

ANÁLISE DE MUTANTES DE Dys1 DE LEVEDURA COM POSSÍVEL SÍTIO DE FOSFORILAÇÃO POR PKC MODIFICADO. Ana Beatriz de Paula e Silva, Sandro Roberto Valentini, Wagner da Silva Silveira, Cleslei Fernando Zanelli. – Microbiologia - Farmácia-Bioquímica – Ciências Biológicas – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Câmpus de Araraquara.

O fator de início de tradução 5A (eIF5A) é uma proteína altamente conservada de arqueobactérias a mamíferos (Chen e cols., 1997) e sofre uma modificação pós-traducional única chamada hipusinação. Nesta modificação, desoxi-hipusina sintase, codificada pelo gene *DYS1* em *Saccharomyces cerevisiae*, catalisa a transferência do grupo butilamino da poliamina espermidina para o ϵ -amino grupo de um resíduo de lisina específico de eIF5A. Mutação da lisina alvo (K51R) ou deleção de *DYS1* em *S. cerevisiae* leva à produção de eIF5A não hipusinado e não permite o crescimento celular (Schnier e cols., 1991), mostrando que a hipusinação é essencial para a função *in vivo* de eIF5A. Apesar da função de eIF5A ainda não ter sido esclarecida, este fator já foi relacionado a início de tradução, transporte nucleocitoplasmático, decaimento de mRNA e proliferação celular.

No intuito de compreender o papel de eIF5A, foi conduzido um rastreamento de supressores em alto número de cópias usando o alelo sensível a temperatura *tif51A-1*, o que levou ao isolamento de quatro genes envolvidos na via de integridade celular *WSC1*, *WSC2*, *WSC3* e *PKC1* (Valentini e cols., 2002; Zanelli e Valentini, 2005). Foi mostrado recentemente que a enzima Dys1, essencial para a maturação funcional de eIF5A, é fosforilada tanto *in vitro* (Kang e Chung, 1999) quanto *in vivo* (Kang e Chung, 2002) em resíduos de treonina e, principalmente, serina por diferentes isoformas de PKC (proteína quinase C) de mamífero. As enzimas desoxi-hipusina sintase humana (hDHS) e de levedura (Dys1) possuem 58% de identidade e, apesar de a enzima de *S. cerevisiae* possuir oito possíveis sítios de fosforilação por PKC, enquanto que a humana possui apenas três, todos os sítios apresentados por hDHS estão conservados na sequência de Dys1. Desta forma, estudos estão sendo realizados no intuito de revelar se Pkc1 pode influenciar a atividade de Dys1 *in vivo* e como esta interação interfere com a função de eIF5A em *S. cerevisiae*. Em trabalho anterior, foi apresentado o mutante *dys1^{T118A}*, que era capaz de complementar a linhagem *dys1::HIS3* apenas na presença de sorbitol 1M. Foi demonstrado que *dys1^{T118A}* é instável e o sequenciamento deste alelo revelou duas mutações adicionais (W75R e A147T), naturalmente presentes em uma linhagem selvagem de *DYS1* de W303. Mutações sítio-dirigidas foram novamente realizadas para modificar possíveis sítios de fosforilação por PKC em *Dys1* e um novo mutante de *dys1^{T118A}* foi obtido, bem como os mutantes *dys1^{S160A}* e *dys1^{T268A}*, usando outro molde selvagem de *DYS1*. Para que fosse possível verificar a estabilidade das proteínas dos mutantes de Dys1, a linhagem *dys1::HIS3* contendo cada mutante separadamente e o alelo selvagem foram crescidas a 25°C até a fase log. Em seguida, as amostras protéicas, provenientes da lise celular foram separadas em gel de poliacrilamida 10% na presença de SDS (SDS-PAGE) e Dys1 foi detectada com anticorpo policlonal anti-Dys1 por ensaio de “western blot” (Figura 1A). O mesmo ensaio foi realizado para verificar a estabilidade do alelo *dys1^{W75R / T118A / A147T}* (Figura 1B).

