

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

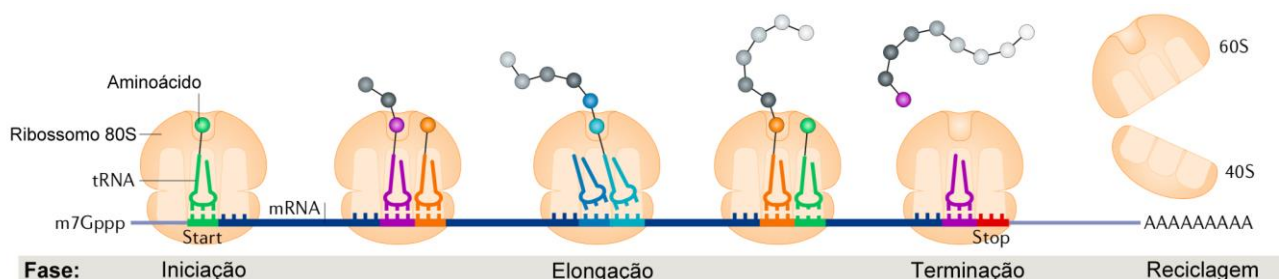
1. INTRODUÇÃO

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)

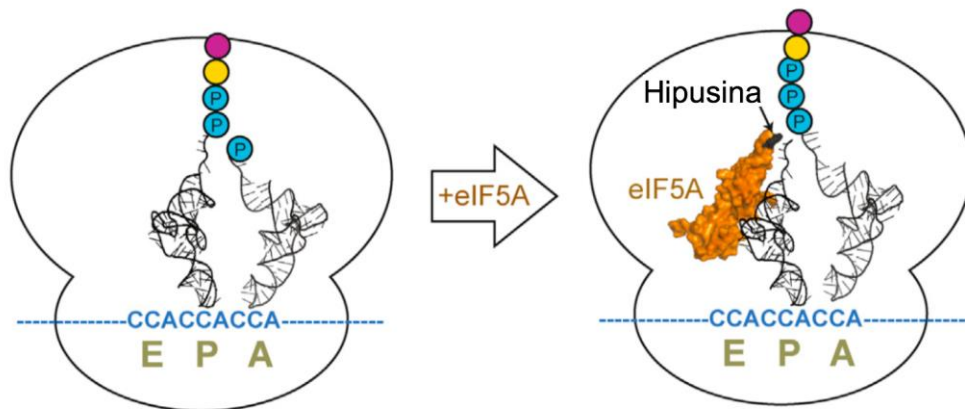
Durante a tradução, eIF5A se liga a uma região da subunidade maior do ribossomo 80S, entre os sítios P e E, com alguma sobreposição ao sítio E (GUTIERREZ; SHIN; WOOLSTENHULME; KIM *et al.*, 2013) (Figura 2). Ela atua durante a elongação auxiliando na tradução de sequências ricas em prolina, que, quando 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

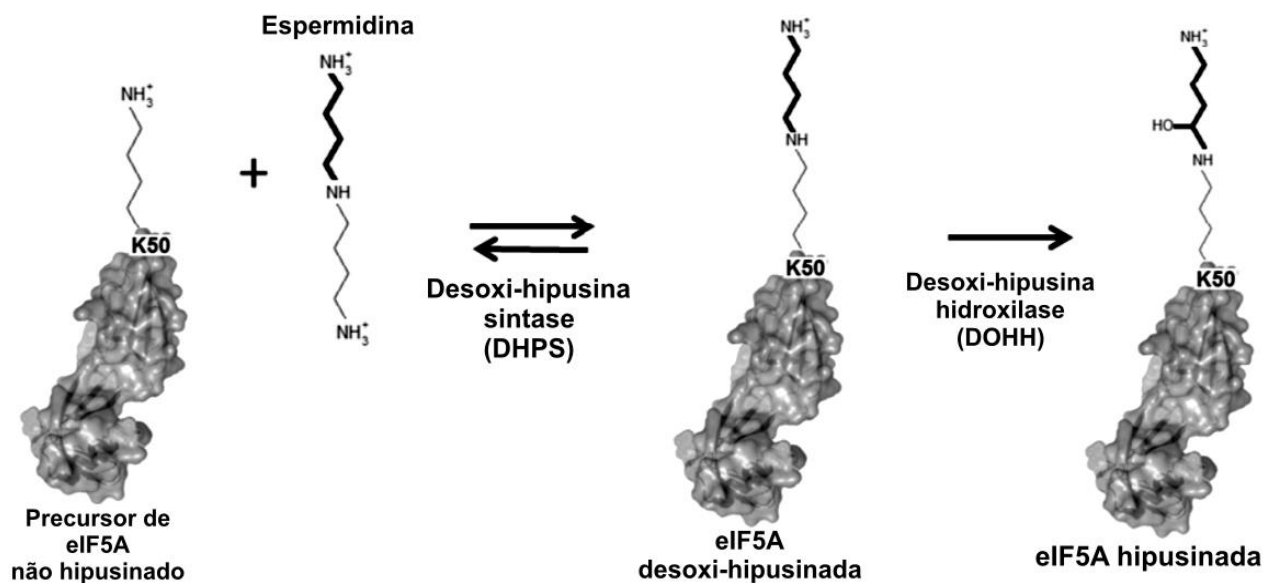
levedura) e, em seguida, pela enzima desoxi-hipusina hidroxilase (DOHH em humano e Lia1 na levedura), levando eIF5A à sua maturação (PARK; NISHIMURA; ZANELLI; VALENTINI, 2010) (Figura 3).

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	GIDIFTGKKYEDICPSTHNMDVPNIKRNDFOQLIGIQDGYLSLLQDSGEVREDLRLPEGDL	
Sc	AIDIFTGKKLEDLSPSTHNMEVPVVKRNEYQLLDIDDGFLSLMNMMDGDTKDDVKAPEGEL	
	.***** **:.*****:** :***:***:*.***:***:~.***:~***:~***:~	
Hs	GKEIEQKYDCGEEILITVLSAMTEEA AVAIKAMAK--	154
Sc	GDSLQTA FDEGKDLMTIISAMGEEAAISFKEAARTD	157
	.~:~ : *~:~:~:~:~* ~~~~:~* *	

