

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta **Dissertação** será disponibilizado somente a partir de 17/04/2022.

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara

Marco Aurélio Bambozzi Comar

**IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RELEVANTES PARA FASE G1 DO CICLO
CELULAR DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* DIFERENCIALMENTE
PRESENTES DURANTE DESATIVAÇÃO DE EIF5A**

Araraquara
2020

Marco Aurélio Bambozzi Comar

**IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RELEVANTES PARA FASE G1 DO CICLO
CELULAR DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* DIFERENCIALMENTE
PRESENTES DURANTE DESATIVAÇÃO DE EIF5A**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
programa de Pós-graduação em Biociências e
Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de
Araraquara, UNESP, para obtenção do título
de Mestre.

Área de concentração: Biologia Molecular

Orientador: Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli

Araraquara

2020

C728i Comar, Marco Aurélio Bambozzi.
Identificação de proteínas relevantes para fase G1 do ciclo celular de *Saccharomyces cerevisiae* diferencialmente presentes durante desativação de eIF5A / Marco Aurélio Bambozzi Comar. – Araraquara: [S.n.], 2020.
66 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de concentração Biologia Molecular.

Orientador: Cleslei Fernando Zanelli.

1. eIF5A. 2. Ciclo celular. 3. Sic1. 4. GC7. I. Zanelli, Cleslei Fernando, orient. II. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030081P7
Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Identificação de proteínas relevantes para fase G1 do ciclo celular de *Saccharomyces cerevisiae* diferencialmente presentes durante desativação de eIF5A

AUTOR: MARCO AURÉLIO BAMBOZZI COMAR

ORIENTADOR: CLESLEI FERNANDO ZANELLI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA, área de conhecimento: Biologia Molecular pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. CLESLEI FERNANDO ZANELLI

Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. FELIPE ROBERTI TEIXIERA

GENÉTICA E EVOLUÇÃO / Universidade Federal de São Carlos

Profa. Dra. ANA MARISA FUSCO ALMEIDA

FCFAR/UNESP / Câmpus de Araraquara

Araraquara, 17 de abril de 2020

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço ao apoio que sempre recebi de minha família, o qual foi imprescindível para que eu pudesse ter chegado até aqui. Agradeço aos meus pais, Marco Antonio e Renata, por sempre se preocuparem com minha educação e bem-estar. Agradeço à minha irmã Lívia que também sempre me apoiou, além de ter explorado os caminhos da ciência e apresentado para mim. Da mesma forma, agradeço à minha tia Andrea por ter igualmente me apoiado e compartilhado de suas experiências na ciência comigo.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Biologia Molecular e Celular de Microrganismos, agradeço por todo apoio profissional e pessoal durante o tempo em que estivemos juntos, tanto aos membros mais antigos, os quais eu conheci no começo de minha caminhada como cientista, quanto aos membros que conheci durante a realização deste mestrado. Assim, agradeço à Ana Carolina, Angélica, Bianca, Fernanda, Keylla, Maria Olívia, Mariana, Naira, Suélen, Tatiana Maria e Weslei pelo companheirismo.

Agradeço aos professores Cleslei e Sandro por terem me recebido em seu grupo. Ao professor Cleslei, agradeço por ter me orientado como aluno de iniciação científica e então como aluno de mestrado. Meu conhecimento e minha formação profissional foram construídos neste ambiente.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

eIF5A é um fator de alongação da tradução conservado em arqueias e eucariotos, que interage com a subunidade maior do ribossomo 80S. É a única proteína que possui o aminoácido hipusina, formado pós-traducionalmente, essencial para sua função. eIF5A auxilia na tradução de proteínas que contêm *motifs* ricos em prolina, pois sequência repetida deste aminoácido pode causar parada do ribossomo em tradução devido à rigidez estrutural que forma. Na ausência de eIF5A funcional ocorre parada do ciclo celular em G1, na transição de G1 para S, tanto em *Saccharomyces cerevisiae* quanto em mamíferos, sugerindo papel essencial desta na tradução de proteínas importantes para a progressão do ciclo celular. Neste trabalho foi proposta a identificação das proteínas relevantes para a fase G1 que se encontram diferencialmente presentes durante desativação de eIF5A em *S. cerevisiae*. Foram utilizados dados de larga escala de perfil proteômico diferencial entre linhagens selvagens e mutantes de eIF5A, previamente obtido por nosso grupo, como ponto de partida para identificação das proteínas relevantes. A confirmação de níveis diferenciais destas proteínas foi realizada utilizando metodologia de *Western blot* após indução da desativação de eIF5A, utilizando o mutante sensível a temperatura *hyp2-3*. A desativação foi feita através do cultivo da linhagem mutante em temperatura semi-permissiva, que induz perda da função de eIF5A, porém mantendo viabilidade celular. Foi observado que a proteína Cka2 está diminuída durante a desativação de eIF5A, ela faz parte do complexo quinase CK2 que atua fosforilando proteínas envolvidas em diversos processos celulares, bem como o próprio ciclo celular. Também foi observado que Sic1, uma inibidora de ciclinas dependentes de quinase (CDK), que regula tipicamente a transição G1/S e através de vias que respondem a estresses, está diminuída durante desativação de eIF5A. Para também compreensão do impacto da inibição de eIF5A em mamífero, a linhagem de células de camundongo RAW 264.7 foi tratada com o inibidor da hipusinação GC7. Foi realizado ensaio de qRT-PCR em tempo real onde observou-se diminuição da expressão dos genes *CCND1* (Ciclina D1), *CDK4*, *CDK6* e *E2F1*, que estão diretamente relacionadas com a progressão da fase G1 do ciclo celular nos mamíferos, além de aumento da expressão dos genes *CCND2* (Ciclina D2) e *CDKN1A* (p21), sendo p21 uma inibidora de CDK que atua inibindo a progressão de G1 para S. Em conclusão, a diminuição de Sic1 poderia indicar que as vias que a regulam se encontram normais, assim, a diminuição de Cka2, e por consequência da atividade do complexo CK2, poderia estar causando a parada em G1 na levedura, enquanto nos mamíferos este fenótipo pode ocorrer devido a diminuição da expressão de genes responsáveis pela progressão de G1 e pelo aumento da expressão da inibidora p21.

Palavras-chave: eIF5A. Ciclo celular. Sic1. GC7.

ABSTRACT

eIF5A is a translation elongation factor conserved in archaea and eukaryotes, that interacts with the major subunit of the 80S ribosome. It is the only protein to contain the amino acid hypusine, formed post-translationally, essential to its function. eIF5A helps the translation of proteins that contain proline enriched motifs, as repeated sequence of this amino acid can cause ribosome stall during translation due to the rigid structure that it forms. In the absence of functional eIF5A occurs cell cycle arrest in G1, on the transition of G1 to S, both in *Saccharomyces cerevisiae* and mammals, suggesting an essential role of it on the translation of important proteins to the progression of the cell cycle. In this work, it was proposed the identification of relevant proteins to the G1 phase that are present differentially during deactivation of eIF5A in *S. cerevisiae*. It was used data of high-throughput differential proteomic profile between wild type strains and eIF5A mutant strains, previously obtained by our group, as a starting point to the identification of the relevant proteins. The confirmation of the differential levels of these proteins was made using Western blot methodology after induction of eIF5A deactivation, using the temperature-sensitive mutant *hyp2-3*. The deactivation was performed through cultivation of the mutant strain in semipermissive temperature, that induces loss of function of eIF5A but maintain cell viability. It was observed that the protein Cka2 is decreased during eIF5A deactivation, this protein is part of the kinase complex CK2 that acts phosphorylating proteins involved in multiples cellular processes, as well as the cell cycle. It was also observed that Sic1, an inhibitor of cyclin-dependent kinase (CDK), which typically regulates the G1/S transition and by pathways that respond to stresses, is decreased during eIF5A deactivation. Also, to the comprehension of the impact of eIF5A inhibition in mammals, the mouse cell strain RAW 264.7 was treated with the hypusination inhibitor GC7. It was performed real-time qRT-PCR assay where it was observed decrease in the expression of the genes *CCND1* (Cyclin D1), *CDK4*, *CDK6* and *E2F1*, that are directly related to the progression of the G1 phase of mammal cell cycle, also increase in the expression of the genes *CCND2* (Cyclin D2) and *CDKN1A* (p21), being p21 a CDK inhibitor that acts inhibiting the progression of G1 to S. In conclusion, the decrease of Sic1 could indicate that the pathways that regulate it are found normal, thus, the decrease of Cka2, and consequently the decrease of the activity of the CK2 complex, could be causing the G1 arrest in yeast, whereas in mammals the phenotype can occur because of decrease of the expression of genes responsible for the progression of G1 and the increase in the expression of the inhibitor p21.

