, n. 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.

YU, J. H.; YANG, W. H.; GULICK, T.; BLOCH, K. D.; BLOCH, D. B. Ge-1 is a central component of the mammalian cytoplasmic mRNA processing body. **RNA**, v. 11, n. 12, p. 1795-1802, 2005.

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.; 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.

ZHANG, Z.; ZHOU, L.; HU, L.; ZHU, Y.; XU, H.; LIU, Y.; CHEN, X.; YI, X.; KONG, X.; HURST, L. D. Nonsense-mediated decay targets have multiple sequence-related features that can inhibit translation. **Mol. Syst. Biol.**, v. 6, p. 442, 2010.

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



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

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

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

Ana P.B. Gregio, Veridiana P.S. Cano, Juliana S. Avaca, Sandro R. Valentini, Cleslei F. Zanelli^a^a Department of Biological Sciences, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University – UNESP, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Rodovia Araraquara-Jd. Am. 01, Araraquara, SP 14801-902, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 20 January 2009
Available online 29 January 2009

Keywords:
eIF5A
Translation elongation
eIF2
Ribosome transit time
EF-3
Hypusine

ABSTRACT

The putative translation factor eIF5A is essential for cell viability and is highly conserved throughout evolution. Here, we describe genetic interactions between an eIF5A mutant and a translation initiation mutant (eIF4E) or a translation elongation mutant (eIF2). Polysome profile analysis of single and double mutants revealed that mutation in eIF5A reduces polysome run-off, contrarily to translation-initiation mutants. Moreover, the polysome profile of an eIF5A mutant alone is very similar to that of a translation elongation mutant. Furthermore, depletion of eIF5A causes a significant decrease in total protein synthesis and an increase of the average ribosome transit time. Finally, we demonstrate that the formation of P bodies is inhibited in an eIF5A mutant, similarly to the effect of the translation elongation inhibitor cycloheximide. Taken together, these results not only reinforce a role for eIF5A in translation but also strongly support a function for eIF5A in the elongation step of protein synthesis.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

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

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

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

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

Herein, we describe the genetic interactions of the eIF5A mutant *tf51A-3* with the translation initiation mutant *cdc33-42* (eIF4E) and with the translation elongation mutant *eft2^{ts100}* (eIF2). Polysome profile analysis of single and double mutants revealed that mutation in eIF5A reduces polysome run-off and the polysome profile of eIF5A mutant alone is very similar to that of *eft2^{ts100}*. Furthermore, depletion of eIF5A causes a reduction in the total protein synthesis and an increase in the average time necessary for ribosomes to transit along mRNAs. Finally, we have shown that formation of P bodies is impaired in the *tf51A-3* mutant at the restrictive temperature, similarly to the effect of cycloheximide [21]. These results support a role for eIF5A in translation, as previously proposed [10], and suggest that this factor may function in translation elongation instead of initiation.

Materials and methods

Yeast strains, plasmids and standard procedures. Procedures for cell growth and genetic manipulations were carried out according to standard protocols [11]. *Saccharomyces cerevisiae* strains used in this work are listed in Table 1. The plasmid expressing *eft2^{ts100}* has been described previously [12]. The double mutant *cdc33-42 tf51A-3* was obtained after crossing the single mutant strains VZL347 and VZL447. Transformation of wild type or *tf51A-3* mutant with the plasmid expressing the dominant negative *eft2^{ts100}*

^a Corresponding author. Fax: +55 16 3301 6940.
E-mail address: zanelli@ffcr.unesp.br (C.F. Zanelli).

Table 1

Yeast strains used in this study.

Strain	Genotype	Source
VZL32	MAFa ade2 his3 leu2 trp1 ura3 <i>can1</i> <i>trf51A-3</i>	[25]
VZL73 (PSY1176)	MAFa leu2 ade2 ade3 ura3 <i>lys2 can1</i>	Pamela Silver
VZL82 (W303)	MAFa ade2 his3 leu2 trp1 ura3 <i>can1</i>	Pamela Silver
VZL114	MAFa leu2-3 ade2-1 ade3 his3-11-15 <i>trp1-1 trf51A-3</i>	[32]
VZL347	MAFa ade2 his3 <i>trp1 ura3 cdc33-42 TRP1 CEN</i>	[33]
VZL447	MAFa ade2 his3 leu2 trp1 ura3 <i>can1 trf51A-3-URA3</i>	Laboratory collection
VZL847	MAFa ade2 his3 <i>cdc33-LEU2 (cdc33-42 TRP1 CEN) trf51A-1-URA3</i>	This study

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

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

Protein synthesis measurement. Yeast strains carrying wild type (VZL82) or *trf51A-3* (VZL32) alleles were grown and processed as previously described [13].

