



eIF5A: uma proteína essencial para a viabilidade celular cuja função permanece obscura

Frigieri, M.C.¹; Cano, V.S.P.¹; Apponi, L.H.¹; Dias, C.A.O.¹; Gregio, A.P.B.¹; João-Luiz, M.V.S.¹; Silveira, W.S.¹; Zanelli, C.F.¹; Valentini, S.R.^{1*}

¹Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Araraquara, SP, Brasil

Recebido 05/04/07 / Aceito 10/05/07

RESUMO

O provável fator de início de tradução 5A (eIF5A) é uma proteína abundante e altamente conservada em todos os organismos eucarióticos observados e também está presente em arqueobactérias. eIF5A é essencial para a viabilidade celular e esse fator é a única proteína descrita que contém o resíduo de aminoácido hipusina. Em *Saccharomyces cerevisiae*, eIF5A é expressa em condições aeróbicas pelo gene *TIF51A*. Apesar de eIF5A ser conhecida há quase 30 anos, a sua função biológica ainda é obscura. Este artigo revisa os estudos de caracterização funcional de eIF5A, evidenciando como esse fator foi envolvido com diferentes etapas do metabolismo de RNA mensageiro (mRNA), como o início de tradução, o transporte nucleocitoplasmático e o decaimento de RNA mensageiro. Ainda, estudos que evidenciaram o envolvimento de eIF5A com a proliferação celular e progressão no ciclo celular também foram abordados. Finalmente, esse artigo apresenta os resultados recentes dos experimentos que colocam eIF5A novamente no cenário da tradução. Novos experimentos serão necessários para definir o papel desempenhado por eIF5A na maquinaria de tradução.

Palavras-chave: eIF5A; tradução; proliferação celular; hipusina; síntese protéica

INTRODUÇÃO

O entendimento da função de fatores altamente conservados e que são essenciais para a viabilidade celular tem-se mostrado de grande importância para a compreensão dos processos biológicos que ocorrem em uma célula. O provável fator de início de tradução de eucariotos 5A (eIF5A - eukaryotic translation initiation factor 5A) é um destes fatores.

eIF5A é altamente conservado de arqueobactérias a eucariotos, sendo que as proteínas eIF5A de *Saccharomyces cerevisiae* e de mamíferos são 63% idênticas (Schnier et al., 1991; Chen & Liu, 1997). No entanto, eIF5A não é

encontrado em eubactérias, as quais possuem o homólogo estrutural EF-P, um provável fator de alongação de tradução (Hanawa-Suetsugu et al., 2004).

Em *Saccharomyces cerevisiae*, eIF5A é codificada por dois genes homólogos, *TIF51A* (*HYP2*) e *TIF51B* (*HYP1*). Leveduras em condições aeróbicas expressam somente *TIF51A*, e em condições anaeróbicas expressam *TIF51B* (Schnier et al., 1991; Kang et al., 1993; Tome & Gerner, 1997). *TIF51A* é essencial para o crescimento em condições aeróbicas conforme mostrado por diferentes autores (Schnier et al., 1991; Wohl et al., 1993), inclusive nosso grupo (Valentini et al., 2002). As proteínas codificadas pelos dois genes de *S. cerevisiae* são altamente similares, compartilhando 90% de identidade. Em humanos, eIF5A é codificada por EIF5A1 e EIF5A2 (Jenkins et al., 2001). Esses dois genes possuem 84% de identidade e são diferencialmente transcritos em diferentes tecidos e em algumas linhagens de células tumorais (Park, 2006). Ainda, a proteína humana substitui completamente a proteína de levedura. Este fato mostra que eIF5A humana e de levedura não são apenas conservadas, mas são funcionalmente intercambiáveis *in vivo* (Schwelberger et al., 1993).

eIF5A possui 17KDa e sofre duas modificações pós-traducionais. A primeira delas consiste na fosforilação de um resíduo de serina acetilado no N-terminal. Inicialmente, essa modificação foi considerada muito interessante, pois várias proteínas conhecidas apresentam suas atividades reguladas por fosforilação, por exemplo os fatores de início de tradução eIF2 e eIF4 (Kang et al., 1993). No entanto, foi demonstrado que esta fosforilação não é essencial para a função *in vivo* de eIF5A (Kang et al., 1993; Klier et al., 1993). Dessa forma, a importância fisiológica da fosforilação de eIF5A ainda não está elucidada.

eIF5A também sofre uma segunda modificação pós-traducional incomum, conhecida como hipusinação. Essa modificação ocorre em duas etapas. Inicialmente, a enzima desoxi-hipusina sintase transfere a parte aminobutil da poliamina espermidina para o aminogruppo de um resíduo específico de lisina para formar desoxi-hipusina. A seguir, uma outra enzima, chamada desoxi-hipusina hidroxilase, termina a formação do aminoácido hipusina e a maturação