Keywords: eIF5A. Cell cycle. Sic1. GC7.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Etapas da tradução.	12
Figura 2.	Interação de eIF5A com ribossomo durante tradução de motifs de poliprolina.	13
Figura 3.	Via de hipusinação de eIF5A.	13
Figura 4.	Alinhamento das proteínas eIF5A de humano e de levedura.	14
Figura 5.	Esquema ilustrativo do ciclo celular.	16
Figura 6.	<i>Start</i> (início) do ciclo celular em levedura.	18
Figura 7.	Via de RHOA e Rho1.	19
Figura 8.	Agrupamento funcional das interações proteicas de cada subunidade do complexo quinase CK2.	37
Figura 9.	Atuação de Sic1 no ciclo celular da levedura.	41
Figura 10.	Progressão do ciclo celular de G1 até S a partir do <i>start</i>	45
Figura 11.	Ensaio de <i>Western blot</i> demonstrando o nível da proteína Cka2 diminuído durante desativação de eIF5A.	46
Figura 12.	Ensaio de <i>Western blot</i> demonstrando o nível da proteína Sic1 diminuído durante desativação de eIF5A.	48
Figura 13.	Ensaio de <i>Western blot</i> demonstrando o nível da proteína Fkh1 durante desativação de eIF5A.	50
Figura 14.	Fosforilação de Rb e regulação dos fatores de transcrição E2F.	51
Figura 15.	Ensaio de qRT-PCR em tempo real de genes envolvidos no ciclo celular, após tratamento de células RAW 264.7 com o inibidor de hipusinação GC7, gerando eIF5A não funcional.	53
Figura 16.	Impacto da ausência de função de eIF5A na levedura e em mamífero.	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizadas neste trabalho.	23
Tabela 2. Linhagem de cultura celular de mamífero utilizada.	23
Tabela 3. Anticorpos utilizados neste trabalho.	23
Tabela 4. Oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>) utilizados nos ensaios de qRT-PCR em tempo real.	24
Tabela 5. Genes relacionados ao ciclo celular cujas proteínas estão diminuídas em linhagens contendo o mutante <i>hyp2-3</i> durante desativação de eIF5A no ensaio de perfil proteômico diferencial.	35
Tabela 6. Genes relacionados ao ciclo celular cujas proteínas estão aumentadas em linhagens contendo o mutante <i>hyp2-3</i> durante desativação de eIF5A no ensaio de perfil proteômico diferencial.	38
Tabela 7. Situação dos transcritos de genes relacionados ao ciclo celular de <i>S. cerevisiae</i> , obtido por meio de perfil transcricional comparativo, cujas proteínas apresentam níveis diferenciais em perfil proteômico diferencial.	42
Tabela 8. Fatores de transcrição que possam regular os transcritos diminuídos nos perfis transcricionais comparativos de linhagem contendo o mutante <i>hyp2-3</i> , durante desativação de eIF5A, realizados a 30 e 37°C	43
Tabela 9. Fatores de transcrição que possam regular os transcritos aumentados nos perfis transcricionais comparativos de linhagem contendo o mutante <i>hyp2-3</i> , durante desativação de eIF5A, realizados a 30 e 37°C.	43
Tabela 10. Situação dos transcritos dos potenciais fatores de transcrição relacionados com ciclo celular, que podem regular a expressão de alguns genes apresentados nos perfis transcricionais comparativos durante desativação de eIF5A em linhagem contendo o mutante <i>hyp2-3</i>	44
Tabela 11. Ontologia genética, utilizando a ferramenta <i>Rank by GO</i> do repositório online <i>Yeasttract</i> , de genes relacionados a ciclo celular que possuem interação genética negativa com o nocaute de <i>SIC1</i> , de acordo com o banco de dados online <i>The Cell Map</i>	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

∞	infinito
α	alfa
Δ	delta (estatística) ou deleção (genética)
$^{\circ}\text{C}$	grau Celsius
μg	micrograma
μL	microlitro
μm	micrômetro
μM	micromolar
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Cat.	Número de catálogo
CDK	<i>cyclin-dependent kinase</i> (ciclina dependente de quinase)
cDNA	DNA complementar
cm^2	centímetros quadrados
CO_2	gás carbônico
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxirribonucleotídeo
D.O.	densidade óptica
DTT	ditiotreitól
g	grama
GC7	N^1 -guanil-1,7-diamino-heptano
HCl	ácido clorídrico
KCl	cloreto de potássio
KH_2PO_4	fosfato monopotássico
L	litro
M	molar

mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
mRNA	RNA mensageiro
NaCl	cloreto de sódio
ng	nanograma
nm	nanômetro
Na ₂ HPO ₄	fosfato dissódico
PBS	tampão fosfato salino
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (reação de polimerização em cadeia)
q.s.p.	quantidade suficiente para
qRT-PCR	<i>quantitative reverse transcription PCR</i> (PCR quantitativa de transcrição reversa)
RNA	ácido ribonucleico
SDS	dodecil sulfato de sódio
TAP	<i>tandem affinity purification</i>
TEMED	tetrametiletilenodiamina
Tris	tris-(hidroximetil)-aminometano
tRNA	RNA transportador
Triton X-100	p-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenil polietilenoglicol
TWEEN 20	monolaurato de polioxietilenosorbitana
U	unidades
xg	aceleração gravitacional

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS	21
2.1. Objetivo geral	21
2.2. Objetivos específicos	21
3. MATERIAL	22
3.1. Linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizadas	22
3.2. Linhagem de cultura celular de mamífero utilizada.....	23
3.3. Anticorpos utilizados	23
3.4. Oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>) utilizados.....	24
4. METODOLOGIA.....	25
4.1. Cultivo das linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
4.2. Extração de proteína total de células de <i>S. cerevisiae</i>	25
4.3. Quantificação de concentração proteica por método de Lowry.....	26
4.4. Eletroforese de proteína em gel de SDS-poliacrilamida (<i>SDS-PAGE</i>).....	26
4.5. <i>Western blot</i>	27
4.5.1. Ensaio de <i>Western blot</i>	27
4.5.2. Análise da intensidade das bandas obtidas no ensaio de <i>Western blot</i>	27
4.6. Cultivo das células RAW 264.7	28
4.7. Contagem de células em câmara de Neubauer.....	28
4.8. Cultivo das células RAW 264.7 em placa de Petri.....	29
4.9. Tratamento das células RAW 264.7 com GC7	29
4.10. Extração de RNA total de células RAW 264.7.....	30
4.11. Tratamento de amostra de RNA total com DNase I	30
4.12. Transcrição reversa de RNA total tratado com DNase I.....	31
4.13. qRT-PCR em tempo real.....	31

4.13.1. Desenho e ensaio de otimização dos oligonucleotídeos iniciadores	31
4.13.2. Validação das reações de qRT-PCR em tempo real	32
4.13.3. Análise do ensaio de qRT-PCR em tempo real	33
4.14. Análise dos dados de perfis de larga escala.....	34
4.14.1. Análise das proteínas diferencialmente presentes em perfil proteômico diferencial	34
4.14.2. Busca por potenciais fatores de transcrição utilizando dados de perfil transcricional comparativo	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1. Escolha das proteínas partindo de análise de perfil proteômico diferencial de linhagem contendo eIF5A selvagem <i>versus</i> linhagem contendo mutante	35
5.1.1. Proteínas com níveis diminuídos no perfil proteômico diferencial	35
5.1.2. Proteínas com níveis aumentados no perfil proteômico diferencial	38
5.2. Análise de perfil transcricional comparativo de linhagem contendo eIF5A selvagem <i>versus</i> linhagem contendo mutante	41
5.2.1. Níveis dos transcritos dos genes de interesse.....	41
5.2.2. Busca por potenciais fatores de transcrição	42
5.3. Validação por metodologia de <i>Western blot</i> dos níveis das proteínas de interesse	46
5.3.1. Cka2	46
5.3.2. Sic1.....	48
5.3.3. Fkh1.....	50
5.4. Ensaio de qRT-PCR em tempo real utilizando mRNA total obtido de células RAW 264.7 tratadas com GC7.....	51
6. CONCLUSÃO.....	55
REFERÊNCIAS.....	57
APÊNDICE.....	65

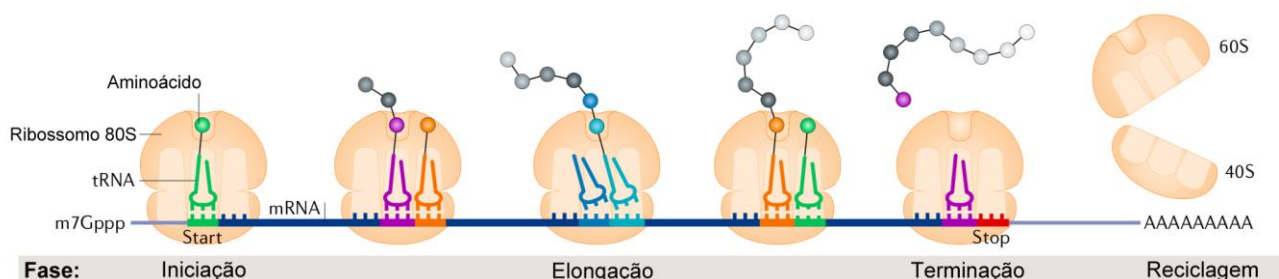
1. INTRODUÇÃO

A proteína eIF5A é um fator de alongação da tradução de proteínas encontrada muito conservada em arqueias e eucariotos (WOLFF; KANG; KIM; PARK, 2007), possuindo também homólogo em bactérias, chamado EF-P (ROSSI; KUROSHU; ZANELLI; VALENTINI, 2014). eIF5A foi primeiramente descoberta na década de 70 e classificada como um fator de iniciação da tradução (BENNE; BROWN-LUEDI; HERSHEY, 1978; KEMPER; BERRY; MERRICK, 1976). Porém, posteriormente, foi demonstrado tratar-se de um fator de alongação da tradução (GREGIO; CANO; AVACA; VALENTINI *et al.*, 2009; SAINI; EYLER; GREEN; DEVER, 2009).

O processo de tradução das proteínas acontece no ribossomo, ocorrendo em quatro etapas; iniciação, alongação, terminação e reciclagem (SCHULLER; GREEN, 2018). O ribossomo eucariótico é composto de duas subunidades que juntas formam o ribossomo 80S, e também três regiões chamadas de sítios A, P e E (SCHULLER; GREEN, 2018).