Notavelmente, os experimentos revelaram que nenhum desses mutantes são inviáveis e o ensaio de “western blot” mostra que as proteínas codificadas por estes três alelos são estáveis, diferente do que foi observado pelo mutante triplo *dys1^{W75R / T118A / A147T}*. Esperamos com este estudo compreender melhor a correlação funcional entre eIF5A e Pkc1, e o papel de Dys1 nesta interação.

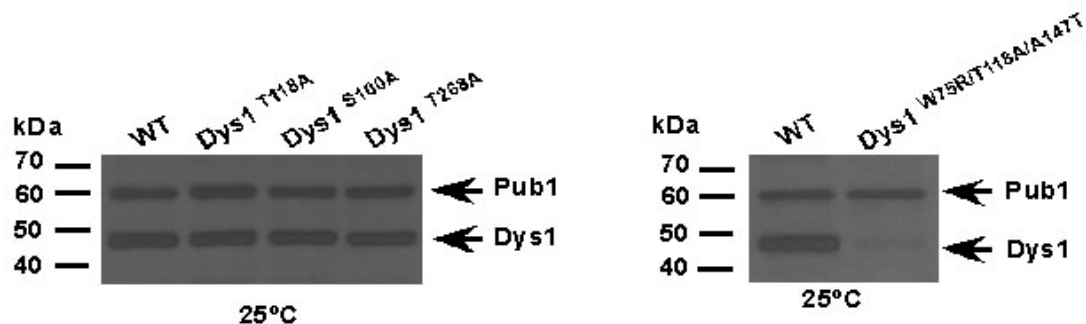


FIGURA1 – Estabilidade das proteínas mutantes Dys1. (A) linhagem *dys1::HIS3* contendo cada mutante separadamente (*dys1*^{T118A}, *dys1*^{S160A} ou *dys1*^{T268A}) ou o alelo selvagem foi crescida a 25°C até a fase log. As células foram lisadas e 10µg da proteína total foram submetidas ao ensaio por western blot utilizando o anticorpo anti-Dys1.(B) Os mesmos procedimentos foram realizados com o alelo *dys1*^{W75R/T118A/A147T}. A proteína não relacionada Pub1 foi utilizada como controle de carregamento.

Referências Bibliográficas

- CHEN, K. Y. and LIU, A. Y. (1997). Biochemistry and function of hypusine formation on eukaryotic initiation factor 5A. **Biol. Signals**, **6**: 105-9.
- KANG, K. R. and CHUNG, S. I. (1999). Characterization of yeast deoxyhypusine synthase: PKC-dependent phosphorylation *in vitro* and functional domain identification. **Exp. Mol. Med.**, **31**: 210-6.
- KANG, K. R. and CHUNG, S. I. (2002). Deoxyhypusine synthase is phosphorylated by protein kinase C *in vivo* as well as *in vitro*. **Exp. Mol. Med.**, **34** (6): 489-49.
- SCHNIER, J.; SCHWELBERGER, H. G., SMIT-MCBRIDE, Z., KANG, H. A., HERSHEY, J. W. (1991). Translation initiation factor 5A and its hypusine modification are essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell Biol.**, **11**:3105-14.
- VALENTINI, S. R., CASOLARI, J. M., OLIVEIRA, C. C., SILVER, P. A., MCBRIDE, A. (2002). Genetic interactions of yeast eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) reveal connections to poly(A)-binding protein and protein kinase C signaling. **Genetics**, **160**: 393-405.
- ZANELLI, C. F., VALENTINI, S. R. (2005). Pkc1 acts through Zds1 and Gic1 to suppress growth and cell polarity defects of a yeast eIF5A mutant. **Genetics**, **171**(4):1571-81.

Bolsa: CNPq/PIBIC