*Autor Correspondente: Sandro Roberto Valentini - Departamento de Ciências Biológicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual Paulista - UNESP - Rodovia Araraquara-Jaú, km 1 - CEP: 14801-902 - Araraquara - SP - Brasil - Telefone: 55 16 3301-6954 - Fax: 55 16 3301-6940 - e-mail: valentsr@fcar.unesp.br

de eIF5A (Schnier et al., 1991; Kang et al., 1993; Klier et al., 1993; Park et al., 1993a; Abid et al., 1997; Chen & Liu, 1997). O termo hipusina foi originado a partir da relação com dois compostos: hidroxiputrescina e lisina (Park et al., 1993a). O resíduo de lisina é modificado logo após a proteína eIF5A ser sintetizada, e o aminoácido hipusina não é alterado ou removido até que a proteína seja degradada, revelando a irreversibilidade de tal reação (Park et al., 1993b).

Nas diferentes espécies, eIF5A é encontrada de forma altamente conservada, principalmente nas regiões da proteína flanqueadoras do sítio de hipusinação. Essa região conservada é formada por uma sequência de doze resíduos de aminoácidos: STSKTG-**hipusina**-HGHA (Park et al., 1993b, Magdolen et al., 1994; Chen & Liu, 1997). A hipusinação é essencial para a atividade da proteína eIF5A, pois foi verificado que eIF5A humana recombinante, não hipusinada, é incapaz de estimular a síntese proteica *in vitro* (Smit-McBride et al., 1989). Entretanto, quando este precursor é modificado *in vitro* para a forma hipusinada, a proteína resultante se torna ativa neste ensaio (Park, 1989). Ainda, células onde a hipusinação foi bloqueada, por substituição da lisina alvo (K51R) ou deleção do gene que codifica para desoxi-hipusina sintase, tornaram-se inviáveis (Schnier et al., 1991). A enzima desoxi-hipusina sintase apresenta uma sequência de aminoácido altamente conservada, e as enzimas de diferentes espécies possuem propriedades catalíticas similares (Kang et al., 1995). O gene codificador da enzima desoxi-hipusina sintase é essencial para o crescimento de *S. cerevisiae* (Sasaki et al., 1996; Park et al., 1997). Curiosamente, a etapa da hidroxilação parece não estar presente em várias arqueobactérias (Bartig et al., 1990). Nosso grupo demonstrou que o gene que codifica a enzima desoxi-hipusina hidroxilase não é essencial para o crescimento em *S. cerevisiae* (Thompson et al., 2003). No caso de *S. pombe*, a deleção do gene para desoxi-hipusina hidroxilase causa sensibilidade a temperatura (Weir & Yaffe, 2004). Estes dados mostram que a hipusinação ou, ao menos sua primeira etapa, é essencial para a função *in vivo* de eIF5A. O fato de eIF5A ser a única proteína eucariótica que sofre hipusinação fortalece a idéia de que este fator seja de fundamental importância no metabolismo celular.

As estruturas tridimensionais de homólogos de eIF5A de três espécies de arqueobactérias (Kim et al., 1998; Peat et al., 1998; Yao et al., 2003) e, mais recentemente, de dois protozoários (código PDB 1XTD e 1X6O), foram determinadas e revelaram várias características comuns. 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". Esse dobramento também está presente em várias proteínas ribossomais e fatores de alongação de tradução (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 (Gough et al., 2001). De fato, dois estudos publicados recentemente tentam correlacionar a função de eIF5A com a ligação a mRNAs, porém tais estudos ainda necessitam ser ampliados para se estabelecer um papel biológico de eIF5A na interação física direta com mRNAs (Xu & Chen, 2001; Xu et al., 2004).

Caracterização inicial de eIF5A como fator de início de tradução

eIF5A foi originalmente purificada a partir de ribossomos de lisados de reticulócitos de coelho e, subsequentemente, foi determinado como fator de início de tradução de eucariotos devido a sua capacidade de estimular de 2 a 3 vezes a síntese *in vitro* de metionil-puomicina (Kemper et al., 1976; Benne & Hershey, 1978).

O início da tradução em eucariotos é uma etapa complexa da síntese proteica e do processo da expressão gênica de uma maneira geral, sendo amplamente regulado na célula (Pestova et al., 2001). O início de tradução em eucariotos compreende uma série de passos, subsequentes e paralelos, que levam à montagem de um ribossomo com um mRNA, o qual, por sua vez, precisa estar corretamente posicionado com seu códon iniciador, comumente AUG, interagindo com o anti-códon de um Met-tRNA_i no sítio ribossomal P. O antibiótico puomicina é um análogo estrutural da extremidade 3' de um tRNA aminoacilado e pode ocupar o sítio ribossomal A, possibilitando que seu radical amino primário reaja com um Met-tRNA_i, reproduzindo a formação de uma ligação peptídica. O ensaio de metionil-puomicina mede a incorporação de metionina radioativa, a partir de Met-tRNA_i, à puomicina, 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-puomicina *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, assim, de resultados obtidos na ausência dos outros fatores de início de tradução eIF1, eIF1A, eIF3, eIF5B e eIF5, também testados (Benne & Hershey, 1978). 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 alongação da tradução também foi considerada, mas nenhum efeito positivo foi observado com a adição de eIF5A em um sistema de síntese proteica para polimerização de poli-fenilalanina a partir de ácido poli-uridílico, e ribossomos 80S e fatores de alongação eEF1 e eEF2 purificados (Benne & Hershey, 1978).