Na iniciação, os fatores de iniciação auxiliam o ribossomo que está montado na fita de mRNA a encaixar no códon de início AUG um tRNA-metionil iniciador, diretamente no sítio P, carregando o primeiro aminoácido da cadeia polipeptídica nascente (SCHULLER; GREEN, 2018). Em seguida, na alongação, o ribossomo se move pela fita de mRNA lendo as trincas de nucleotídeos e encaixando os tRNAs correspondentes, promovendo a ligação peptídica entre o aminoácido que está sendo carregado pelo tRNA que entra no sítio A e o aminoácido da cadeia polipeptídica nascente, que está ligada a um tRNA no sítio P, sendo auxiliado nesta etapa por fatores de alongação (SCHULLER; GREEN, 2018). Por fim, quando o ribossomo encontra o códon de parada do mRNA, um conjunto de fatores auxilia a liberar a cadeia polipeptídica (término da tradução) e, então, as subunidades do ribossomo são desmontadas do mRNA (reciclagem) para que possam recomeçar a tradução de outra fita (SCHULLER; GREEN, 2018) (Figura 1).

Figura 1. Etapas da tradução. O ribossomo montado na fita de mRNA inicia a tradução quando um tRNA-metionil iniciador é encaixado no códon de início (*start*) AUG do mRNA. A elongação da cadeia polipeptídica ocorre quando o ribossomo se move pela fita de mRNA lendo as trincas de nucleotídeos e encaixando os tRNAs correspondentes, promovendo a ligação peptídica entre o aminoácido que está sendo carregado pelo tRNA que entra no sítio A e o aminoácido da cadeia polipeptídica nascente ligada a um tRNA no sítio P. Na terminação, o ribossomo encontra o códon de parada (*stop*) e a cadeia polipeptídica é liberada, havendo desassociação das subunidades do ribossomo que poderão iniciar a tradução de nova fita de mRNA (reciclagem).



Fonte: SCHULLER; GREEN, 2018 (Adaptada)

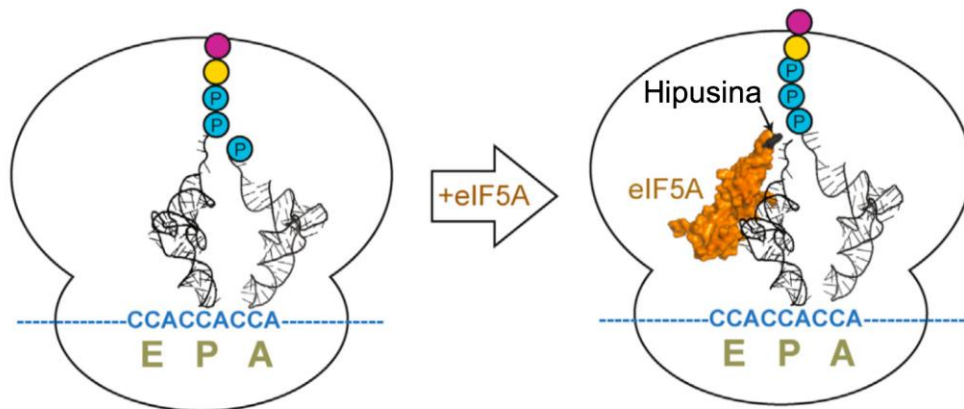
Durante a tradução, eIF5A se liga a uma região da subunidade maior do ribossomo 80S, entre os sítios P e E, com alguma sobreposição ao sítio E (GUTIERREZ; SHIN; WOOLSTENHULME; KIM *et al.*, 2013) (Figura 2). Ela atua durante a elongação auxiliando na tradução de sequências ricas em prolina, que, quando ocorre consecutiva e repetidamente no polipeptídeo, pode causar parada do ribossomo em tradução devido a rigidez estrutural da prolina (GUTIERREZ; SHIN; WOOLSTENHULME; KIM *et al.*, 2013).

Outras sequências de três aminoácidos além de poliprolina (PPP) também causam esta parada na ausência de eIF5A, como, por exemplo, DVG, DDG, GGT e RDK (SCHULLER; WU; DEVER; BUSKIRK *et al.*, 2017). E, além disso, ocorre um defeito global na terminação da tradução em células com eIF5A depletada (SCHULLER; WU; DEVER; BUSKIRK *et al.*, 2017). Desta forma, eIF5A parece agir estimulando a atividade de peptidil transferase do ribossomo durante a formação de ligação peptídica, para algumas sequências de aminoácidos e para a hidrólise do polipeptídeo no ribossomo ao final da tradução (SCHULLER; WU; DEVER; BUSKIRK *et al.*, 2017).

eIF5A é a única proteína que contém o aminoácido hipusina (COOPER; PARK; FOLK; SAFER *et al.*, 1983), que é essencial para a sua atividade (PARK; WOLFF; SMIT-MCBRIDE; HERSHEY *et al.*, 1991). A hipusina é resultante da modificação pós-traducional da lisina 50 em humano, ou 51 na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, pela enzima desoxi-hipusina sintase (DHPS em humano e Dys1 na

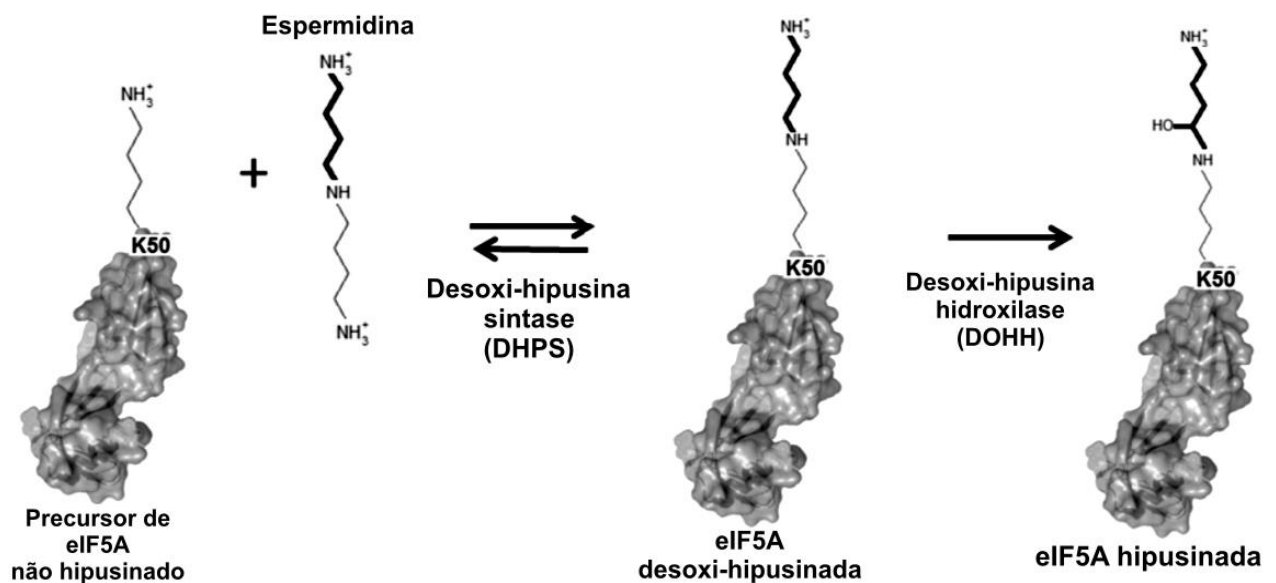
levedura) e, em seguida, pela enzima desoxi-hipusina hidroxilase (DOHH em humano e Lia1 na levedura), levando eIF5A à sua maturação (PARK; NISHIMURA; ZANELLI; VALENTINI, 2010) (Figura 3).

Figura 2. Interação de eIF5A com ribossomo durante tradução de *motifs* de poliprolina. eIF5A interagindo com o ribossomo entre os sítios P e E, com alguma sobreposição ao sítio E, auxiliando durante a elongação da tradução no alívio da parada causada por sequências ricas em prolina.



Fonte: GUTIERREZ; SHIN; WOOLSTENHULME; KIM *et al.*, 2013 (Adaptada)

Figura 3. Via de hipusinação de eIF5A. Precursor de eIF5A não hipusinado recebe o grupo aminobutil da espermidina pela enzima DHPS que é posteriormente hidroxilado pela enzima DOHH, gerando eIF5A hipusinado.



Fonte: DE ALMEIDA JR; TOLEDO; ROSSI; ROSSETTO *et al.*, 2014 (Adaptada)

A proteína eIF5A da levedura e a de humano, a qual pode ser chamada de eIF5A-1, são codificadas pelos genes *HYP2* (ou *TIF51A*) e *EIF5A1*, respectivamente, e compartilham cerca de 63% de identidade. Ou seja, 63% dos aminoácidos da sua sequência primária são iguais (SCHNIER; SCHWELBERGER; SMIT-MCBRIDE; KANG *et al.*, 1991), e a região onde ocorre a formação da hipusina, a alça de hipusinação, é extremamente conservada entre as proteínas (SCHNIER; SCHWELBERGER; SMIT-MCBRIDE; KANG *et al.*, 1991) (Figura 4).

Assim, eIF5A de levedura é capaz de complementar a função da de humano em ensaio *in vitro* (SCHNIER; SCHWELBERGER; SMIT-MCBRIDE; KANG *et al.*, 1991), da mesma forma, eIF5A de humano é capaz de complementar *in vivo* a de levedura (SCHWELBERGER; KANG; HERSHEY, 1993). A proteína de *Drosophila melanogaster* também é capaz de complementar *in vivo* a função da de levedura (MUÑOZ-SORIANO; DOMINGO-MUELAS; LI; GAMERO *et al.*, 2017).