Measurement of ribosome transit time. Yeast strains carrying wild type (VZL82) or *trf51A-3* (VZL32) alleles were grown in YPD liquid medium at 25 °C ($OD_{600\text{ nm}} = 0.2\text{--}0.5$). The cultures were then shifted to 38 °C. After 3 h incubation at the restrictive temperature, cells were pelleted by centrifugation at 17,000g for 5 min and pulsed-labeled with 12.5 $\mu\text{Ci/mL}$ of [³H]leucine (Perkin-Elmer/NEN). Aliquots were taken at regular intervals and the extracts were prepared in 0.1 mg/mL cycloheximide. The radioactive incorporation was measured in the total (postmitochondrial supernatants - PMS) and completed protein fractions (postribosomal supernatant - PRS) by liquid scintillation counting in a Beckman Scintillation Counter. The radioactivity at each time point is presented as a mean of three measurements. The corrected radioactivity of PMS and PRS were plotted as a function of time. Finally, the average transit time was determined from the displacement in time between the two lines corresponding to the PMS and PRS data, multiplied by 2.

Detection of cytoplasmic P bodies. Wild type (VZL73) and *trf51A-3* (VZL114) strains were transformed with the plasmid pRP1175 [14] containing DCP2-GFP. Transformants were grown in liquid media at 25 °C to $OD_{600\text{ nm}} = 0.6$ and half of the cells were shifted for 4 h to 38 °C. Cells were collected (16,000g for 1 min), washed once in PBS (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4 , adjusted to pH 7.4), resuspended in 1 mL PBS and incubated for 10 min at the appropriate temperature. As a control of P bodies disassembly, prior to PBS stress, wild type cells were treated with 0.1 mg/mL cycloheximide for 10 min. Dcp2-GFP was detected with a Nikon Eclipse TE300 fluorescence microscope.

3. Results and discussion

The eIF5A mutant trf51A-3 genetically interacts with the eIF4E mutant cdc33-42 and polysome profiles of single and double mutants suggest a role for eIF5A in translation elongation.

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

nants [10,13]. Since synthetic growth defects often occur among functionally related genes, we decided to use genetic interaction as a strategy to further understand the role played by eIF5A in translation. Interestingly, a combination of the *trf51A-3* mutant with the eIF4E mutant *cdc33-42* in the same haploid cell resulted in a more severe temperature-sensitive phenotype than that caused individually by the single mutants, revealing a synthetic sick phenotype (Fig. 1A). This result reinforces the involvement of eIF5A function in the protein synthesis process.

To investigate the functional effect of this genetic interaction affecting protein synthesis, we performed polysome profile analysis. Translation initiation mutants show a reduced translation initiation rate, resulting in a decrease in the polysome fraction (polysome run-off) and consequently an increase in the peak of free 80S ribosomes (monosomes) [15]. In contrast, mutants impaired in translation elongation are expected to show a decreased 80S peak, accompanied by an increase of the polysome fractions [16]. As shown in Fig. 1B, the polysome profile of the *trf51A-3* mutant at the restrictive temperature demonstrates a reduction in the 80S peak and an increase in polysome fractions, which is in agreement with our previously published data [10]. In fact, the experimental conditions used here were more stringent for polysome accumulation, distinguishing better the differences between wild type and *trf51A-3* mutant at the restrictive temperature. Conversely, the eIF4E mutant (*cdc33-42*) showed a polysome profile with an increase of the 80S peak and a remarkable decrease in the polysomes at the restrictive temperature. Curiously, the polysome profile of the *trf51A-3 cdc33-42* double mutant exhibits an increase of the 80S peak and a decrease in the polysomes at the restrictive temperature, relative to the wild type, but with a consistent lower intensity than the *cdc33-42* mutant alone.

These results clearly indicate that the defect in translation caused by mutations in initiation factors is clearly different from that seen in *trf51A-3* and, therefore, eIF5A may not function in the initiation step of protein synthesis. Taken together, the polysome profile of the *trf51A-3 cdc33-42* double mutant and the significant effect of the *trf51A-3* mutant alone on polysome accumulation suggest a role for eIF5A in the elongation step rather than in the initiation step of the translation process.