No entanto, o envolvimento de eIF5A na síntese proteica de forma geral foi questionado. Um estudo mostrou que a inibição da maturação funcional de eIF5A não se correlaciona a uma repressão da tradução em células de

mamífero (Duncan & Hershey, 1986). Em *S. cerevisiae*, foi avaliado o efeito promovido na tradução pela depleção de eIF5A (Kang & Hershey, 1994). Os autores utilizaram uma levedura possuindo as cópias cromossômicas dos genes *TIF51A* e *TIF51B* nocauteadas, e mantida com uma construção plasmidial contendo o gene *TIF51A* sob o controle de promotor regulável por galactose. Quando a expressão do gene *TIF51A* foi desligada pela transferência da cultura para meio contendo glicose, as proteínas eIF5A produzidas previamente em fusão com elementos desestabilizadores foram rapidamente direcionadas para a degradação durante a primeira geração. A análise da taxa de síntese protéica, durante a rápida depleção de eIF5A, revelou uma diminuição de apenas 30% na síntese protéica total. Ainda, o estudo de um mutante temperatura-sensível de eIF5A que causa instabilidade da proteína na temperatura não permissiva revelou um pequeno efeito de eIF5A na síntese protéica (Zuk & Jacobson, 1998). Esses dados comprometeram a definição de eIF5A como um fator geral de início de tradução em eucariotos. Entretanto, foi proposto que este fator poderia estar envolvido na tradução de mRNAs específicos, provavelmente mRNAs que codificam proteínas envolvidas na progressão do ciclo celular, uma vez que eIF5A também está envolvido com proliferação celular (Kang & Hershey, 1994; Park et al., 1997).

Procurando novas funções para eIF5A

Apesar de eIF5A ter sido denominada inicialmente um fator de início de tradução, a sua função como tal nunca foi claramente demonstrada. Assim, outros estudos procuraram avaliar a relação de eIF5A com outros processos celulares.

eIF5A e o transporte nucleocitoplasmático

eIF5A foi associada com o trânsito de macromoléculas através do poro nuclear por diversos autores. Como é conhecido, os RNA mensageiros celulares devem sofrer processamento ("splicing") antes de serem transportados para o citoplasma. Alguns RNA mensageiros de HIV-1 não são processados ou são parcialmente processados, e devem atingir o citoplasma para garantir o ciclo de replicação viral (Cullen, 1992). A exportação nuclear desses transcritos virais depende da proteína regulatória *rev*, que é produzida a partir de um transcrito viral processado e, portanto, exportado naturalmente pela maquinaria de exportação nuclear da célula. Com o acúmulo de *rev* no núcleo, essa proteína se liga à região específica chamada RRE ("Rev responsive element") dos transcritos virais não processados ou parcialmente processados. Subsequentemente, esse complexo deve interagir com um ou mais fatores celulares (cofatores) para permitir a exportação dos RNAs virais para o citoplasma (Cullen, 1992). Neste caso, o complexo Rev/RRE interage com o receptor CRM1/exportina 1, que reconhece proteínas contendo NES - "nuclear export sequence" (Cullen, 1992;

Fornerod et al., 1997; Neville et al., 1997). Utilizando experimentos de "cross-linking" e um peptídeo correspondente a um domínio de *rev* de HIV-1, foi possível detectar uma proteína de aproximadamente 18 kDa que se liga a *rev* em células HeLa. Esta proteína foi então purificada e sequenciada, revelando ser eIF5A, que passou a ser considerada um cofator da proteína *rev* (Ruhl et al., 1993). Ainda, experimentos empregando microinjeção de eIF5A em diferentes compartimentos subcelulares de células HeLa revelaram a capacidade deste fator ser importado e exportado do núcleo (Bevec & Hauber, 1997). O mesmo grupo de pesquisa, utilizando imunofluorescência e microscopia eletrônica, mostraram que eIF5A acumula-se nos filamentos do complexo do poro nuclear de oócitos de *Xenopus sp* (Rosorius et al., 1999). Ensaio de copurificação e "overlay" revelaram que eIF5A interage fisicamente com CRM1/exportina 1 (Rosorius et al., 1999). Adicionalmente, foi mostrado que eIF5A interage com algumas nucleoporinas (CAN/nup214, nup153, nup98 e nup62) e com actina, que associada aos filamentos nucleocitoplasmáticos do complexo do poro nuclear estaria envolvida no processo de exportação nuclear (Hofmann et al., 2001). Entretanto, foi mostrado que eIF5A apresenta uma ligação com CRM1/exportina 1 muito mais fraca que aquela observada com exportina 4 de mamífero (Lipowsky et al., 2000). Este resultado claramente contradiz a hipótese de CRM1/exportina 1 ser o mediador do transporte de eIF5A através do complexo do poro nuclear (Rosorius et al., 1999). Além disso, a ausência de exportina 4 provoca um acúmulo de eIF5A no nucléolo. Esse acúmulo no nucléolo poderia acarretar uma interação de eIF5A com partículas pré-ribossômicas, interferindo com a biogênese dos ribossomos. Dessa forma, a exportina 4 poderia mediar a exportação de eIF5A e, assim, evitar problemas com a biogênese dos ribossomos (Lipowsky et al., 2000). Esta interação com exportina 4 não desvincula eIF5A do trânsito através do poro nuclear, mas sugere que este fator não esteja envolvido com a exportação dos transcritos tardios de HIV-1 através de CRM1/exportina 1.