Fonte: Autoria própria

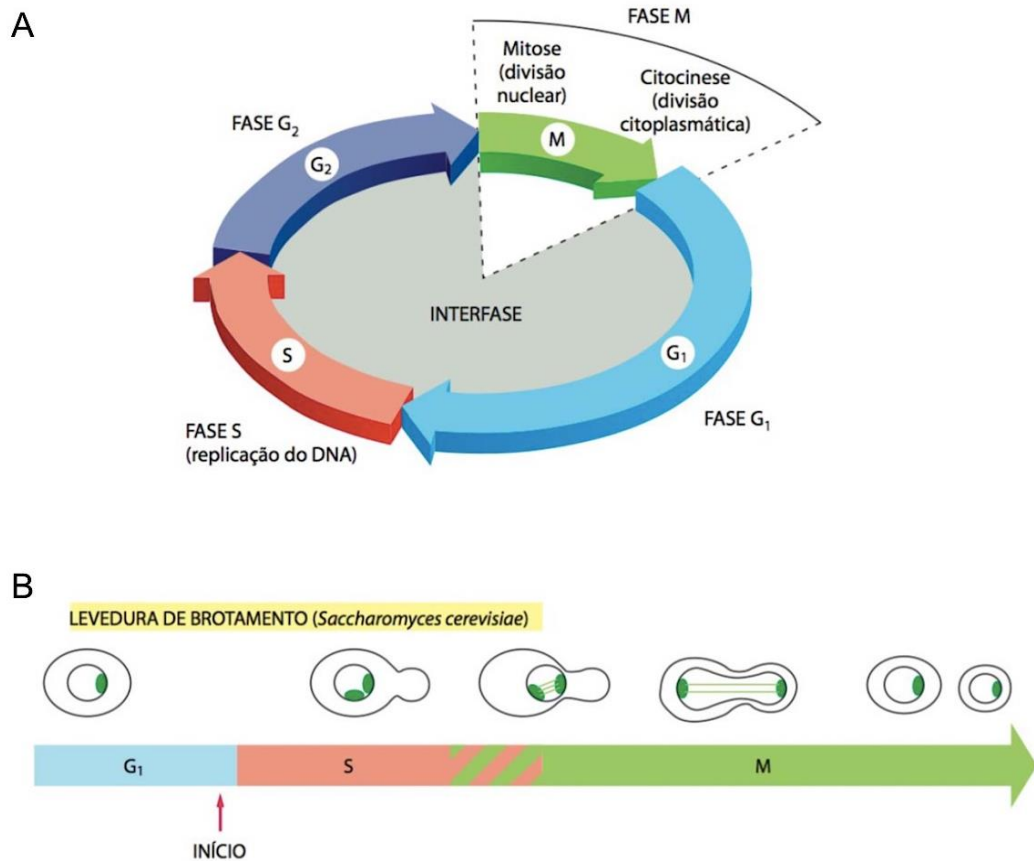
No contexto celular, a função de eIF5A está relacionada à proliferação, crescimento e desenvolvimento das células. Sua depleção causa inibição do crescimento de *S. cerevisiae* (KANG; HERSHEY, 1994), ocorrendo aprisionamento na fase G1 da interfase do ciclo celular (CHATTERJEE; GROSS; KINZY; CHEN, 2006). O bloqueio da hipusinação em células de mamíferos leva a 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.

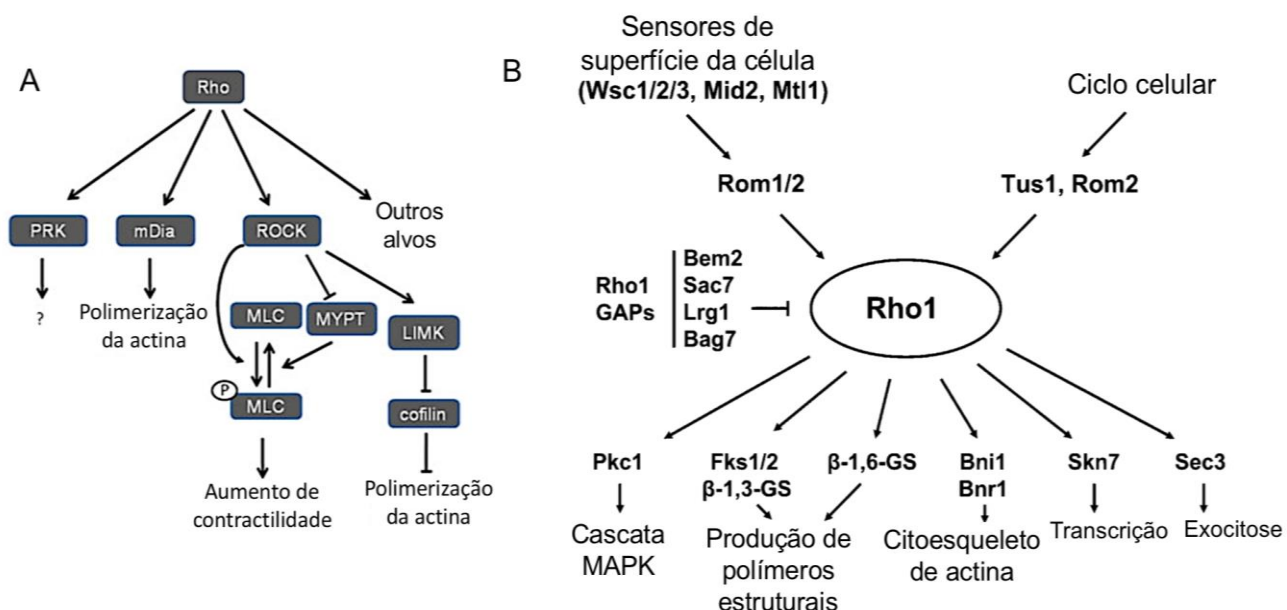
A superexpressão dos genes de manutenção da integridade da parede celular da levedura, *WSC1* e *PKC1*, suprime desativação de eIF5A em linhagem contendo o mutante *TS hyp2-1*, em temperatura restritiva (VALENTINI; CASOLARI; OLIVEIRA; SILVER *et al.*, 2002), da mesma forma que é observado em outro mutante *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 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.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Rastrear as proteínas relevantes para a fase G1 do ciclo celular de *Saccharomyces cerevisiae* que estão diferencialmente presentes durante desativação de eIF5A, em linhagem contendo o mutante sensível a temperatura *hyp2-3*, cuja tradução pode depender dela.

2.2. Objetivos específicos

- 2.2.1. Escolha prévia das proteínas partindo de análise de perfil proteômico diferencial de linhagem contendo eIF5A selvagem *versus* linhagem contendo mutante.
- 2.2.2. Análise de perfil transcricional comparativo de linhagem contendo eIF5A selvagem *versus* linhagem contendo mutante.
- 2.2.3. Validação por metodologia de *Western blot* dos níveis das proteínas escolhidas.

3. MATERIAL

3.1. Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas

Foram utilizadas linhagens de *S. cerevisiae* contendo eIF5A selvagem e linhagens contendo a proteína mutante, cruzadas com coleção *ORF-TAP* (GHAEMMAGHAMI; HUH; BOWER; HOWSON *et al.*, 2003). O genótipo das linhagens está descrito na Tabela 1.

Nestas linhagens, o alelo selvagem *HIS3* confere prototrofia para histidina e atua como marcador dominante, na presença do nocaute *his3Δ*, para seleção de linhagens que contenham a construção *ORF-TAP*. A *tag* TAP é uma construção composta de peptídeo ligante de calmodulina, sítio de clivagem reconhecido por TEV, e dois domínios da proteína A de *Staphylococcus aureus* para ligação à imunoglobulina G. Esta *tag* pode ser utilizada para ensaios de *Western blot*.

O marcador *natMX4* corresponde ao cassete (região codificadora do marcador flanqueada por promotor e região terminadora de genes constitutivos de *S. cerevisiae*) contendo a região codificadora de *nat1* de *Streptomyces noursei*, que confere resistência a nourseotricina para seleção de linhagens que contenham os genes *query HYP2* ou *hyp2-3* nas linhagens.

Os marcadores recessivos *can1Δ* e *lyp1Δ* promovem resistência a canavanina e a tialisina, respectivamente. O alelo selvagem *LEU2* promove prototrofia para leucina (e atua como marcador dominante na presença do nocaute *leu2Δ*), sendo expresso apenas em haploides *MAT_a*, devido a construção *STE2pr*. Estes marcadores são necessários para seleção de haploides em larga escala e de forma independente de separação de esporos.