Figura 4. Alinhamento das proteínas eIF5A de humano e de levedura. Alinhamento de eIF5A-1 de *Homo sapiens* (linha superior) com eIF5A de *Saccharomyces cerevisiae* (linha inferior), onde a alça de hipusinação extremamente conservada está destacada no quadro vermelho. Asterisco indica resíduo de aminoácido conservado. As sequências foram obtidas a partir dos depósitos no banco de dados *online Protein* do NCBI (NCBI, 2018) e o alinhamento realizado no software *online Clustal Omega* (SIEVERS; WILM; DINEEN; GIBSON *et al.*, 2011).

Hs	-MADDLDFETGDAGASATFPMQCSALRKNGFVVLKGRPCKIVEMST	TSKTGKHGHAKVHLV
Sc	MSDEHTTFETADAGSSATYPMQCSALRKNGFVVIKSRPCKIVDMST	TSKTGKHGHAKVHLV
	: :	***.***:***:*****:*.*****:*****
Hs	GIDIFTGKKYEDICPSTHNMDVPNIKRNDLFQLIGIQDGYLSLLQDSGEVREDLRLPEGDL	
Sc	AIDIFTGKKLEDLSPSTHNMEVPVVKRNEYQLLDIDDGFLSLNMMDGDTKDDVKAPEGEL	
	.***** **:.*****:** :***:***:*.***:***:~.***:~***:~***:~	
Hs	GKEIEQKYDCGEEILITVLSAMTEEA AVAIKAMAK--	154
Sc	GDSLQTA FDEGKDLMTIISAMGEEAAISFKEAARTD	157
	.~:~ : *~:~:~:~:~* ~~~~:~* *	

Fonte: Autoria própria

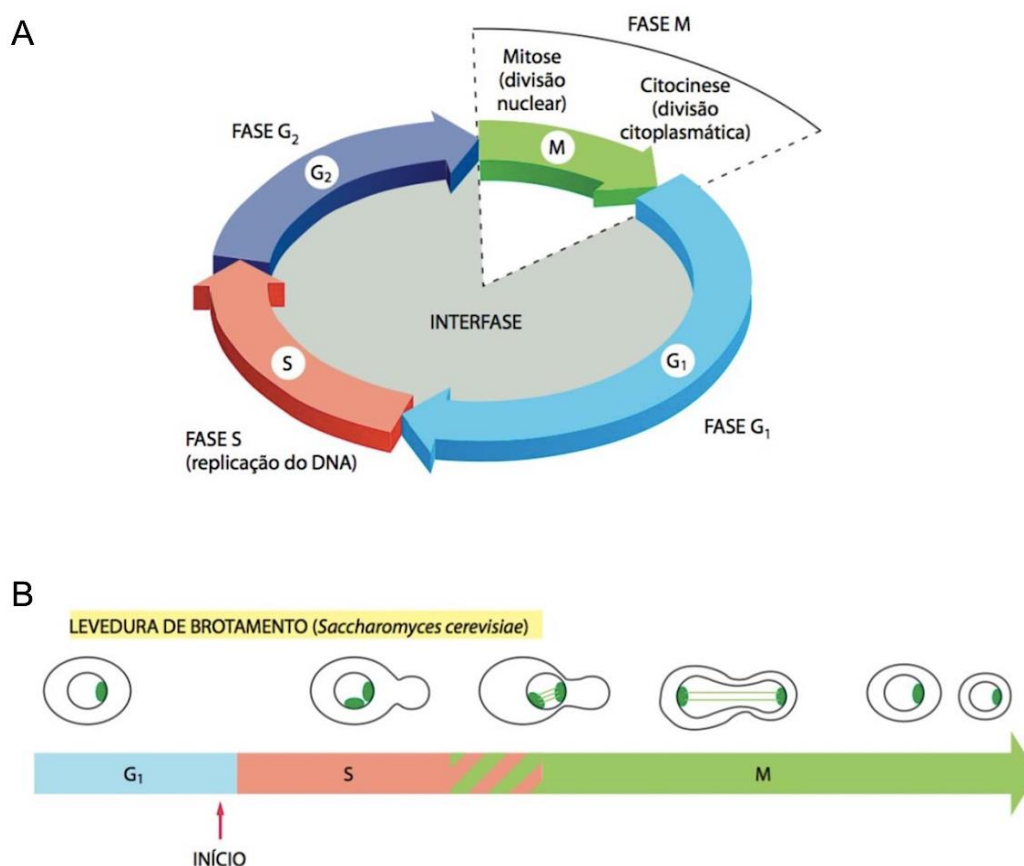
No contexto celular, a função de eIF5A está relacionada à proliferação, crescimento e desenvolvimento das células. Sua depleção causa inibição do crescimento de *S. cerevisiae* (KANG; HERSHEY, 1994), ocorrendo aprisionamento na fase G1 da interfase do ciclo celular (CHATTERJEE; GROSS; KINZY; CHEN, 2006). O bloqueio da hipusinação em células de mamíferos leva à efeitos semelhantes, como antiproliferação, quando utilizados inibidores de DHPS (PARK; WOLFF; LEE; FOLK, 1994), e aprisionamento do ciclo celular na interface G1/S,

quando utilizados inibidores de DOHH (HANAUSKE-ABEL; PARK; HANAUSKE; POPOWICZ *et al.*, 1994). Da mesma forma, depleção direta de eIF5A também causa parada do crescimento (MANDAL; MANDAL; PARK, 2016).

Estudo em camundongo demonstra não ser possível gerar linhagem contendo eIF5A nocauteada de forma homozigótica (genótipo *EIF5A1*^{-/-}), uma vez que a prole se torna inviável ainda em estágio inicial da embriogênese (NISHIMURA; LEE; PARK; PARK, 2012). Em *Caenorhabditis elegans* o nocaute de um dos homólogos de eIF5A causa parada da proliferação das células germinativas, e o nocaute do outro homólogo resulta em defeitos no crescimento e organização de células somáticas (HANAZAWA; KAWASAKI; KUNITOMO; GENGYO-ANDO *et al.*, 2004). Defeitos de crescimento e de desenvolvimento larval ocorrem da mesma forma em *D. melanogaster* contendo nocaute do homólogo de DOHH ou de eIF5A (PATEL; COSTA-MATTIOLI; SCHULZE; BELLEN, 2009). Estes estudos demonstram, assim, que a função de eIF5A no ciclo e desenvolvimento celular é essencial em todos os modelos estudados até o momento.

O ciclo celular é o processo em que as células eucarióticas se multiplicam, através da cópia de seu material genético e da transmissão destes para células novas, clones de si mesmas, sendo dividido em interfase, mitose e citocinese (ALBERTS *et al.*, 2010) (Figura 5). Durante a interfase o material genético é replicado enquanto a célula aumenta sua massa proteica, progredindo para a mitose, em que ocorre a divisão deste material genético gerando dois núcleos. Por fim ocorre a citocinese, quando a célula divide todo seu conteúdo em duas células diferentes, cada uma contendo um dos núcleos. Sendo assim, este processo biológico é importante para o funcionamento e perpetuação dos organismos eucarióticos, possuindo diversos pontos de controle para que possa prosseguir sem gerar células filhas com defeitos (ALBERTS *et al.*, 2010).

Figura 5. Esquema ilustrativo do ciclo celular. **A.** Representação da progressão da interfase culminando na mitose e citocinese. **B.** Representação da morfologia da levedura *S. cerevisiae* durante progressão do ciclo celular quando em brotamento.



Fonte: A e B; ALBERTS *et al.*, 2010 (Adaptadas)

O papel de eIF5A na manutenção do ciclo celular não está esclarecido, apesar de ser essencial para a sua progressão, e apesar de aumento em seu nível proteico estar relacionado ao desenvolvimento e manutenção de neoplasias (MATHEWS; HERSHEY, 2015). Em modelo de adenocarcinoma pancreático ductal, o nocaute de eIF5A inibe o crescimento tumoral (FUJIMURA; WRIGHT; STRNADEL; KAUSHAL *et al.*, 2014) e suprime a migração das células neoplásicas (FUJIMURA; CHOI; WYSE; STRNADEL *et al.*, 2015), associando eIF5A com manutenção de vias de organização do citoesqueleto.

Na levedura, é possível observar com mais clareza o envolvimento de eIF5A com a formação de citoesqueleto, polarização e manutenção da integridade da célula, a partir de estudos utilizando linhagens contendo mutante de eIF5A sensível a temperatura. Estas linhagens contêm proteína mutante sensível a temperatura (TS), que possui diferentes resíduos de aminoácidos em relação à selvagem, ao

invés de possuir a proteína selvagem, sendo possível causar sua desativação ao mudar a temperatura de cultivo da célula de permissiva para semi-permissiva ou restritiva. Proteína mutante *TS* apresenta funcionamento típico em temperatura permissiva e perda parcial de função em temperatura semi-permissiva, sendo esta mudança suficiente para se observar fenótipo causado por sua desativação. Na temperatura restritiva observa-se fenótipo mais agressivo.