O envolvimento de eIF5A com o trânsito de macromoléculas através do poro nuclear foi questionado por diversos autores. Uma análise de localização subcelular mais detalhada utilizando diferentes linhagens de células de mamíferos revelou que Rev, produzida transientemente, está localizada no núcleo, e que eIF5A apresenta uma localização citoplasmática que coincide com a do retículo endoplasmático (Shi et al., 1996). Ainda, o tratamento com inibidores de transcrição alterou completamente a localização subcelular de Rev e não interferiu com aquela de eIF5A. Por outro lado, inibidores de tradução, não afetaram a localização de Rev, mas alteraram a citolocalização de eIF5A (Shi et al., 1997). Esses dados sugerem que eIF5A não sofre translocação nucleocitoplasmática como ocorre com Rev. Experimentos em levedura realizados em nosso laboratório revelaram que eIF5A apresenta uma localização citoplasmática com maior concentração perinuclear (Valentini et al., 2002), confirmando os dados de localização obtidos em células de mamíferos (Shi et al., 1996). Diferentemente do que ocorre

com a proteína Rev de HIV-1 produzida em levedura, a localização perinuclear de eIF5A não é alterada no mutante contendo um alelo temperatura-sensível de *XPO1*, gene para CRM1/exportina 1 em leveduras, na temperatura não permissiva. Desta forma, os dados obtidos em nosso laboratório associam eIF5A com o retículo endoplasmático, e também questiona o envolvimento de eIF5A com a exportação de proteínas contendo NES através do receptor CRM1/exportina 1 (Valentini et al., 2002). Finalmente, se eIF5A está envolvida com transporte nucleocitoplasmático, essa seria uma função secundária para esse fator, pois deve ser lembrado que eIF5A é encontrado em arqueobactérias, as quais são anucleadas.

eIF5A e a degradação de mRNA

eIF5A também foi envolvida na degradação de mRNA. A primeira evidência surgiu em um rastreamento de leveduras temperatura-sensíveis que apresentavam o fenótipo de estabilização de mRNAs na temperatura não permissiva (Zuk & Jacobson, 1998). Neste trabalho, foi mostrado que o mutante denominado ts1159 acumula mRNAs sem o capacete de 7-metil-guanosina na temperatura não permissiva, sugerindo que eIF5A esteja atuando no processo de degradação de mRNA após o processo de retirada deste capacete (Zuk & Jacobson, 1998).

Três novos mutantes condicionais de *S. cerevisiae* para o gene *TIF51A* (*tif51A-1*, *tif51A-2* e *tif51A-3*) foram descritos e caracterizados por nosso grupo (Valentini et al., 2002). A caracterização destes alelos de *TIF51A* mostrou que todos são mutantes temperatura-sensíveis com perda de função na temperatura não permissiva devido à rápida degradação de eIF5A (Valentini et al., 2002; C.A.O. Dias e outros, resultados não publicados). Esses mutantes também acumulam mRNA na temperatura não permissiva. Entretanto, os nossos resultados sugerem que esse possível papel de eIF5A seja secundário, pois o fenótipo de inibição do crescimento não se correlaciona com o defeito na degradação de RNA mensageiros (Valentini et al., 2002).

eIF5A e a proliferação celular

O envolvimento de eIF5A na proliferação celular foi sugerido após a observação de que a inibição de qualquer etapa da biossíntese de eIF5A resulta no bloqueio da proliferação celular (Schnier et al., 1991; Park et al., 1993a; Shi et al., 1996; Park et al., 1997). A inibição da desoxi-hipusina sintase ou desoxi-hipusina hidroxilase representa uma forma muito importante para o estudo da hipusinação e do papel biológico dessa modificação pós-traducional. Dessa forma, uma grande variedade de compostos estruturalmente relacionados à espermidina foram desenvolvidos como inibidores da desoxi-hipusina sintase (Jakus et al., 1993). Entre esses, o inibidor mais potente é o 1-amino-7-guanidino heptano (GC7). Esse inibidor é ativamente capturado pelo sistema de transporte de poliaminas e causa uma inibição efetiva na formação de hipusina de células CHO (Park et al.,