A construção *TDH3pr-E2Crimson* promove expressão constitutiva da variante E2Crimson de RFP (*Red Fluorescent Protein*). O marcador *hphMX* corresponde ao cassete contendo a região codificadora de *hph* de *Klebsiella pneumonia*, que confere resistência a higromicina B para seleção de linhagens que contenham E2Crimson.

As linhagens *query MAT_α* contendo *HYP2* e *hyp2-3* foram construídas por nosso grupo (GALVÃO, 2015). A coleção *MAT_a ORF-TAP* (GHAEMMAGHAMI; HUH; BOWER; HOWSON *et al.*, 2003) foi obtida de B. J. Andrews (*University of Toronto*, Canadá). O cruzamento entre elas foi realizado pelo grupo, originando as coleções descritas na Tabela 1.

O mutante sensível a temperatura *hyp2-3* foi obtido e caracterizado anteriormente pelo grupo, onde há desativação de eIF5A em temperatura de 30°C ou superior (VALENTINI; CASOLARI; OLIVEIRA; SILVER *et al.*, 2002).

Tabela 1. Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas neste trabalho.

Linhagem	Genótipo	Origem
Coleção TAP – selvagem <i>HYP2</i>	<i>MATα</i> ORF-TAP::HIS3 <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 lyp1Δ can1pr::TDH3pr-E2Crimson::hphMX::can1Δ::STE2pr-LEU2 HYP2::natMX4</i>	Coleção do laboratório
Coleção TAP – mutante <i>hyp2-3</i>	<i>MATα</i> ORF-TAP::HIS3 <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 lyp1Δ can1pr::TDH3pr-E2Crimson::hphMX::can1Δ::STE2pr-LEU2 hyp2-3::natMX4</i>	Coleção do laboratório

3.2. Linhagem de cultura celular de mamífero utilizada

A linhagem da cultura celular de mamífero utilizada neste trabalho está descrita a seguir na Tabela 2.

Tabela 2. Linhagem de cultura celular de mamífero utilizada.

Linhagem	Descrição	Origem
RAW 264.7	Linhagem de macrófagos de camundongo (<i>Mus musculus</i>) BALB, obtida de animal infectado com vírus tumoral maligno (<i>Abelson murine leukemia virus</i>)	ATCC® Cat. TIB-71™ Obtida do Banco Células do Rio de Janeiro (BCRJ – Cat. 0212)

3.3. Anticorpos utilizados

Os anticorpos utilizados neste trabalho para os ensaios de *Western blot* estão descritos a seguir na Tabela 3.

Tabela 3. Anticorpos utilizados neste trabalho.

Nome	Características	Origem
Peroxidase Anti-Peroxidase	Reconhece a porção da proteína A da tag TAP Imunoglobulina G conjugado à peroxidase Diluição 1:4.000	Sigma-Aldrich Cat. P1291
Anti-Rpl5	Reconhece a proteína ribossomal Rpl5 de levedura Imunoglobulina G de coelho Diluição 1:20.000	Coleção do laboratório (ZANELLI; MARAGNO; GREGIO; KOMILI <i>et al.</i> , 2006)
Anti-Hyp2	Reconhece a proteína eIF5A de levedura Imunoglobulina G de coelho Diluição 1:15.000	Obtido de P. Silver (VALENTINI; CASOLARI; OLIVEIRA; SILVER <i>et al.</i> , 2002)
Anti-IgG de coelho-Peroxidase	Reconhece porção conservada de Imunoglobulina G de coelho Conjugado à peroxidase Diluição 1:20.000	Sigma-Aldrich Cat. A9169

3.4. Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados nos ensaios de qRT-PCR em tempo real estão descritos a seguir na Tabela 4. As sequências dos genes de interesse foram obtidas a partir dos depósitos no banco de dados *online Gene* do NCBI (NCBI, 2018).

Tabela 4. Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados nos ensaios de qRT-PCR em tempo real.

Gene alvo	SEQUÊNCIA DO OLIGONUCLEOTÍDEO <i>Forward</i>	SEQUÊNCIA DO OLIGONUCLEOTÍDEO <i>Reverse</i>
28S	TTGAAAATCCGGGGGAGAG	ACATTGTTCCAACATGCCAG
B2M	ACTGAATTCACCCCCACTGA	TCACATGTCTCGATCCCAGT
CCND1	CCCAACAACCTTCCTCTCCTG	TCCAGAAGGGCTTCAATCTG
CCND2	AGTTCCGTCAAGAGCAGCAT	GAATGGCTTCCTCACAGGTC
CCND3	CCTGCAGCGAGAGAGAGAAT	TTCTGGAAGGTCTTGCTGGT
CDK4	CAATGTTGTACGGCTGATGG	GGAGGTGCTTTGTCCAGGTA
CDK6	AGAAGTCCTGCTCCAGTCCA	CACGTCTGAACTTCCACGAA
CDKN1A	AGGAGGAGCATGAATGGAGA	GGACATCACCAGGATTGGAC
E2F1	ACACAGCTGCAACTGCTTTC	CCATCTGTTCTGCAGGGTCT
EIF5A	GCCATGCCAAGGTCCATCTG	CATTCCGTTTGATGTTGGGGAC
RB1	GCAAACGTGGTTACTCCACA	GATGGCTGATCACTTGCAGA

4. METODOLOGIA

4.1. Cultivo das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*

O preparo dos meios de cultura utilizados, o cultivo e a manutenção das linhagens foram realizados conforme procedimentos padrão já estabelecidos (TRECO; LUNDBLAD, 2001; TRECO; WINSTON, 2008). As linhagens de *S. cerevisiae* das coleções TAP (descritas em 3.1) foram crescidas em meio *Synthetic Complete* (SC) sem os aminoácidos arginina, histidina, leucina e lisina, adicionado de 50 µg/mL de canavanina, 300 µg/mL de higromicina, 100 µg/mL de nourseotricina e 50 µg/mL de tialisina (GÖTTERT; MATTIAZZI USAJ; ROSEBROCK; ANDREWS, 2018).

Foram cultivadas pré-culturas das linhagens de *S. cerevisiae* selvagem e mutante a 25°C por 24 horas. Após este período, foram diluídas para densidade óptica (D.O. – leitura de absorbância feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 600 nm) de 0,035 a 0,07 e cultivadas a 25°C por 12 a 16 horas até atingir D.O. de aproximadamente e não maior que 0,8. As culturas foram diluídas para D.O. 0,2 e adicionadas de 10 µg/mL de fator α (Sigma-Aldrich Cat. T6901) para sincronização das células na fase G1 do ciclo celular (LI; BELDA-PALAZÓN; FERRANDO; ALEPUZ, 2014). As culturas foram então cultivadas a 25°C por 2 horas, centrifugadas a 4.000 xg por 5 minutos, descartado o sobrenadante contendo o fator α e as células foram lavadas uma vez com meio de cultura novo. Após essa lavagem, foi adicionado novo meio de cultura. As culturas foram, por fim, cultivadas a 33°C por 4 horas para desativação de eIF5A nas linhagens mutantes. Após o cultivo, as culturas foram centrifugadas a 12.000 xg por 5 minutos, o sobrenadante descartado e o *pellet* de células armazenado a -80°C.