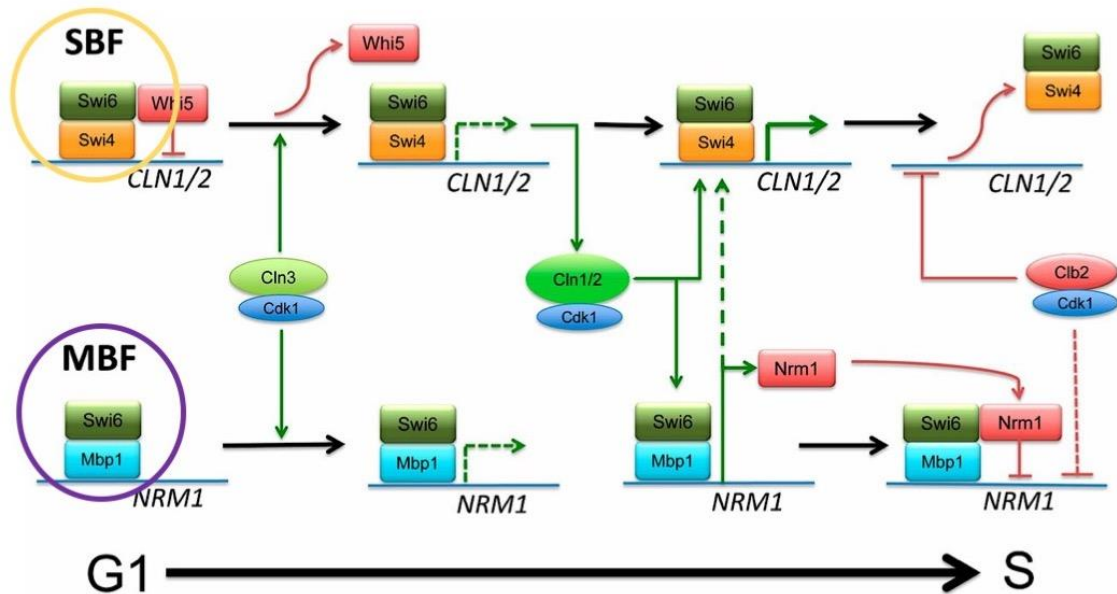
A superexpressão dos genes de manutenção da integridade da parede celular da levedura, *WSC1* e *PKC1*, suprime desativação de eIF5A em linhagem contendo o mutante *TS hyp2-1*, em temperatura restritiva (VALENTINI; CASOLARI; OLIVEIRA; SILVER *et al.*, 2002), da mesma forma que é observado em outro mutante *TS* defeito na organização dos cabos de actina e na manutenção desta via de parede, também na temperatura restritiva (CHATTERJEE; GROSS; KINZY; CHEN, 2006). Quanto ao citoesqueleto, o gene *BNI1*, que codifica para uma das forminas responsável pela organização do citoesqueleto da levedura, também é capaz de suprimir desativação do mutante *TS hyp2-1* (ZANELLI; VALENTINI, 2005).

Em relação a proteínas envolvidas com a fase G1 do ciclo celular, o gene *PCL1*, que codifica para uma homóloga de ciclina de G1, é capaz de suprimir desativação do mutante *TS hyp2-1* na temperatura restritiva (ZANELLI; VALENTINI, 2005). Já foi observado que há aumento dos níveis da ciclina Cln3 quando o gene de eIF5A é superexpresso, a partir de plasmídeo, em linhagem que ainda contém o gene selvagem íntegro (EDWARDS; LIEGEOIS; HORECKA; DEPINHO *et al.*, 1997).

A ciclina Cln3 é uma das ciclinas da fase G1, ela leva ao *start* (início) do ciclo celular em *S. cerevisiae* ativando Cdc28 (Cdk1) e formando o complexo Cln3–Cdc28 (KOCH; SCHLEIFFER; AMMERER; NASMYTH, 1996). Este complexo fosforila o repressor transcricional Whi5, levando à sua dissociação do complexo SBF e ativando-o, onde, juntamente com o complexo MBF, regula a transcrição de vários genes responsáveis pela transição G1/S (DE BRUIN; MCDONALD; KALASHNIKOVA; YATES *et al.*, 2004) (Figura 6).

Dentre as proteínas que suprimem desativação de eIF5A descritas anteriormente, Pkc1 também atua regulando o complexo SBF (MADDEN; SHEU; BAETZ; ANDREWS *et al.*, 1997) e Pcl1 possui função na modulação de Whi5 tal como Cdc28 (HUANG; KALUARACHCHI; VAN DYK; FRIESEN *et al.*, 2009).

Figura 6. Start (início) do ciclo celular em levedura. Cln3 forma complexo com Cdc28 (Cdk1) que fosforila Whi5, causando sua dissociação e então ativação do complexo SBF (circulado em amarelo), que regula expressão de genes de G1/S juntamente com o complexo MBF (circulado em roxo).



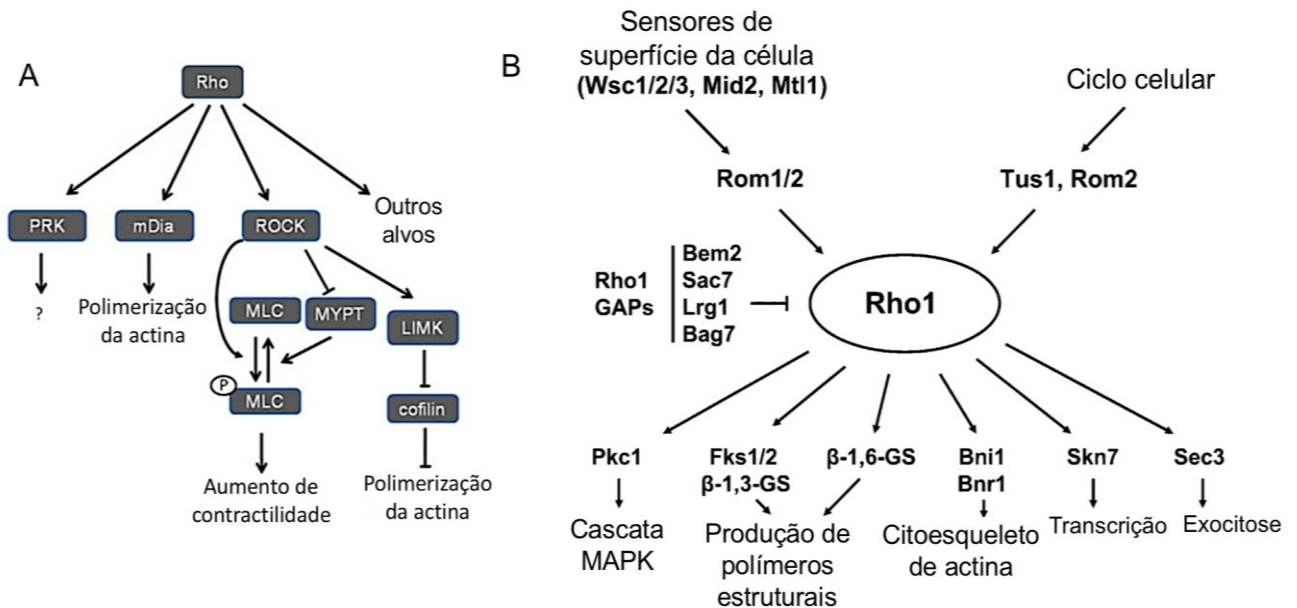
Fonte: HAASE; WITTENBERG, 2014 (Adaptada)

Observa-se, portanto, que eIF5A possui papel conservado na regulação do citoesqueleto de eucariotos e na manutenção da integridade da parede celular de levedura. Tais funções são essenciais para o desenvolvimento da célula e ocorrem durante G1 (HOWELL; LEW, 2012), o que explica o fenótipo observado quando a célula não possui eIF5A funcional.

Em mamífero, estudo utilizando modelo de adenocarcinoma pancreático ductal mostra que dentre as proteínas diminuídas durante inibição de eIF5A estão RHOA, ROCK1 e ROCK2, da via de organização do citoesqueleto e proliferação (FUJIMURA; CHOI; WYSE; STRNADEL *et al.*, 2015). A depleção de ROCK1 e ROCK2 causa aprisionamento do ciclo celular em G1 por causar diminuição, nos níveis de expressão e proteicos, de proteínas importantes para a progressão do ciclo celular (CHEN; GUERRIERO; LATHROP; SUNDARRAJ, 2008; KÜMPER; MARDAKHEH; MCCARTHY; YEO *et al.*, 2016).

A proteína RHOA de mamífero e a proteína Rho1 de levedura são homólogas (PROSSER; WENDLAND, 2012), onde Rho1 é responsável pela regulação de Pkc1 e Bni1 na levedura (LEVIN, 2011) (Figura 7).

Figura 7. Via de RHOA e Rho1. **A.** Via de RHOA em humano, onde há modulação de proteínas envolvidas na organização do citoesqueleto de actina. **B.** Via de Rho1 na levedura *S. cerevisiae* onde há modulação de proteínas envolvidas na organização do citoesqueleto de actina e de parede.



Fonte: A; RIDLEY, 2013 (Adaptada). B; LEVIN, 2011 (Adaptada)

Recentemente, ficou demonstrado que em *S. cerevisiae* a tradução de sua formina Bni1 é dependente de eIF5A, devido aos *motifs* PPP presentes em sua sequência (LI; BELDA-PALAZÓN; FERRANDO; ALEPUZ, 2014). Foi demonstrado também que eIF5A é necessária para tradução das proteínas homólogas de Bni1 em *D. melanogaster* e humano (Dia e mDia1, respectivamente) (MUÑOZ-SORIANO; DOMINGO-MUELAS; LI; GAMERO *et al.*, 2017).

O fato de eIF5A atuar na organização do citoesqueleto de actina através da tradução de Bni1 não sugere que este seja o motivo do aprisionamento em G1 quando em ausência de sua funcionalidade, visto que, diferentemente de ROCK, não há na literatura estudos que correlacionem as forminas de levedura com a progressão G1/S. Também, a relação de eIF5A com Cln3 e Pcl1 parece ser independente de sua relação com Bni1, pois ambas têm ação anterior a Bni1 em G1, além de serem moduladas por diferentes vias.