1994). Além disso, esse composto apresenta efeitos antiproliferativos nestas células e em outras células de mamíferos, incluindo linhagens tumorais (Park et al., 1994; Shi et al., 1996; Chen & Liu, 1997). A mimosina é um quelante de metais e inibe a desoxi-hipusina hidroxilase (Hanuske-Abel et al., 1994). A utilização desse composto causa uma parada do ciclo celular na transição G1/S em células de origem tumoral, sugerindo que eIF5A esteja envolvido na expressão de um conjunto de proteínas críticas para a progressão do ciclo celular (Hanuske-Abel et al., 1994; Kang & Hershey, 1994; Park et al., 1997). Entretanto, essa observação deve ser interpretada com cuidado pois mimosina interfere também com outros processos celulares, como por exemplo no metabolismo de desoxirribonucleotídeos (Gilbert et al., 1995). A inibição da proliferação celular por inibidores de desoxi-hipusina sintase ou desoxi-hipusina hidroxilase está de acordo com a hipótese de que cada etapa dessa modificação pós-traducional é requerida para a atividade biológica de eIF5A e para a proliferação de células eucarióticas.

Apesar de a possibilidade desses inibidores colaborarem inespecificamente para o bloqueio da proliferação celular, um outro dado em *S. cerevisiae* reforça o envolvimento de eIF5A na progressão G1/S do ciclo celular. Nesse estudo, foi verificado que a depleção de eIF5A provoca um aumento de células paradas na fase G1 do ciclo celular (Kang & Hershey, 1994). Ainda, o envolvimento de eIF5A com proliferação celular foi demonstrado em experimentos envolvendo a ativação de linfócitos T (Bevec et al., 1994). Outro dado que reforça essa idéia é que a formação de hipusina radioativa neste fator é intensificada em linfócitos estimulados por mitógenos, o que não acontece em células em G0 (Cooper et al., 1982). Experimentos utilizando *Drosophila melanogaster* mostraram uma perda do controle do ciclo celular no início do desenvolvimento embrionário desse inseto em consequência da alteração dos níveis de eIF5A (Lee et al., 2001).

Experimentos realizados em nosso laboratório mostraram, em *S. cerevisiae*, que a parada de crescimento do mutante temperatura-sensível *tif51A-1* é suprimida pela expressão em alto número de cópias de genes envolvidos na integridade celular e polimerização do citoesqueleto de actina. Os mesmos supressores foram capazes de corrigir parcialmente o defeito no citoesqueleto de actina na temperatura não permissiva dos mutantes *tif51A-1* e *tif51A-3* (Zanelli & Valentini, 2005). O envolvimento de eIF5A na progressão do ciclo celular em leveduras foi confirmado utilizando o mutante temperatura-sensível tsL102A (Chartterjee et al., 2006). Ainda, o nosso laboratório revelou recentemente o gene essencial *YPT1*, como letal sintético do mutante temperatura-sensível *tif51A-3* (M.C. Frigieri e outros, dados não publicados). *YPT1* codifica uma Ypt-GTPase essencial para o transporte vesicular entre retículo endoplasmático e Golgi. Neste estudo, é sugerido que as proteínas eIF5A e Ypt1 trabalhem juntas na célula para permitir a síntese protéica apropriada e a secreção necessária para a formação do novo broto durante a fase G1/S. Pelo

exposto, resultados obtidos com diferentes abordagens e modelos de estudo apontam para um possível envolvimento de eIF5A com proliferação celular.

eIF5A: de volta ao processo de tradução

Resultados obtidos recentemente no nosso laboratório fortaleceram o envolvimento de eIF5A com tradução (Zanelli et al., 2006). Ensaios de co-purificação seguidos de identificação por espectrometria de massas revelaram que eIF5A interage com proteínas ribossomais (P0, S5 e L11) e com o fator de alongação de tradução 2 (eEF2), componentes da maquinaria de tradução. A ligação de eIF5A com os mesmos componentes não foi eficiente em um mutante onde não ocorre a hipusinação (eIF5A^{K51R}). Desta forma, é possível estabelecer uma correlação entre a função essencial de eIF5A e a sua associação com a maquinaria de tradução. Ainda, no mesmo trabalho foi mostrado que eIF5A interage especificamente com monossomos funcionalmente ativos. Resultados semelhantes de interação de eIF5A com ribossomos 80S e associação com perfil polissomal foram também publicados por outro laboratório (Jao & Chen, 2006).