4.2. Extração de proteína total de células de *S. cerevisiae*

Foi adicionado ao *pellet* de células 1 volume de tampão de lise (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, DTT 50 mM, EDTA 5 mM, Triton X-100 0,2%, fluoreto de fenilmetilsulfonil 2 mM, coquetel de inibidores de protease contendo pepstatina 5 mg/mL, leupeptina 5 mg/mL, aprotinina 5 mg/mL, antipaina 5 mg/mL, quimostatina 5 mg/mL), ressuspensão e adicionado 1 volume de contas de vidro pequenas (*Glass beads, acid-washed*, 425-600 µm 30-40 U.S. sieve – Sigma-Aldrich Cat. G8772). O

pellet foi lisado por agitação vigorosa utilizando o equipamento *FastPrep-24 Classic Instrument* (MP Biomedicals) por 3 ciclos a 20 segundos cada em velocidade máxima, a 4°C, repousando 1 minuto em gelo entre os ciclos. A solução foi centrifugada a 12.000 xg por 10 minutos para clarificar. O sobrenadante desta última centrifugação foi utilizado como extrato de proteína total celular e armazenado a -20°C.

4.3. Quantificação de concentração proteica por método de Lowry

A metodologia (LOWRY; ROSEBROUGH; FARR; RANDALL, 1951) foi realizada seguindo as indicações do fabricante do *kit DC™ Protein Assay* (Bio-Rad Cat. 500-0116). A curva de calibração foi preparada com albumina de soro bovina (BSA – Sigma-Aldrich Cat. A7906) nas concentrações 0,1875 mg/mL, 0,375 mg/mL, 0,750 mg/mL e 1,5 mg/mL, adicionando 25 µL de cada solução em 125 µL de reagente A (solução alcalina de tartarato de cobre) e então 1 mL de reagente B (reagente de Folin), o branco foi preparado adicionando 25 µL de água Milli-Q e todas as soluções foram incubadas no escuro por 15 minutos. Após calibração da curva, as amostras foram quantificadas preparando diluição adequada de até 25 µL em água Milli-Q, adicionando 125 µL de reagente A e então 1 mL de reagente B, e o branco preparado utilizando tampão de lise na mesma diluição das amostras, em seguida todas as soluções foram incubadas no escuro por 15 minutos. As leituras de absorbância foram feitas no espectrofotômetro *DU® 800* (Beckman-Coulter), em comprimento de onda 750 nm. A quantificação é considerada confiável quando resultado estiver dentro dos pontos utilizados para calibrar a curva.

4.4. Eletroforese de proteína em gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE)

A metodologia foi seguida a partir da já padronizada (GALLAGHER, 2012). Foram utilizadas placas de vidro *Mini-PROTEAN III* (Bio-Rad) com espessura de 1,0 mm. O gel de resolução foi preparado em concentração de 12%, utilizando água Milli-Q, acrilamida:bis-acrilamida 30% 29:1, Tris 1,5 M pH 8,8, SDS 10%, persulfato de amônio 10%, TEMED. Após polimerização, o gel de empilhamento foi preparado utilizando os mesmos reagentes, porém Tris-HCl 1,0 M pH 6,8.

O aparato foi montado em cuba para eletroforese de proteína (Bio-Rad). As amostras foram preparadas contendo 10 a 20 µg de proteína total, em que foi

adicionado tampão de carregamento (Tris-HCl 40 mM pH 6,8, SDS 2%, glicerol 8%, DTT 100 mM, azul de bromofenol 0,1%) e fervidas a 95°C por 5 minutos. A cuba foi preenchida com tampão de corrida 1x pH 8,3 (Tris-HCl 25 mM, glicina 250 mM, SDS 0,1%) e, após fervura, as amostras preparadas foram carregadas nos poços do gel e a eletroforese realizada entre 90 V e 120 V (Bio-Rad).

4.5. Western blot

4.5.1. Ensaio de Western blot

A metodologia foi seguida a partir da já padronizada (NI; XU; GALLAGHER, 2017). As proteínas resolvidas em gel de SDS-poliacrilamida (descrito em 4.4) foram transferidas para membrana de nitrocelulose 0,2 μ m (Bio-Rad Cat. 1620112) utilizando o equipamento *Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell* (Bio-Rad) e tampão de transferência pH 8,3 (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%). Após transferência, a membrana foi corada com solução de *Ponceau S* (*Ponceau S* 1 mg/mL – Sigma-Aldrich Cat. P3504, ácido acético 5%) para confirmar a eficiência da transferência. A membrana foi bloqueada com solução de leite desnatado 10% em PBST (PBS – NaCl 1,4M, KCl 27mM, Na₂HPO₄ 0,1M, KH₂PO₄ 18mM, pH 7,4 – adicionado de TWEEN 20 0,25%) 1x por 1 hora. Após o bloqueio, foi lavada com PBST 1x para retirar o excesso da solução de leite, então incubada por 12 a 16 horas a 4°C, em agitação constante, com anticorpo primário diluído em PBST 1x. Após esta incubação, a membrana foi lavada com PBST 1x por três vezes, 5 minutos cada lavagem. Em seguida, foi incubada com anticorpo secundário diluído em PSBT 1x por 1 hora, temperatura ambiente, e ao final lavada novamente três vezes com PBST 1x, 15 minutos primeira lavagem e então 5 minutos nas outras duas. A membrana foi tratada com solução de quimiluminescência do kit *AmershamTM ECLTM Prime Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare Cat. RPN2232) por 1 minuto e revelada no equipamento *C-DiGit Blot Scanner* (LI-COR).

4.5.2. Análise da intensidade das bandas obtidas no ensaio de Western blot

As bandas obtidas no ensaio de *Western blot* (descrito em 4.5.1) representam o nível da proteína de interesse presente na amostra carregada. A quantificação foi feita através da medida da intensidade de pixel das bandas, determinada através do software *ImageJ* (RASBAND, 1997-2018). Foi utilizada como normalizador a

intensidade da banda da proteína Rpl5, que não varia nas condições do ensaio. Os níveis das proteínas de amostra proveniente de linhagem mutante em relação à selvagem foram calculados como média $\pm$ erro padrão utilizando o software *Microsoft Excel* (2016), baseado em triplicata biológica ($n = 3$). A análise estatística foi feita utilizando o teste t de Student, onde o valor de p associado à análise esta denotado nas Figuras como * valor de $p < 0,05$, ** valor de $p < 0,01$, e *** valor de $p < 0,001$.