Na levedura, o fenótipo de ausência de eIF5A funcional é diferente do fenótipo de ausência das forminas. As linhagens de *S. cerevisiae* depletadas de eIF5A apresentam aumento do volume celular com número muito reduzido de células com broto (KANG; HERSHEY, 1994), e contendo apenas uma cópia de DNA genômico (estudo prévio de nosso grupo), indicando aprisionamento em G1. Por outro lado, a

ausência simultânea de função das duas forminas de *S. cerevisiae*, Bni1 e Bnr1, leva a morfologia celular de aumento de volume (IMAMURA; TANAKA; HIHARA; UMIKAWA *et al.*, 1997), apresentando pequenos brotos (YAMAMOTO; MOCHIDA; KADOTA; TAKEDA *et al.*, 2010) e mais de um núcleo (IMAMURA; TANAKA; HIHARA; UMIKAWA *et al.*, 1997), sugerindo aprisionamento posterior a fase S.

Assim, entende-se que apesar de eIF5A possuir papel importante na modulação da via do citoesqueleto de actina por diretamente traduzir forminas, esta não deve ser a única forma pela qual atua durante o ciclo celular. Portanto, para completa compreensão de sua função, seria necessário entender quais proteínas envolvidas na regulação da fase G1 têm a tradução modulada por eIF5A na levedura, pois apesar dos dados disponíveis para mamífero promoverem algum entendimento, ainda não é possível fazer afirmações contundentes de seu mecanismo de ação na modulação do ciclo celular nos organismos estudados.

Como ponto de partida para avaliar quais proteínas relevantes para progressão do ciclo celular podem ter sua tradução dependente de eIF5A, foi analisado o perfil proteômico diferencial de linhagens contendo o mutante *TS hyp2-3* de eIF5A em relação a linhagens contendo a proteína selvagem, gerado por nosso grupo (BARBOSA, 2019). Trata-se de um perfil proteômico celular *in vivo* realizado em larga escala, através da metodologia de *Synthetic Genetic Array* (SGA) por medida de emissão de fluorescência de GFP (*green fluorescent protein*), fusionada à ORFs de diferentes genes em coleção de linhagens de levedura.

Este perfil proteômico apresenta dados qualitativos que precisam ser validados por ensaio de *Western blot*. Seus dados foram, portanto, utilizados como direcionamento para a identificação destas proteínas, e os ensaios de *Western blot* foram realizados para confirmar seus níveis diferenciais.

6. CONCLUSÃO

A desativação de eIF5A na levedura *S. cerevisiae*, em linhagem contendo o mutante sensível a temperatura *hyp2-3*, causa diminuição dos níveis proteicos de Cka2 e Sic1, em relação a linhagem contendo eIF5A selvagem (Figura 16).

Na levedura, a diminuição dos níveis proteicos de Sic1, inibidora de CDK que regula a transição da fase G1 para S do ciclo celular, pode indicar que o aprisionamento em G1 não ocorre através das vias que atuam na regulação da estabilidade de Sic1. Enquanto a diminuição dos níveis proteicos de Cka2, componente do complexo quinase CK2, pode ser a razão do fenótipo de aprisionamento, independentemente de Sic1, visto que CK2 age na regulação de vários processos celulares e na regulação de complexos que atuam diretamente na progressão de G1.

Já a inibição da hipusinação de eIF5A, que é essencial para seu funcionamento, em linhagem de célula de camundongo *Mus musculus*, causa diferença na expressão dos genes *CCND1* (Ciclina D1), *CCND2* (Ciclina D2), *CDK4*, *CDK6*, *CDKN1A* (p21) e *E2F1* (Figura 16).

Em mamífero, as diminuições da expressão de *CCND1* (Ciclina D1), *CDK4*, *CDK6* e *E2F1* podem estar contribuindo para o aprisionamento na fase G1, visto que suas proteínas estão diretamente envolvidas na regulação da progressão de G1. Além disso, ocorre aumento na expressão de *CDKN1A*, que codifica para a inibidora de CDK p21, cuja função é impedir a progressão de G1 para S. É possível, portanto, que a diminuição da expressão dos genes diretamente envolvidos na regulação da progressão do ciclo celular e o aumento da expressão de p21 levem ao aprisionamento em G1 nos mamíferos, durante ausência de eIF5A funcional.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M. *et al.* Ciclo Celular. *In*: ALBERTS, B. *et al.* **Biologia Molecular da Célula**. 5^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. Cap. 17, p. 1053-1060.
- BANDHAKAVI, S.; MCCANN, R. O.; HANNA, D. E.; GLOVER, C. V. A positive feedback loop between protein kinase CKII and Cdc37 promotes the activity of multiple protein kinases. **J Biol Chem**, 278, n. 5, p. 2829-2836, Jan 2003a.
- BANDHAKAVI, S.; MCCANN, R. O.; HANNA, D. E.; GLOVER, C. V. Genetic interactions among ZDS1,2, CDC37, and protein kinase CK2 in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Lett**, 554, n. 3, p. 295-300, Nov 2003b.
- BANDINO, A.; GEERTS, D.; KOSTER, J.; BACHMANN, A. S. Deoxyhypusine synthase (DHPS) inhibitor GC7 induces p21/Rb-mediated inhibition of tumor cell growth and DHPS expression correlates with poor prognosis in neuroblastoma patients. **Cell Oncol (Dordr)**, 37, n. 6, p. 387-398, Dec 2014.
- BARBOSA, N. M. **Estudo do impacto da função do Fator de Início de Tradução de Eucariotos (eIF5A) no perfil proteômico celular utilizando o modelo de *Saccharomyces cerevisiae***. Orientador: ZANELLI, C. F. 2019. 99 f. (Doutorado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/183579>.
- BARZ, T.; ACKERMANN, K.; DUBOIS, G.; EILS, R. *et al.* Genome-wide expression screens indicate a global role for protein kinase CK2 in chromatin remodeling. **J Cell Sci**, 116, n. Pt 8, p. 1563-1577, Apr 2003.
- BENNE, R.; BROWN-LUEDI, M. L.; HERSHEY, J. W. Purification and characterization of protein synthesis initiation factors eIF-1, eIF-4C, eIF-4D, and eIF-5 from rabbit reticulocytes. **J Biol Chem**, 253, n. 9, p. 3070-3077, May 1978.
- BOOKOUT, A. L.; CUMMINS, C. L.; MANGELSDORF, D. J.; PESOLA, J. M. *et al.* High-throughput real-time quantitative reverse transcription PCR. **Curr Protoc Mol Biol**, Chapter 15, p. Unit 15.18, Feb 2006.
- BRUGAROLAS, J.; MOBERG, K.; BOYD, S. D.; TAYA, Y. *et al.* Inhibition of cyclin-dependent kinase 2 by p21 is necessary for retinoblastoma protein-mediated G1 arrest after gamma-irradiation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 96, n. 3, p. 1002-1007, Feb 1999.
- CAO, T. T.; LIN, S. H.; FU, L.; TANG, Z. *et al.* Eukaryotic translation initiation factor 5A2 promotes metabolic reprogramming in hepatocellular carcinoma cells. **Carcinogenesis**, 38, n. 1, p. 94-104, 01 2017.
- CHATTERJEE, I.; GROSS, S. R.; KINZY, T. G.; CHEN, K. Y. Rapid depletion of mutant eukaryotic initiation factor 5A at restrictive temperature reveals connections to actin cytoskeleton and cell cycle progression. **Mol Genet Genomics**, 275, n. 3, p. 264-276, Mar 2006.
- CHEN, J.; GUERRIERO, E.; LATHROP, K.; SUNDARRAJ, N. Rho/ROCK signaling in regulation of corneal epithelial cell cycle progression. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 49, n. 1, p. 175-183, Jan 2008.

CHERRY, J. M.; HONG, E. L.; AMUNDSEN, C.; BALAKRISHNAN, R. *et al.* Saccharomyces Genome Database: the genomics resource of budding yeast. **Nucleic Acids Res**, 40, n. Database issue, p. D700-705, Jan 2012.

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

DE ALMEIDA JR, O. P. **Potencial anti-inflamatório e antiproliferativo de compostos inibidores da enzima desoxi-hipusina sintase**. Orientador: ZANELLI, C. F. 2015. 92 f. (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/136119>.

DE ALMEIDA JR, O. P.; TOLEDO, T. R.; ROSSI, D.; ROSSETTO, D. D. B. *et al.* Hypusine modification of the ribosome-binding protein eIF5A, a target for new anti-inflammatory drugs: understanding the action of the inhibitor GC7 on a murine macrophage cell line. **Curr Pharm Des**, 20, n. 2, p. 284-292, 2014.

DE BRUIN, R. A.; MCDONALD, W. H.; KALASHNIKOVA, T. I.; YATES, J. *et al.* Cln3 activates G1-specific transcription via phosphorylation of the SBF bound repressor Whi5. **Cell**, 117, n. 7, p. 887-898, Jun 2004.

DONZÉ, O.; PICARD, D. Hsp90 binds and regulates Gcn2, the ligand-inducible kinase of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 [corrected]. **Mol Cell Biol**, 19, n. 12, p. 8422-8432, Dec 1999.

EDWARDS, M. C.; LIEGEOIS, N.; HORECKA, J.; DEPINHO, R. A. *et al.* Human CPR (cell cycle progression restoration) genes impart a Far- phenotype on yeast cells. **Genetics**, 147, n. 3, p. 1063-1076, Nov 1997.

ESCOTÉ, X.; ZAPATER, M.; CLOTET, J.; POSAS, F. Hog1 mediates cell-cycle arrest in G1 phase by the dual targeting of Sic1. **Nat Cell Biol**, 6, n. 10, p. 997-1002, Oct 2004.

EZHEVSKY, S. A.; NAGAHARA, H.; VOCERO-AKBANI, A. M.; GIUS, D. R. *et al.* Hypophosphorylation of the retinoblastoma protein (pRb) by cyclin D:Cdk4/6 complexes results in active pRb. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 94, n. 20, p. 10699-10704, Sep 1997.