Nossos estudos revelaram ainda defeitos no perfil polissomal para os mutantes temperatura-sensíveis *tif51A-1* e *tif51A-3*, na temperatura não permissiva (Zanelli et al., 2006). No entanto, os defeitos revelados não se parecem com aqueles obtidos para mutantes de início de tradução (Asano et al., 2000), mas são muito parecidos com os obtidos para um mutante de alongação da tradução, *ccal-1* (Peltz et al., 1992). Esse mutante apresenta um bloqueio na maturação de tRNA na temperatura não permissiva. Os resultados re-estabelecem uma função para eIF5A na tradução e sugerem a sua atuação na etapa de alongação ao invés do início de tradução, como sugerido nos experimentos iniciais de caracterização funcional de eIF5A. Outro dado que reforça a função de eIF5A na tradução é que os mutantes de *TIF51A* mostraram sensibilidade aos inibidores de síntese protéica paromomicina, esparsomicina e anisomicina. É interessante assinalar que, 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 arqueobactérias (Hanawa-Seutsugu et al., 2004). Além disto, a função de EF-P é especificamente afetada in vitro por inibidores da atividade peptidil-transferase (Aoki et al., 1997), analogamente à sensibilidade dos mutantes de *TIF51A* a esparsomicina e anisomicina (Zanelli et al., 2006). EF-P é essencial para a viabilidade celular e estimula a formação de metionil-puromicina. É importante lembrar que a parada da alongação da tradução leva à estabilização de mRNA (Wilusz et al., 2001), podendo justificar assim o efeito secundário de diminuição da degradação de mRNA nos mutantes de eIF5A conforme demonstrou nosso grupo (Valentini et al., 2002).

Novos resultados obtidos recentemente em nosso laboratório mostram que a associação de eIF5A com a membrana do retículo endoplasmático é dependente da ligação dos ribossomos (M.C. Frigieri e outros, dados não publicados). Esses dados fortalecem o papel de eIF5A na tradução. Novos experimentos deverão ser realizados para confirmar a importância de eIF5A na tradução e assim contribuir

para a elucidação definitiva da função dessa proteína essencial.

ABSTRACT

eIF5A: an essential protein for cell viability whose function remains obscure

The putative translation initiation factor 5A (eIF5A) is a highly abundant and conserved protein in all eukaryotes and archaeobacteria. This factor is essential for cell viability and is the only cellular protein known to contain the unusual amino acid residue hypusine. In *Saccharomyces cerevisiae* eIF5A is expressed in aerobic conditions by the gene *TIF51A*. Although eIF5A has been known for almost 30 years, the biological role of this protein is still obscure. This article reviews the research on the function of eIF5A, discussing the evidence for its involvement in various steps of mRNA metabolism, including translation initiation, nucleocytoplasmic transport and mRNA decay. Moreover, it indicates other studies that have associated eIF5A with cell proliferation and cell cycle progression. Finally, this review presents recent results obtained in our laboratory that re-emphasize the role of eIF5A in the translation scenario. Further experiments will be necessary to define the role played by eIF5A in the translational machinery.

Keywords: eIF5A; translation; cell proliferation; hypusine; protein synthesis.

REFERÊNCIAS

- Abid MR, Ueda K, Miyazaki M. Novel features of the functional site and expression of the yeast deoxyhypusine synthase. *Biol Signals* 1997; 6:157-65.
- Aoki H, Adams SL, Turner MA, Ganoza MC. A Molecular characterization of the prokaryotic efp gene product involved in a peptidyltransferase reaction. *Biochimie* 1997; 79:7-11.
- Asano K, Clayton J, Shalev A, Hinnebusch AG. A multifactor complex of eukaryotic initiation factors, eIF1, eIF2, eIF3, eIF5, and initiator tRNA(Met) is an important translation initiation intermediate in vivo. *Genes Dev* 2000; 14:2534-46.
- Bartig D, Schumann H, Klink F. The unique posttranslational modification leading to deoxyhypusine or hypusine is a general feature of the archaeobacterial kingdom. *Syst Appl Microbiol* 1990; (13):112-6.
- Benne R, Hershey JW. The mechanism of action of protein synthesis initiation factors from rabbit reticulocytes. *J Biol Chem* 1978; 253: 3078-87.
- Bevec D, Klier H, Holter W, Tschachler E, Valent P, Lottspeich F, Baumruker T, Hauber J. Induced gene expression of hypusine-containing protein eukaryotic initiation factor 5A in activated human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91:10829-33.