4.6. Cultivo das células RAW 264.7

O cultivo foi realizado seguindo instruções da ATCC[®]. Para expandir as células, estas foram descongeladas em 4 mL de meio de cultura *Gibco*[™] DMEM 1x (4,5 g/L de D-glicose, L-glutamina, 110 mg/L de piruvato sódico; Thermo Fisher Scientific Cat. 11965084) contendo 10% de soro fetal e 1% de solução antibiótica antifúngica 100x (10.000 U/mL de penicilina, 10 mg/mL de estreptomicina e 25 μ g/mL de amfotericina; Sigma-Aldrich Cat. A5955), em garrafa de 25 mL com superfície tratada para cultivo de tecidos (Corning[®] modelo 430720). A incubação foi feita na estufa umidificada *Forma Series II* (Thermo Fisher Scientific) contendo 95% de ar e 5% de CO₂, a 37°C, trocando periodicamente o meio de cultura por novo. Após os macrófagos atingirem confluência de aproximadamente 80% na superfície da garrafa, o meio de cultura foi retirado e a superfície lavada com PBS 1x para remover células mortas aderidas. Em seguida, foi adicionado meio de cultura novo e feita a raspagem da superfície com espalhador de células (lâmina de 20 mm e comprimento de 300 mm; TPP Cat. 99003), para desaderir e solubilizá-las. 1 mL da solução de células foi retirado e adicionado em 11 mL de meio de cultura novo, em garrafa de 250 mL (KASVI Cat. K11-2250), e incubado nas condições descritas anteriormente. Após a confluência atingir aproximadamente 100% foi repetida lavagem e troca de garrafa.

4.7. Contagem de células em câmara de Neubauer

O meio de cultura foi removido da garrafa após expansão das células (descrito em 4.6) e sua superfície lavada com PBS 1x para retirar células mortas. 10 mL de meio de cultura *Gibco*[™] DMEM 1x (descrito em 4.6) foi adicionado à garrafa e sua superfície raspada com espalhador de células, desaderindo as células vivas. A partir

da suspensão de células formada, foi preparada uma diluição 1:10 em solução de azul de Tripan 0,4% (Vetec Cat. V000819; solubilizado em PBS 1x). Foi aplicado 10 μ L da diluição na câmara de Neubauer (Boeco Germany Cat. BOE 02) e, então, contou-se as células vivas (não coradas). O total de células contabilizadas nos quatro quadrantes da câmara (x) foi dividido por 4 para obtenção da média e, assim, multiplicado pelo valor do volume da câmara ($V_{CN} = 10 \mu\text{L}$), pelo fator de diluição ($f_d = 10$) e pelo fator de correção da câmara de Neubauer ($f_{CN} = 10^3$), encontrando, assim, a quantidade de células por mL (nº células/mL) na solução de 10 mL que foi preparada.

$$\text{nº células/mL} = (x/4) \cdot V_{CN} \cdot f_d \cdot f_{CN}$$

4.8. Cultivo das células RAW 264.7 em placa de Petri

Após contagem das células e partindo da suspensão preparada (descrito em 4.7), foi adicionado $2,26 \times 10^5$ células em 5 mL de meio de cultura *Gibco*TM DMEM 1x (descrito em 4.6) e incubado em placa de Petri, como o indicado pela ATCC[®], na estufa umidificada *Forma Series II* (Thermo Fisher Scientific) contendo 95% de ar e 5% de CO₂, a 37°C. Foi utilizada a placa de Petri NuncTM com área de 21,5 cm² (Cat.150288) e superfície tratada para cultivo de cultura de célula.

4.9. Tratamento das células RAW 264.7 com GC7

Após incubação das células em placa de Petri (descrito em 4.8), uma das placas foi utilizada como controle de não tratamento e a outra foi incubada com 100 μ M de GC7 (Biosearch Technologies Cat. G-1000-100) e 1 mM de aminoguanidina (Sigma-Aldrich Cat. 396494) por 48 ou 72 horas. Durante todos os dias do experimento, o meio de cultura (*Gibco*TM DMEM 1x, descrito em 4.6) era trocado por novo, e nova solução de 100 μ M de GC7 e 1 mM de aminoguanidina era adicionada. As placas foram cultivadas em triplicata biológica; três não tratadas e três tratadas com GC7 para cada período de incubação. A concentração utilizada para o GC7 foi escolhida de acordo com o padronizado para a linhagem RAW 264.7 (DE ALMEIDA JR; TOLEDO; ROSSI; ROSSETTO *et al.*, 2014). O composto aminoguanidina é utilizado para impedir a degradação de GC7 (PARK; WOLFF; LEE; FOLK, 1994), tendo também sido adicionado ao meio de cultura das células não tratadas.

4.10. Extração de RNA total de células RAW 264.7

A extração do RNA total foi feita utilizando o *kit Invitrogen™ PureLink™ RNA Mini* (Thermo Fisher Scientific Cat. 12183018A), seguindo o manual disponibilizado. O meio de cultura foi removido da placa de Petri (descrito em 4.8 e 4.9) e as células raspadas da superfície em 1,3 mL de PBS 1x. A suspensão de células foi centrifugada a 300 xg por 5 minutos e o sobrenadante foi removido. Ao precipitado foi adicionado 600 µL de *lysis buffer* contendo 1% de 2-mercaptoetanol, o tubo foi agitado em *vortex* vigorosamente até ressuspensão do precipitado. Então foi centrifugado à velocidade máxima por 3 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo limpo e adicionado 1 volume de etanol 70%, agitando em *vortex* vigorosamente para solubilização de precipitados. A solução foi transferida para coluna de purificação disponibilizada no *kit* e centrifugada à 12.000 xg por 15 segundos. Foi adicionado 700 µL de *wash buffer 1* à coluna e centrifugada à 12.000 xg por 15 segundos. Em seguida, foi adicionado 500 µL de *wash buffer 2* (adicionado de etanol 100% de acordo com manual) e centrifugada à 12.000 xg por 15 segundos; esta etapa foi realizada duas vezes. A coluna foi então centrifugada à 12.000 xg por 1 minuto para retirar o excesso de solução e secar. Foi adicionado à coluna 60 µL de água Milli-Q livre de RNase para eluição e centrifugada à 12.000 xg por 2 minutos. A qualidade do RNA extraído foi avaliada por eletroforese no equipamento *2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies), por meio da identificação de bandas 18S e 28S intactas e pelo valor de RIN (*RNA Integrity Number*).

A amostra foi armazenada em freezer -80°C.

4.11. Tratamento de amostra de RNA total com DNase I

O RNA total extraído (descrito em 4.10) foi quantificado no espectrofotômetro *NanoDrop™ 2000* (Thermo Fisher Scientific). Foi submetido 5 µg de cada amostra, diluídos em 8 µL de água Milli-Q, à reação enzimática com *DNase I* (*kit* Sigma-Aldrich Cat. AMPD1, seguindo as instruções de seu manual). A reação foi incubada a 25°C por 15 minutos. Foi então adicionado *stop solution* e incubado a 70°C por 10 minutos para inativar a DNase I.

4.12. Transcrição reversa de RNA total tratado com DNase I

Foi utilizado 5 μg de RNA total tratado com DNase I (descrito em 4.11). A reação foi preparada utilizando tampão 10x, dNTP *mix* 100 mM, oligonucleotídeos hexâmeros randômicos 10x e enzima transcriptase reversa 50 U/ μL do *kit Applied Biosystems™ High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Thermo Fisher Scientific Cat. 4368813), seguindo as instruções de seu manual. As amostras foram incubadas em termociclador (*Applied Biosystems™ GeneAmp® PCR System 9700, Thermo Fisher Scientific*) nas seguintes condições:

	Temperatura	Tempo
↓	25°C	10 minutos
	37°C	120 minutos
	85°C	5 minutos
	4°C	∞

Foi gerado 100 ng/ μL de cDNA.