FARRELL, A.; MORGAN, D. O. Cdc37 promotes the stability of protein kinases Cdc28 and Cak1. **Mol Cell Biol**, 20, n. 3, p. 749-754, Feb 2000.

FRENZ, L. M.; JOHNSON, A. L.; JOHNSTON, L. H. Rme1, which controls CLN2 expression in *Saccharomyces cerevisiae*, is a nuclear protein that is cell cycle regulated. **Mol Genet Genomics**, 266, n. 3, p. 374-384, Nov 2001.

FUJIMURA, K.; CHOI, S.; WYSE, M.; STRNADEL, J. *et al.* Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A (EIF5A) Regulates Pancreatic Cancer Metastasis by Modulating RhoA and Rho-associated Kinase (ROCK) Protein Expression Levels. **J Biol Chem**, 290, n. 50, p. 29907-29919, Dec 2015.

FUJIMURA, K.; WRIGHT, T.; STRNADEL, J.; KAUSHAL, S. *et al.* A hypusine-eIF5A-PEAK1 switch regulates the pathogenesis of pancreatic cancer. **Cancer Res**, 74, n. 22, p. 6671-6681, Nov 2014.

GALLAGHER, S. R. One-dimensional SDS gel electrophoresis of proteins. **Curr Protoc Mol Biol**, Chapter 10, p. Unit 10.12A., Jan 2012.

GALVÃO, F. C. **Caracterização funcional do fator da tradução eIF5A por meio de interações genéticas**. Orientador: VALENTINI, S. R. 2015. 91 f. (Doutorado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/132162>.

GERBER, M. R.; FARRELL, A.; DESHAIES, R. J.; HERSKOWITZ, I. *et al.* Cdc37 is required for association of the protein kinase Cdc28 with G1 and mitotic cyclins. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 92, n. 10, p. 4651-4655, May 1995.

GHAEMMAGHAMI, S.; HUH, W. K.; BOWER, K.; HOWSON, R. W. *et al.* Global analysis of protein expression in yeast. **Nature**, 425, n. 6959, p. 737-741, Oct 2003.

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

GUTIERREZ, E.; SHIN, B. S.; WOOLSTENHULME, C. J.; KIM, J. R. *et al.* eIF5A promotes translation of polyproline motifs. **Mol Cell**, 51, n. 1, p. 35-45, Jul 2013.

GYENIS, L.; LITCHFIELD, D. W. The emerging CK2 interactome: insights into the regulation and functions of CK2. **Mol Cell Biochem**, 316, n. 1-2, p. 5-14, Sep 2008.

GÖTTERT, H.; MATTIAZZI USAJ, M.; ROSEBROCK, A. P.; ANDREWS, B. J. Reporter-Based Synthetic Genetic Array Analysis: A Functional Genomics Approach for Investigating Transcript or Protein Abundance Using Fluorescent Proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. **Methods Mol Biol**, 1672, p. 613-629, 2018.

HAASE, S. B.; WITTENBERG, C. Topology and control of the cell-cycle-regulated transcriptional circuitry. **Genetics**, 196, n. 1, p. 65-90, Jan 2014.

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

HANAZAWA, M.; KAWASAKI, I.; KUNITOMO, H.; GENGYO-ANDO, K. *et al.* The *Caenorhabditis elegans* eukaryotic initiation factor 5A homologue, IFF-1, is required for germ cell proliferation, gametogenesis and localization of the P-granule component PGL-1. **Mech Dev**, 121, n. 3, p. 213-224, Mar 2004.

HANNA, D. E.; RETHINASWAMY, A.; GLOVER, C. V. Casein kinase II is required for cell cycle progression during G1 and G2/M in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem**, 270, n. 43, p. 25905-25914, Oct 1995.

HISAMOTO, N.; SUGIMOTO, K.; MATSUMOTO, K. The Glc7 type 1 protein phosphatase of *Saccharomyces cerevisiae* is required for cell cycle progression in G2/M. **Mol Cell Biol**, 14, n. 5, p. 3158-3165, May 1994.

HOWELL, A. S.; LEW, D. J. Morphogenesis and the cell cycle. **Genetics**, 190, n. 1, p. 51-77, Jan 2012.

HUANG, D.; KALUARACHCHI, S.; VAN DYK, D.; FRIESEN, H. *et al.* Dual regulation by pairs of cyclin-dependent protein kinases and histone deacetylases controls G1 transcription in budding yeast. **PLoS Biol**, 7, n. 9, p. e1000188, Sep 2009.

IMAMURA, H.; TANAKA, K.; HIHARA, T.; UMIKAWA, M. *et al.* Bni1p and Bnr1p: downstream targets of the Rho family small G-proteins which interact with profilin and regulate actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO J**, 16, n. 10, p. 2745-2755, May 1997.

KANEHISA, M.; SATO, Y.; FURUMICHI, M.; MORISHIMA, K. *et al.* New approach for understanding genome variations in KEGG. **Nucleic Acids Res**, 47, n. D1, p. D590-D595, Jan 2019. Disponível em: <https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>.

KANG, H. A.; HERSHEY, J. W. Effect of initiation factor eIF-5A depletion on protein synthesis and proliferation of *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem**, 269, n. 6, p. 3934-3940, Feb 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**, 268, n. 20, p. 14750-14756, Jul 1993.

KANG, K. R. Association and Phosphorylation of Deoxyhypusine Synthase with CK2. **Key Eng Mat**, 277-279, p. 102-106, 2005.

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

KEMPER, W. M.; BERRY, K. W.; MERRICK, W. C. Purification and properties of rabbit reticulocyte protein synthesis initiation factors M2Balpha and M2Bbeta. **J Biol Chem**, 251, n. 18, p. 5551-5557, Sep 1976.

KNOTT, S. R.; PEACE, J. M.; OSTROW, A. Z.; GAN, Y. *et al.* Forkhead transcription factors establish origin timing and long-range clustering in *S. cerevisiae*. **Cell**, 148, n. 1-2, p. 99-111, Jan 2012.

KOCH, C.; MOLL, T.; NEUBERG, M.; AHORN, H. *et al.* A role for the transcription factors Mbp1 and Swi4 in progression from G1 to S phase. **Science**, 261, n. 5128, p. 1551-1557, Sep 1993.

KOCH, C.; SCHLEIFFER, A.; AMMERER, G.; NASMYTH, K. Switching transcription on and off during the yeast cell cycle: Cln/Cdc28 kinases activate bound transcription factor SBF (Swi4/Swi6) at start, whereas Clb/Cdc28 kinases displace it from the promoter in G2. **Genes Dev**, 10, n. 2, p. 129-141, Jan 1996.

KWON, A. T.; ARENILLAS, D. J.; WORSLEY HUNT, R.; WASSERMAN, W. W. oPOSSUM-3: advanced analysis of regulatory motif over-representation across genes or ChIP-Seq datasets. **G3 (Bethesda)**, 2, n. 9, p. 987-1002, Sep 2012. Disponível em: <http://opossum.cisreg.ca/oPOSSUM3/>.

KÜMPER, S.; MARDAKHEH, F. K.; MCCARTHY, A.; YEO, M. *et al.* Rho-associated kinase (ROCK) function is essential for cell cycle progression, senescence and tumorigenesis. **Elife**, 5, p. e12994, Jan 2016.

LEVIN, D. E. Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. **Genetics**, 189, n. 4, p. 1145-1175, Dec 2011.

LI, T.; BELDA-PALAZÓN, B.; FERRANDO, A.; ALEPUZ, P. Fertility and polarized cell growth depends on eIF5A for translation of polyproline-rich formins in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, 197, n. 4, p. 1191-1200, Aug 2014.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, 25, n. 4, p. 402-408, Dec 2001.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, 193, n. 1, p. 265-275, Nov 1951.

LUNDBERG, A. S.; WEINBERG, R. A. Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. **Mol Cell Biol**, 18, n. 2, p. 753-761, Feb 1998.

MADDEN, K.; SHEU, Y. J.; BAETZ, K.; ANDREWS, B. *et al.* SBF cell cycle regulator as a target of the yeast PKC-MAP kinase pathway. **Science**, 275, n. 5307, p. 1781-1784, Mar 1997.

MANDAL, A.; MANDAL, S.; PARK, M. H. Global quantitative proteomics reveal up-regulation of endoplasmic reticulum stress response proteins upon depletion of eIF5A in HeLa cells. **Sci Rep**, 6, p. 25795, May 2016.

MATHEWS, M. B.; HERSHEY, J. W. The translation factor eIF5A and human cancer. **Biochim Biophys Acta**, 1849, n. 7, p. 836-844, Jul 2015.

MENACHO-MARQUEZ, M.; PEREZ-VALLE, J.; ARIÑO, J.; GADEA, J. *et al.* Gcn2p regulates a G1/S cell cycle checkpoint in response to DNA damage. **Cell Cycle**, 6, n. 18, p. 2302-2305, Sep 2007.

MEYYAPPAN, M.; WONG, H.; HULL, C.; RIABOWOL, K. T. Increased expression of cyclin D2 during multiple states of growth arrest in primary and established cells. **Mol Cell Biol**, 18, n. 6, p. 3163-3172, Jun 1998.

MORGAN, D. O. **The cell cycle : principles of control**. London: New Science Press Ltd in association with Oxford University Press, 2007. Cap. 10, p. 196-225.

MUÑOZ-SORIANO, V.; DOMINGO-MUELAS, A.; LI, T.; GAMERO, E. *et al.* Evolutionary conserved role of eukaryotic translation factor eIF5A in the regulation of actin-nucleating formins. **Sci Rep**, 7, n. 1, p. 9580, Aug 2017.