- Bevec D, Hauber J. Eukaryotic initiation factor 5A activity and HIV-1 Rev function. *Biol Signals* 1997; 6: 124-33.
- Chatterjee I, Gross SR, Kinzy TG, Chen KY. Rapid depletion of mutant eukaryotic initiation factor 5A at restrictive temperature reveals connections to actin cytoskeleton and cell cycle progression. *Mol Genet Genomics* 2006; 275: 264-76.
- Chen KY, Liu AY. Biochemistry and function of hypusine formation on eukaryotic initiation factor 5A. *Biol Signals* 1997; 6: 105-9.
- Cooper HL, Park MH, Folk JE. Posttranslational formation of hypusine in a single major protein occurs generally in growing cells and is associated with activation lymphocyte growth. *Cell* 1982; 29:791-7.
- Cullen BR. Mechanism of action of regulatory proteins encoded by complex retroviruses. *Microbiol Rev* 1992; 56:375-94.
- Duncan RF, Hershey JW. Changes in eIF-4D hypusine modification or abundance are not correlated with translational repression in HeLa cells. *J Biol Chem* 1986; 261:12903-6.
- Fornerod M, Ohno M, Yoshida M, Mattaj IW. CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* 1997; 90:1051-60.
- Gilbert DM, Neilson A, Miyazawa H, Burhans WC. Mimosine arrests DNA synthesis at replication forks by inhibiting deoxyribonucleotide metabolism. *J Biol Chem* 1995; 270:9597-606.
- 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* 2001; 313(4):903-19.
- Hanuske-Abel HM, Park MH, Hanuske AR, Popowicz A, Lalande M, Folk JE. Inhibition of G1-S transition of the cell cycle by inhibitors of deoxyhypusine hydroxylation. *Biochim. Biophys. Acta* 1994; 1221:115-24.
- Hanawa-Suetsugu K, Sekine S, Sakai H, Hori-Takemoto C, Terada T, et al. Crystal structure of elongation factor P from *Thermus thermophilus* HB8. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101:9595-600.
- Hofmann W et al. Cofactor requirements for nuclear export of Rev response element (RRE)- and constitutive transport element (CTE)-containing retroviral RNAs. An unexpected role for actin. *J Cell Biol* 2001; 152:895-910.
- Jakus J, Wolff EF, Park MH, Folk JE. Features of the spermidine-binding site of deoxyhypusine synthase as derived from inhibition studies. Effective inhibition by bis- and mono-guanylated diamines and polyamines. *J Biol Chem* 1993; 268:13151-59.
- Jao DL, Chen KY. Tandem affinity purification revealed the hypusine-independent binding of eukaryotic initiation factor 5A to the translating 80S ribosomal complex. *J Cell Biochem* 2006; 97:583-98.
- Jenkins ZA, Haag PG, Johansson HE. Human eIF5A2 on chromosome 3q25-q27 is a phylogenetically conserved vertebrate variant of eukaryotic translation initiation factor 5A with tissue-specific expression. *Genomics* 2001; 71:101-9.
- Kang HA, Schwelberger HG, Hershey JW. Translation initiation factor eIF-5A, the hypusine-containing protein, is phosphorylated on serine in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1993; 268 (20):14750-6.
- Kang HA, Hershey JW. Effect of initiation factor eIF-5A depletion on protein synthesis and proliferation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1994; 269:3934-40.
- Kang KR, Wolff EC, Park MH, Folk JE, Chung SI. Identification of YHR068w in *Saccharomyces cerevisiae* chromosome VIII as a gene for deoxyhypusine synthase. Expression and characterization of the enzyme. *J Biol Chem* 1995; 270:18408-12.
- Kemper WM, Berry KW, Merrick WC. Purification and properties of rabbit reticulocyte protein synthesis initiation factors M2Balpha and M2Bbeta. *J Biol Chem* 1976; 251:5551-7.
- Kim KK, Hung LW, Yokota H, Kim R, Kim SH. Crystal structures of eukaryotic translation initiation factor 5A from *Methanococcus jannaschii* at 1.8 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95:10419-24.
- Klier H, Wohl T, Eckerskorn C, Magdolen V, Lottspeich F. Determination and mutational analysis of the phosphorylation site in the hypusine-containing protein Hyp2p. *FEBS Lett* 1993; 334(3) 360-4.
- Lee LA, Elfring LK, Bosco G, Orr-Weaver TL. A genetic screen for suppressors and enhancers of the *Drosophila* PAN GU cell cycle kinase identifies cyclin B as a target. *Genetics* 2001; 158:1545-56.
- Lipowsky G, Bischoff FR, Schwarzmaier P, Kraft R, Kostka S, Hartmann E, Kutay U, Gorlich D. Exportin 4: a mediator of a novel nuclear export pathway in higher eukaryotes. *EMBO J* 2000; 19:4362-71.
- 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* 1994; 244:646-52.
- Neville M, Stutz F, Lee L, Davis LI, Rosbach M. The importin-beta family member Crm1p bridges the interaction between Rev and the nuclear pore complex during nuclear export. *Curr Biol* 1997; 7:767-75.
- Park MH. The essential role of hypusine in eukaryotic translation initiation factor 4D (eIF-4D). Purification of eIF-4D and its precursors and comparison of their activities. *J Biol Chem* 1989; 264:18531-5.
- Park MH, Wolff EC, Folk JE. Hypusine: Its post-translational formation in eukaryotic initiation factor 5A and its potential role in cellular regulation. *Biofactors* 1993a; 4:95-104.