4.13. qRT-PCR em tempo real

Foi utilizado o *kit Applied Biosystems™ Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Thermo Fisher Scientific Cat. 4367659) para o preparo das reações de qRT-PCR em tempo real, seguindo seu manual. Para realização dos ensaios foi utilizado o equipamento *Applied Biosystems™ 7500 Real Time PCR System* (Thermo Fisher Scientific).

4.13.1. Desenho e ensaio de otimização dos oligonucleotídeos iniciadores

Os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados utilizando o software *online Primer3Plus* (UNTERGASSER; NIJVEEN; RAO; BISSELING *et al.*, 2007), utilizando como parâmetros o tamanho da região a ser amplificada (*amplicon*) entre 80 e 150 pares de base, tamanho do oligonucleotídeo entre 19 e 21 pares de base, conteúdo de GC entre 50% e 60%, temperatura de hibridização variando entre 59°C a 61°C.

Os ensaios de otimização foram feitos para chegar à concentração ideal de uso dos oligonucleotídeos e para avaliação da região amplificada. A reação foi feita utilizando 10 μL de *SYBR Green Master Mix*, 9 μL de pares de oligonucleotídeos e 1

μL de cDNA a $10 \text{ ng}/\mu\text{L}$. Foram utilizados cDNA (descrito em 4.12) de amostra tratada com GC7 e de amostra não tratada (descrito em 4.9). As reações foram feitas nas seguintes condições e ciclos:

	Temperatura	Tempo	Ciclos
↓	50°C	2 minutos	1
	95°C	10 minutos	1
	95°C	15 segundos	40
	60°C	1 minuto	40 *

* Leitura de fluorescência

Foram utilizadas concentrações de $0,25 \mu\text{M}$, $0,40 \mu\text{M}$, $0,50 \mu\text{M}$ e $0,70 \mu\text{M}$ dos oligonucleotídeos. Também foi adicionado às condições da reação uma fase de dissociação ao final, com os seguintes parâmetros e emissão de fluorescência durante todo o processo:

	Temperatura	Tempo
↓	95°C	15 segundos
	60°C	1 minuto
	95°C	15 segundos

Foi escolhida para uso em reações subsequentes a concentração que possuía menor *Ct* (*cycle threshold*; ciclos necessários para observar sinal emitido pela amostra) em sua curva de dissociação, e também a que apresentava única curva de dissociação. Os parâmetros utilizados para o desenho dos oligonucleotídeos, as condições e ciclos das reações e o critério de escolha do *Ct* se basearam em metodologia já padronizada (BOOKOUT; CUMMINS; MANGELSDORF; PESOLA *et al.*, 2006).

4.13.2. Validação das reações de qRT-PCR em tempo real

A validação foi feita utilizando cinco concentrações de cDNA na forma de diluição seriada, onde o primeiro ponto foi de $0,01 \text{ ng}/\mu\text{L}$ e o último $100 \text{ ng}/\mu\text{L}$. A concentração de pares de oligonucleotídeo utilizado foi constante. A reação foi considerada validada quando obtida curva padrão $Ct \times [\text{cDNA}]_{\text{inicial}}$ com valor de

declive (*slope*) entre -3,0 e -3,6, obtendo eficiência entre 90% e 110% e R^2 (coeficiente de determinação) acima de 90%, seguindo os critérios já padronizados (BOOKOUT; CUMMINS; MANGELSDORF; PESOLA *et al.*, 2006).

4.13.3. Análise do ensaio de qRT-PCR em tempo real

A reação de qRT-PCR foi feita utilizando 10 μ L de *SYBR Green Master Mix*, 9 μ L de pares de oligonucleotídeos e 1 μ L de cDNA a 10 ng/ μ L. Foi utilizado o cDNA das amostras de células tratadas e não tratadas, e os pares de oligonucleotídeos validados.

Para cada amostra, os valores de Ct obtidos foram usados para calcular o valor relativo de expressão a partir do método quantitativo de Livak (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Para obtenção do Δ Ct foi subtraído o valor da média do Ct do gene normalizador (cuja expressão apresenta pouca variação nas condições do ensaio) do valor da média do Ct do gene alvo.

$$\Delta\text{Ct} = \text{média do Ct do gene alvo} - \text{média do Ct do gene normalizador}$$

Em seguida, para obtenção do $\Delta\Delta$ Ct, o valor de Δ Ct obtido para a condição não tratada (controle) foi subtraído do valor de Δ Ct da condição tratada.

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct da condição tratada} - \Delta\text{Ct da condição não tratada}$$

Então, o valor de $2^{(-\Delta\Delta\text{Ct})}$ foi encontrado para cada gene alvo na condição tratada, onde este valor foi utilizado como parâmetro para avaliar sua expressão. Para a condição não tratada assumiu-se o valor de “1” como forma de comparar a expressão. Assim, na condição tratada os valores menores que “1” são considerados subexpressão e os valores maiores que “1” são considerados superexpressão. A normalização do foi feita com 28S para o RNA total extraídos após tratamento com GC7 por 48 horas, e com *B2M* após o tratamento por 72 horas.

O ensaio foi realizado em triplicata biológica e amostral para cada condição, e os cálculos estatísticos foram feitos utilizando o software *Microsoft Excel* (2016) seguindo as análises já padronizadas (BOOKOUT; CUMMINS; MANGELSDORF; PESOLA *et al.*, 2006). A análise estatística foi feita utilizando o teste t de Student, onde o valor de p associado à análise está denotado nas Figuras como * valor de p < 0,05 , ** valor de p < 0,01 , e *** valor de p < 0,001.

4.14. Análise dos dados de perfis de larga escala

4.14.1. Análise das proteínas diferencialmente presentes em perfil proteômico diferencial

Foram procuradas proteínas relacionadas ao ciclo celular dentre as proteínas diferencialmente presentes no perfil proteômico diferencial de linhagens contendo o mutante *TS hyp2-3* em relação a linhagens contendo o selvagem, durante desativação de eIF5A (BARBOSA, 2019). Foi utilizado como critério a funcionalidade destas proteínas, tendo como referência o banco de dados *online Saccharomyces Genome Database (SGD)* (CHERRY; HONG; AMUNDSEN; BALAKRISHNAN *et al.*, 2012).

4.14.2. Busca por potenciais fatores de transcrição utilizando dados de perfil transcricional comparativo

Foi feita busca dos potenciais fatores de transcrição que possam regular os genes que aparecem como diferencialmente expressos nos perfis transcricionais comparativos de linhagem contendo o mutante *TS hyp2-3* em relação a linhagem contendo o selvagem, durante desativação de eIF5A, nas temperaturas 30 e 37°C. Este perfil transcricional comparativo foi gerado por meio da técnica de *RNA sequencing (RNA-Seq)* (BARBOSA, 2019).

Nesta análise, foi utilizada a ferramenta *Yeast Single Site Analysis* do software *online oPOSSUM* 3.0 (KWON; ARENILLAS; WORSLEY HUNT; WASSERMAN, 2012), e o software *online Pscan* 1.5 (ZAMBELLI; PESOLE; PAVESI, 2009). Ambos determinam estatisticamente os potenciais fatores de transcrição através da predição de seus sítios de ligação aos promotores dos genes alvos.