The eIF5A mutant trf51A-3 genetically interacts with the eEF2 dominant negative mutant eft2^{trp} and polysome profiles of single and double mutants strengthen a role for eIF5A in translation elongation.

We have also tested the possibility of a genetic interaction between the eIF5A mutant *trf51A-3* and the eEF2 dominant negative mutant *eft2^{trp}* and, once again, a synthetic sick interaction was revealed (Fig. 2A). However, it is important to note that the reduction in cell growth that occurred in the *trf51A-3 eft2^{trp}* double mutant is considerably more intense than that observed for the *trf51A-3 cdc33-42* double mutant (compare Figs. 1A and 2A at 25 °C). Therefore, this genetic interaction not only supports a function for eIF5A in translation but also suggests a role for eIF5A more closely related to the elongation step of protein synthesis.

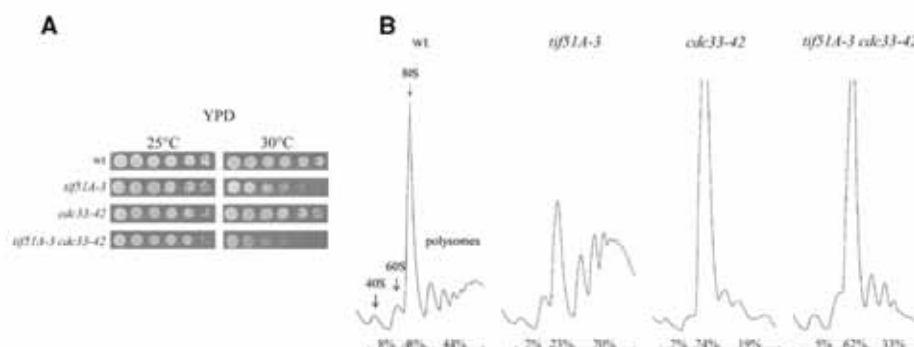


Fig. 1. Synthetic genetic interaction between *tif51A-3* and *cdc33-42* and polysome profile analysis of single and double mutants. (A) Tenfold serial dilutions of wild type, parental (*tif51A-3* or *cdc33-42*) and double mutant (*tif51A-3 cdc33-42*) strains were plated onto YPD plates to determine growth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

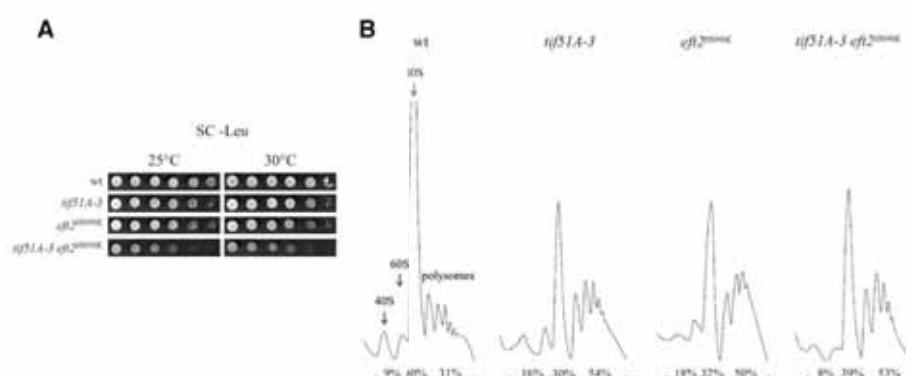


Fig. 2. Synthetic genetic interaction between *tif51A-3* and *eef2^{ts1000}*, polysome profile analysis of single and double mutants and sensitivity of *tif51A-3* mutant to translation elongation inhibitors. (A) Tenfold serial dilutions of the wild type, *tif51A-3*, *eef2^{ts1000}* and double mutant strains were grown for 3–4 days on SC-Leu plates at 25 °C or 30 °C. (B) Extracts prepared from the same strains were fractionated by centrifugation in a sucrose density gradient. Optical scans ($OD_{254\text{ nm}}$) of the gradients are shown.