- Park MH, Wolffi EC, Folk JE. Is hypusine essential for eukaryotic cell proliferation?. *Trends Biochem Sci* 1993b; 28:475-9.
- Park MH, Wolffi EC, Lee YB, Folk JE. Antiproliferative effects of inhibitors of deoxyhypusine synthase. Inhibition of growth of chinese hamster ovary cells by guanyl diamines. *J Biol Chem* 1994; 369:27827-83.
- Park MH, Lee YB, Joe YA. Hypusine is essential for eukaryotic cell proliferation. *Biol Signals* 1997; 6:115-23.
- Park MH. The Post-Translational Synthesis of a Polyamine-Derived Amino Acid, Hypusine, in the Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A (eIF5A). *J Biochem* (Tokyo) 2006; 139:161-9.
- Peat TS, Newman J, Waldo GS, Berendzen J, Terwilliger TC. Structure of translation initiation factor 5A from *Pyrobaculum aerophilum* at 1.75 Å resolution. *Structure* 1998; 6:1207-14.
- Peltz SW, Donahue JL, Jacobson A. A mutation in the tRNA nucleotidyltransferase gene promotes stabilization of mRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1992; 12:5778-84.
- Pestova TV, Kolupaeva VG, Lomakin IB, Pilipenko EV, Shatsky IN, Agol VI, Hellen CU. Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98 (13):7029-36.
- Rosorius O, Kratzer F, Heger P, Dabauvalle MC, Hauber J. Nuclear pore localization and nucleocytoplasmic transport of eIF5A: evidence for direct interaction with the export receptor CRM1. *J Cell Sci* 1999; 112:2369-80.
- Ruhl M, Himmelspach M, Bahr GM, Hammerschmid F, Jaksche H et al. Eukaryotic initiation factor 5A is a cellular target of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain mediating trans-activation. *J Cell Biol* 1993; 123:1309-20.
- Sasaki K, Abid MR, Miyazaki M. Deoxyhypusine synthase gene is essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 1996; 384:151-4.
- Schnier J, Schwelberger HG, Smit-McBride Z, Kang HA, Hershey JW. Translation initiation factor 5A and its hypusine modification are essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1991; 11:3105-14.
- Schwelberger HG, Kang HA, Hershey JW. Translation initiation factor eIF5A expressed from either of two yeast gene or from human cDNA. Functional identity under aerobic and anaerobic conditions. *J Biol Chem* 1993; 268:14018-25.
- Shi XP, Yin KC, Zimolo ZA, Stern AM, Waxman L. The subcellular distribution of eukaryotic translation initiation factor, eIF-5A, in cultured cells. *Exp Cell Res* 1996; 225:348-56.
- Shi XP, Yin KC, 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* 1997; 6:143-9.
- Smit-McBride Z, Schnier J, Kaufman RJ, Hershey JW. Protein synthesis initiation factor eIF-4D. Functional comparison of native and unhyposinated forms of the protein. *J Biol Chem* 1989; 264:18527-30.
- Thompson GM, Cano VS, Valentini SR. Mapping eIF5A binding sites for Dys1 and Lia1: in vivo evidence for regulation of eIF5A hypusination. *FEBS Lett* 2003; 555 (3): 464-8.
- Tome ME, Gerner EW. Cellular eukaryotic initiation factor 5A content as a mediator of polyamine effects on growth and apoptosis. *Biol Signal* 1997; 6:150-6.
- Valentini SR, Casolari JM, Oliveira CC, Silver PA, McBride A. Genetic interactions of yeast eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) reveal connections to poly(A)-binding protein and protein kinase C signaling. *Genetics* 2002; 160:393-405.
- Weir BA, Yaffe MP. Mmd1p, a novel, conserved protein essential for normal mitochondrial morphology and distribution in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* 2004; 15 (4): 1656-65.
- Wilusz CJ, Wormington M, Peltz SW. The cap-to-tail guide to mRNA turnover. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2 (4):237-46.
- 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* 1993; 241:305-11.
- Xu A, Chen KY. 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* 2001; 276:2555-61.
- Xu A, Jao DL, Chen KY. Identification of mRNA that binds to eukaryotic initiation factor 5A by affinity co-purification and differential display. *Biochem J* 2004; 384:585-90.
- 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) 2003; 133:75-81.
- Zanelli CF, Valentini SR. Pkc1 acts through Zds1 and Gic1 to suppress growth and cell polarity defects of a yeast eIF5A mutant. *Genetics* 2005; 171(4):1571-81
- Zanelli CF, Maragno ALC, Gregio APB, Komili S, Pandolfi JR, Mestriner CA, Lustrini WR, Valentini SR. eIF5A binds to translational machinery components and affects translation in yeast. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 348:1358-66.
- Zuk D, Jacobson A. A single amino acid substitution in yeast eIF-5A results in mRNA stabilization. *EMBO J* 1998; 17:2914-25.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.