Foi observado quais destes fatores de transcrição apareciam nas listas geradas pelos dois softwares e em ambas as temperaturas em que os ensaios foram gerados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Escolha das proteínas partindo de análise de perfil proteômico diferencial de linhagem contendo eIF5A selvagem *versus* linhagem contendo mutante

5.1.1. Proteínas com níveis diminuídos no perfil proteômico diferencial

As proteínas relacionadas ao ciclo celular que estão diferencialmente diminuídas no perfil proteômico (BARBOSA, 2019) estão apresentadas na Tabela 5. Dentre elas, as proteínas Bck2, Cak1, Cka2 e Glc7 se destacam devido à funcionalidade e relação com a regulação do ciclo celular.

Tabela 5. Genes relacionados ao ciclo celular cujas proteínas estão diminuídas em linhagens contendo o mutante *hyp2-3* durante desativação de eIF5A no ensaio de perfil proteômico diferencial (BARBOSA, 2019).

(Continua)

Nome sistemático	Abreviação	Nome completo do gene
YER167W	<i>BCK2</i>	<i>Bypass of C Kinase</i>
YIL159W	<i>BNR1</i>	<i>BNi1 Related</i>
YCL014W	<i>BUD3</i>	<i>BUD site selection</i>
YFL029C	<i>CAK1</i>	<i>Cdk-Activating Kinase</i>
YHR107C	<i>CDC12</i>	<i>Cell Division Cycle</i>
YHR166C	<i>CDC23</i>	<i>Cell Division Cycle</i>
YOR061W	<i>CKA2</i>	<i>Casein Kinase Alpha' subunit</i>
YMR048W	<i>CSM3</i>	<i>Chromosome Segregation in Meiosis</i>
YDR440W	<i>DOT1</i>	<i>Disruptor Of Telomeric silencing</i>
YDR363W	<i>ESC2</i>	<i>Establishment of Silent Chromatin</i>
YER133W	<i>GLC7</i>	<i>GLyCogen</i>
YJR090C	<i>GRR1</i>	<i>Glucose Repression-Resistant</i>
YBL008W	<i>HIR1</i>	<i>Hlstone Regulation</i>
YPL204W	<i>HRR25</i>	<i>HO and Radiation Repair</i>
YML058W-A	<i>HUG1</i>	
YPL209C	<i>IPL1</i>	<i>Increase in PLoidy</i>
YGR040W	<i>KSS1</i>	<i>Kinase Suppressor of Sst2 mutations</i>
YJL013C	<i>MAD3</i>	<i>Mitotic Arrest-Deficient</i>
YFL034C-B	<i>MOB2</i>	<i>Mps One Binder</i>
YHR118C	<i>ORC6</i>	<i>Origin Recognition Complex</i>
YGL163C	<i>RAD54</i>	<i>RADIation sensitive</i>
YDR217C	<i>RAD9</i>	<i>RADIation sensitive</i>
YPL152W	<i>RRD2</i>	<i>Resistant to Rapamycin Deletion</i>

Tabela 5. Genes relacionados ao ciclo celular cujas proteínas estão diminuídas em linhagens contendo o mutante *hyp2-3* durante desativação de eIF5A no ensaio de perfil proteômico diferencial (BARBOSA, 2019).
(Continuação)

Nome sistemático	Abreviação	Nome completo do gene
YKL193C	<i>SDS22</i>	<i>homolog of S. pombe SDS22</i>
YOR195W	<i>SLK19</i>	<i>Synthetic Lethal Kar3p</i>
YFL008W	<i>SMC1</i>	<i>Stability of MiniChromosomes</i>
YFR031C	<i>SMC2</i>	<i>Structural Maintenance of Chromosomes</i>
YLR086W	<i>SMC4</i>	<i>Structural Maintenance of Chromosomes</i>
YNL273W	<i>TOF1</i>	<i>TOpoisomerase I-interacting Factor</i>
YLR212C	<i>TUB4</i>	<i>TUBulin</i>

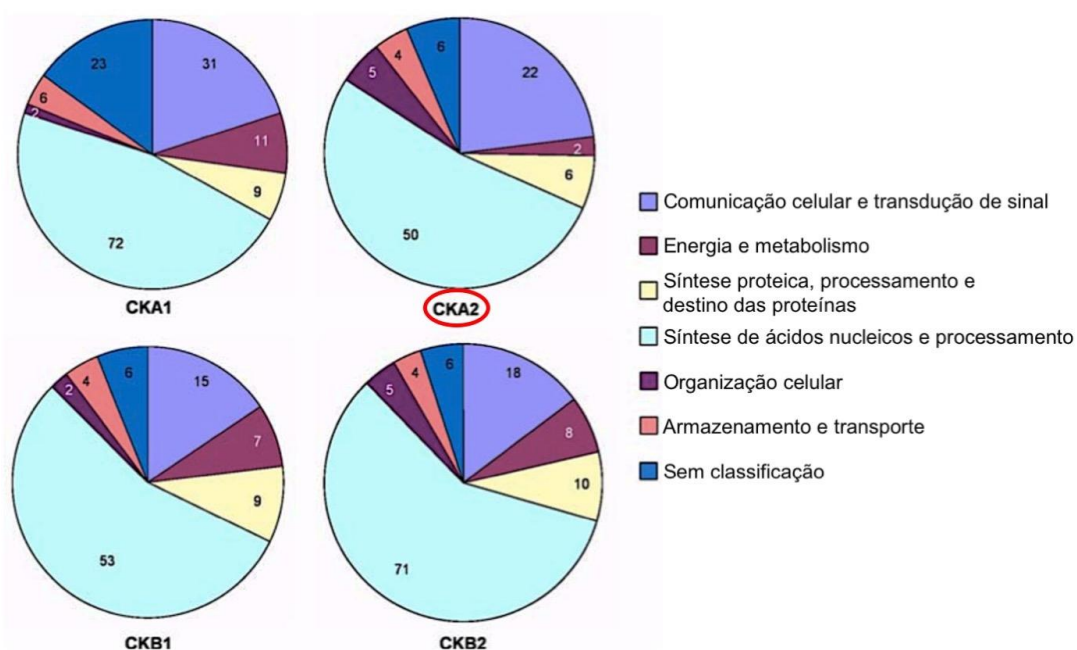
A proteína Bck2 tem potencial atuação na ativação de genes envolvidos no *start* de G1, paralelamente a Cln3 e independentemente de Cdc28 e do complexo SBF (WIJNEN; FUTCHER, 1999). A quinase Cak1 é importante ativadora de Cdk, ela fosforila Cdc28 ativando-a e contribuindo para a progressão G1/S (SUTTON; FREIMAN, 1997). A proteína Glc7, por sua vez, é uma fosfatase envolvida na regulação da progressão G2/M e na desfosforilação de forminas (HISAMOTO; SUGIMOTO; MATSUMOTO, 1994; ORII; KONO; WEN; NAKANISHI, 2016).