NCBI. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. **Nucleic Acids Res**, 46, n. D1, p. D8-D13, 01 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

NI, D.; XU, P.; GALLAGHER, S. Immunoblotting and Immunodetection. **Curr Protoc Cell Biol**, 74, p. 6.2.1-6.2.37, Mar 2017.

NISHIMURA, K.; LEE, S. B.; PARK, J. H.; PARK, M. H. Essential role of eIF5A-1 and deoxyhypusine synthase in mouse embryonic development. **Amino Acids**, 42, n. 2-3, p. 703-710, Feb 2012.

ORII, M.; KONO, K.; WEN, H. I.; NAKANISHI, M. PP1-Dependent Formin Bnr1 Dephosphorylation and Delocalization from a Cell Division Site. **PLoS One**, 11, n. 1, p. e0146941, 2016.

PARK, M. H.; NISHIMURA, K.; ZANELLI, C. F.; VALENTINI, S. R. Functional significance of eIF5A and its hypusine modification in eukaryotes. **Amino Acids**, 38, n. 2, p. 491-500, Feb 2010.

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**, 269, n. 45, p. 27827-27832, Nov 1994.

PARK, M. H.; WOLFF, E. C.; SMIT-MCBRIDE, Z.; HERSHEY, J. W. *et al.* Comparison of the activities of variant forms of eIF-4D. The requirement for hypusine or deoxyhypusine. **J Biol Chem**, 266, n. 13, p. 7988-7994, May 1991.

PATEL, P. H.; COSTA-MATTIOLI, M.; SCHULZE, K. L.; BELLEN, H. J. The *Drosophila* deoxyhypusine hydroxylase homologue nero and its target eIF5A are required for cell growth and the regulation of autophagy. **J Cell Biol**, 185, n. 7, p. 1181-1194, Jun 2009.

PROSSER, D. C.; WENDLAND, B. Conserved roles for yeast Rho1 and mammalian RhoA GTPases in clathrin-independent endocytosis. **Small GTPases**, 3, n. 4, p. 229-235, 2012 Oct-Dec 2012.

RASBAND, W. S. **ImageJ**. Versão 1.8.0_172. Bethesda, Maryland, USA: U. S. National Institutes of Health, 1997-2018. Disponível em: <https://imagej.nih.gov/ij/>.

RIDLEY, A. J. RhoA, RhoB and RhoC have different roles in cancer cell migration. **J Microsc**, 251, n. 3, p. 242-249, Sep 2013.

ROSSI, D.; KUROSHU, R.; ZANELLI, C. F.; VALENTINI, S. R. eIF5A and EF-P: two unique translation factors are now traveling the same road. **Wiley Interdiscip Rev RNA**, 5, n. 2, p. 209-222, 2014 Mar-Apr 2014.

ROSSIO, V.; YOSHIDA, S. Spatial regulation of Cdc55-PP2A by Zds1/Zds2 controls mitotic entry and mitotic exit in budding yeast. **J Cell Biol**, 193, n. 3, p. 445-454, May 2011.

RUSSO, G. L.; VAN DEN BOS, C.; SUTTON, A.; COCCETTI, P. *et al.* Phosphorylation of Cdc28 and regulation of cell size by the protein kinase CKII in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochem J**, 351, n. Pt 1, p. 143-150, Oct 2000.

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

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

SCHULLER, A. P.; GREEN, R. Roadblocks and resolutions in eukaryotic translation. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 19, n. 8, p. 526-541, 08 2018.

SCHULLER, A. P.; WU, C. C.; DEVER, T. E.; BUSKIRK, A. R. *et al.* eIF5A Functions Globally in Translation Elongation and Termination. **Mol Cell**, 66, n. 2, p. 194-205.e195, Apr 2017.

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**, 268, n. 19, p. 14018-14025, Jul 1993.

SCHWOB, E.; BÖHM, T.; MENDENHALL, M. D.; NASMYTH, K. The B-type cyclin kinase inhibitor p40SIC1 controls the G1 to S transition in *S. cerevisiae*. **Cell**, 79, n. 2, p. 233-244, Oct 1994.

SIEGMUND, R. F.; NASMYTH, K. A. The *Saccharomyces cerevisiae* Start-specific transcription factor Swi4 interacts through the ankyrin repeats with the mitotic Clb2/Cdc28 kinase and through its conserved carboxy terminus with Swi6. **Mol Cell Biol**, 16, n. 6, p. 2647-2655, Jun 1996.

SIEVERS, F.; WILM, A.; DINEEN, D.; GIBSON, T. J. *et al.* Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Mol Syst Biol**, 7, p. 539, Oct 2011. Disponível em: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>.

STEPANOVA, L.; LENG, X.; HARPER, J. W. Analysis of mammalian Cdc37, a protein kinase targeting subunit of heat shock protein 90. **Methods Enzymol**, 283, p. 220-229, 1997.

STUART, D.; WITTENBERG, C. CLN3, not positive feedback, determines the timing of CLN2 transcription in cycling cells. **Genes Dev**, 9, n. 22, p. 2780-2794, Nov 1995.

SUTTON, A.; FREIMAN, R. The Cak1p protein kinase is required at G1/S and G2/M in the budding yeast cell cycle. **Genetics**, 147, n. 1, p. 57-71, Sep 1997.

TEIXEIRA, M. C.; MONTEIRO, P. T.; PALMA, M.; COSTA, C. *et al.* YEASTRACT: an upgraded database for the analysis of transcription regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nucleic Acids Res**, 46, n. D1, p. D348-D353, 01 2018. Disponível em: <http://www.yeasttract.com>.

TOYN, J. H.; JOHNSON, A. L.; DONOVAN, J. D.; TOONE, W. M. *et al.* The Swi5 transcription factor of *Saccharomyces cerevisiae* has a role in exit from mitosis through induction of the cdk-inhibitor Sic1 in telophase. **Genetics**, 145, n. 1, p. 85-96, Jan 1997.

TRECO, D. A.; LUNDBLAD, V. Preparation of yeast media. **Curr Protoc Mol Biol**, Chapter 13, p. Unit13.11, May 2001.

TRECO, D. A.; WINSTON, F. Growth and manipulation of yeast. **Curr Protoc Mol Biol**, Chapter 13, p. Unit 13.12, Apr 2008.

TRIPODI, F.; NICASTRO, R.; BUSNELLI, S.; CIRULLI, C. *et al.* Protein kinase CK2 holoenzyme promotes start-specific transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryot Cell**, 12, n. 9, p. 1271-1280, Sep 2013.

TRIPODI, F.; ZINZALLA, V.; VANONI, M.; ALBERGHINA, L. *et al.* In CK2 inactivated cells the cyclin dependent kinase inhibitor Sic1 is involved in cell-cycle arrest before the onset of S phase. **Biochem Biophys Res Commun**, 359, n. 4, p. 921-927, Aug 2007.

UNTERGASSER, A.; NIJVEEN, H.; RAO, X.; BISSELING, T. *et al.* Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Res**, 35, n. Web Server issue, p. W71-74, Jul 2007. Disponível em: <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>.

USAJ, M.; TAN, Y.; WANG, W.; VANDERSLUIS, B. *et al.* TheCellMap.org: A Web-Accessible Database for Visualizing and Mining the Global Yeast Genetic Interaction Network. **G3 (Bethesda)**, 7, n. 5, p. 1539-1549, 05 2017. Disponível em: <https://thecellmap.org>.

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

VERMA, R.; ANNAN, R. S.; HUDDLESTON, M. J.; CARR, S. A. *et al.* Phosphorylation of Sic1p by G1 Cdk required for its degradation and entry into S phase. **Science**, 278, n. 5337, p. 455-460, Oct 1997.

WEK, S. A.; ZHU, S.; WEK, R. C. The histidyl-tRNA synthetase-related sequence in the eIF-2 alpha protein kinase GCN2 interacts with tRNA and is required for activation in response to starvation for different amino acids. **Mol Cell Biol**, 15, n. 8, p. 4497-4506, Aug 1995.

WIJNEN, H.; FUTCHER, B. Genetic analysis of the shared role of CLN3 and BCK2 at the G(1)-S transition in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, 153, n. 3, p. 1131-1143, Nov 1999.

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

YAMAMOTO, T.; MOCHIDA, J.; KADOTA, J.; TAKEDA, M. *et al.* Initial polarized bud growth by endocytic recycling in the absence of actin cable-dependent vesicle transport in yeast. **Mol Biol Cell**, 21, n. 7, p. 1237-1252, Apr 2010.

ZAMBELLI, F.; PESOLE, G.; PAVESI, G. Pscan: finding over-represented transcription factor binding site motifs in sequences from co-regulated or co-expressed genes. **Nucleic Acids Res**, 37, n. Web Server issue, p. W247-252, Jul 2009. Disponível em: <http://159.149.160.88/pscan/>.

ZANELLI, C. F.; MARAGNO, A. L.; GREGIO, A. P.; KOMILI, S. *et al.* eIF5A binds to translational machinery components and affects translation in yeast. **Biochem Biophys Res Commun**, 348, n. 4, p. 1358-1366, Oct 2006.

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**, 171, n. 4, p. 1571-1581, Dec 2005.

ZINZALLA, V.; GRAZIOLA, M.; MASTRIANI, A.; VANONI, M. *et al.* Rapamycin-mediated G1 arrest involves regulation of the Cdk inhibitor Sic1 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Microbiol**, 63, n. 5, p. 1482-1494, Mar 2007.

ŁEBSKA, M.; CIESIELSKI, A.; SZYMONA, L.; GODECKA, L. *et al.* Phosphorylation of maize eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) by casein kinase 2: identification of phosphorylated residue and influence on intracellular localization of eIF5A. **J Biol Chem**, 285, n. 9, p. 6217-6226, Feb 2010.