Polysome profile analysis was also used to evaluate the effect of the combination of the *eIF5A* and *eEF2* mutants on translation. As shown in Fig. 2B, the strains carrying the *tif51A-3* or the *eef2^{ts1000}* mutants show an increased percentage of polysomes and a decreased 80S peak, compared to the wild type. This similarity between the polysome profiles of *eIF5A* and *eEF2* single mutants is in agreement with a role for *eIF5A* in translation elongation. Finally, the *tif51A-3 eef2^{ts1000}* double mutant also shows a polysome profile very similar to the results for either *eIF5A* or *eEF2* single mutants, suggesting a close functional relationship between *eIF5A* and *eEF2*.

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

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

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

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

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

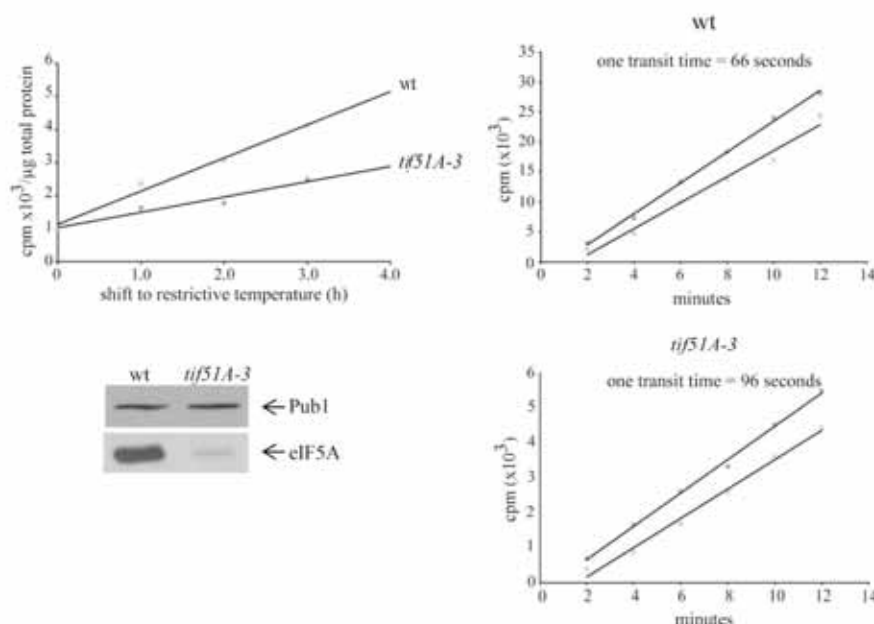


Fig. 3. Effect of eIF5A depletion on protein synthesis rate and ribosome transit time. (A) Wild type and *tif51A-3* mutant strains were grown to mid-log phase at 25 °C in YPD. $[^3\text{H}]$ leucine was added to the medium and cells were incubated at 25 °C for 1 h. After collecting the initial aliquots,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

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

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

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

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

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

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

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

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

The results presented herein strongly suggest a role for eIF5A in translation after the initiation step, which could be similar to that played by EF-P. On the other hand, the similarities between polysome profiles of eIF5A and eIF2 mutants and the fact that eIF5A mutants are affected by translation elongation inhibitors in a broader manner [10] (data not shown), like general translation elongation mutants [12,31], support a function for eIF5A in the several rounds of peptide bond formation during polypeptide elongation.

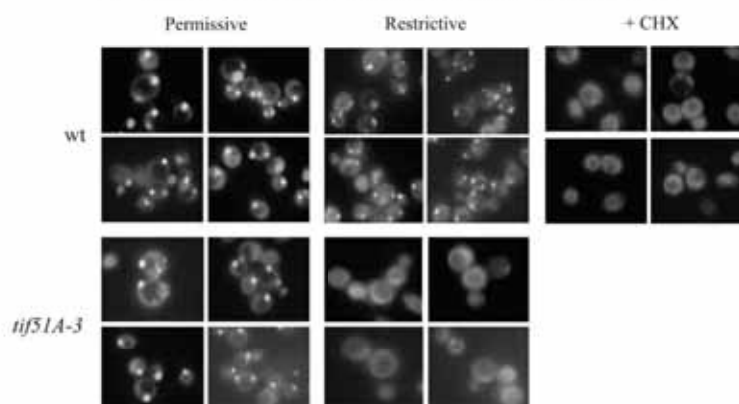


Fig. 4. Effect of eIF5A depletion on accumulation of P bodies. The wild type and *tif51A-3* mutant strains expressing Dcp2-GFP were grown in glucose synthetic medium, at the permissive (25 °C) and non-permissive (38 °C) temperatures, as indicated, followed by PBS treatment (without glucose) to induce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

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

Acknowledgments

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

References

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

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