A proteína Cka2 faz parte do complexo quinase conservado CK2, envolvido na progressão do ciclo celular em eucariotos. Mutante *TS* de Cka2 de levedura aprisiona em G1 indicando que o complexo é necessário durante o *start*, além de também provocar aprisionamento em G2/M (HANNA; RETHINASWAMY; GLOVER, 1995). A fosforilação por CK2 pode ser essencial para Cdc28 (RUSSO; VAN DEN BOS ; SUTTON; COCCETTI *et al.*, 2000), para a ligação de complexos aos genes de G1 dependentes de SBF (TRIPODI; NICASTRO; BUSNELLI; CIRULLI *et al.*, 2013) e para regulação de genes envolvidos na remodelação da cromatina (BARZ; ACKERMANN; DUBOIS; EILS *et al.*, 2003). Foi demonstrado que há *feedback* positivo em *loop* entre CK2 e Cdc37, sendo a fosforilação de Cdc37 importante para sua atividade (BANDHAKAVI; MCCANN; HANNA; GLOVER, 2003a). A proteína Cdc37 atua promovendo correta associação de Cdc28 às ciclinas de G1 para progressão do *start* (GERBER; FARRELL; DESHAIES; HERSKOWITZ *et al.*, 1995), e tem influência nos níveis de Cak1 (FARRELL; MORGAN, 2000).

Análise do interactoma do complexo CK2 por Gyenis e Litchfield (2008), através da análise de interações proteína-proteína depositados em repositório

online, mostra que há grande interação com uma classe definida pelo estudo como “síntese de ácidos nucleicos e processamento”. Esta classe engloba fatores de transcrição, proteínas ligantes de DNA e RNA, e proteínas reguladoras do ciclo celular, onde Cka2 aparece interagindo com 50 proteínas desta classe (GYENIS; LITCHFIELD, 2008).

Figura 8. Agrupamento funcional das interações proteicas de cada subunidade do complexo quinase CK2. Observa-se que há interação com diferentes funções celulares, principalmente com a classe “síntese de ácidos nucleicos e processamento” que engloba fatores de transcrição, proteínas ligantes de DNA e RNA, e proteínas reguladoras do ciclo celular (GYENIS; LITCHFIELD, 2008). Cka2 está circulado e vermelho.



Fonte: GYENIS; LITCHFIELD, 2008 (Adaptada)

A correlação de eIF5A com CK2 e Cdc37 pode ser observada a partir dos ensaios de interação genética do gene *ZDS1*. Este gene está envolvido em diversos processos celulares, incluindo ciclo celular e morfogênese (ROSSIO; YOSHIDA, 2011), e sua superexpressão suprime fenótipo tanto de mutante *TS* de Cka2 quanto de mutante de Cdc37 não fosforilado por CK2 (BANDHAKAVI; MCCANN; HANNA; GLOVER, 2003b). A superexpressão de *ZDS1* também é capaz de suprimir o fenótipo do mutante *TS* de eIF5A *hyp2-1* (ZANELLI; VALENTINI, 2005). Sua superexpressão parece agir elevando a abundância de Cdc37 que, por sua vez, estimula a atividade de CK2 e, assim, pode explicar o envolvimento de *ZDS1* com diversos processos celulares (BANDHAKAVI; MCCANN; HANNA; GLOVER, 2003b).

É importante considerar que já foi demonstrado que CK2 de humano pode fosforilar tanto DHS de levedura quanto a de humano, que é a primeira enzima da via de hipusinação (KANG, 2005; KANG; CHUNG, 2003), e que eIF5A de levedura pode ser fosforilada por CK2 (ŁEBSKA; CIESIELSKI; SZYMONA; GODECKA *et al.*, 2010). Sugere-se, assim, uma possível associação funcional entre o complexo CK2 e eIF5A.

5.1.2. Proteínas com níveis aumentados no perfil proteômico diferencial

As proteínas relacionadas ao ciclo celular que estão diferencialmente aumentadas no perfil proteômico (BARBOSA, 2019) estão apresentadas na Tabela 6. Dentre elas, as proteínas Cdc37, Clb2, Cln2, Gcn2 e Sic1 se destacam devido à funcionalidade e relação com a regulação do ciclo celular.

Tabela 6. Genes relacionados ao ciclo celular cujas proteínas estão aumentadas em linhagens contendo o mutante *hyp2-3* durante desativação de eIF5A no ensaio de perfil proteômico diferencial (BARBOSA, 2019).

(Continua)

Nome sistemático	Abreviação	Nome completo do gene
YIL158W	AIM20	<i>Altered Inheritance rate of Mitochondria</i>
YBR158W	AMN1	<i>Antagonist of Mitotic exit Network</i>
YNL172W	APC1	<i>Anaphase Promoting Complex subunit</i>
YDL008W	APC11	<i>Anaphase Promoting Complex</i>
YLR127C	APC2	<i>Anaphase Promoting Complex</i>
YGR140W	CBF2	<i>Centromere-Binding Factor</i>
YLR175W	CBF5	<i>Centromere Binding Factor</i>
YCR002C	CDC10	<i>Cell Division Cycle</i>
YLR310C	CDC25	<i>Cell Division Cycle</i>
YDR168W	CDC37	<i>Cell Division Cycle</i>
YCR093W	CDC39	<i>Cell Division Cycle</i>
YPR119W	CLB2	<i>CycLin B</i>
YPL256C	CLN2	<i>CycLiN</i>
YDL156W	CMR1	<i>Changed Mutation Rate</i>
YPL194W	DDC1	<i>DNA Damage Checkpoint</i>
YJL090C	DPB11	<i>DNA Polymerase B (II)</i>
YDL101C	DUN1	<i>DNA-damage UNinducible</i>
YDR130C	FIN1	<i>Filaments In between Nuclei</i>
YML074C	FPR3	<i>Fk 506-sensitive Proline Rotamase</i>
YDR283C	GCN2	<i>General Control Nonderepressible</i>

Tabela 6. Genes relacionados ao ciclo celular cujas proteínas estão aumentadas em linhagens contendo o mutante *hyp2-3* durante desativação de eIF5A no ensaio de perfil proteômico diferencial (BARBOSA, 2019).

(Continuação)

Nome sistemático	Abreviação	Nome completo do gene
YKL101W	<i>HSL1</i>	<i>Histone Synthetic Lethal</i>
YIL150C	<i>MCM10</i>	<i>MiniChromosome Maintenance</i>
YBL051C	<i>PIN4</i>	<i>Psi+ INducibility</i>
YBL105C	<i>PKC1</i>	<i>Protein Kinase C</i>
YFL033C	<i>RIM15</i>	<i>Regulator of IME2</i>
YLR079W	<i>SIC1</i>	<i>Substrate/Subunit Inhibitor of CDK</i>
YDL047W	<i>SIT4</i>	<i>Suppressor of Initiation of Transcription</i>

A proteína Cdc37 é uma chaperona que atua estabilizando quinases e auxilia a chaperona Hsp90 na estabilização dos complexos que forma (STEPANOVA; LENG; HARPER, 1997). Cdc37 está envolvida com o *start* se relacionando funcionalmente com Cdc28 (GERBER; FARRELL; DESHAIES; HERSKOWITZ *et al.*, 1995), e com o complexo CK2 (BANDHAKAVI; MCCANN; HANNA; GLOVER, 2003a).

A ciclina Clb2 é expressa durante G2/M e atua em sua progressão na forma de Clb2-Cdc28, reprimindo o complexo SBF (SIEGMUND; NASMYTH, 1996). Já a ciclina Cln2 é expressa em G1, atuando na progressão do *start* (STUART; WITTENBERG, 1995). Tanto Clb2 quanto Cln2 dependem da fosforilação por Cdc37 para associação com Cdc28 (GERBER; FARRELL; DESHAIES; HERSKOWITZ *et al.*, 1995).

O banco de dados *online* de interações genéticas em *S. cerevisiae* *The Cell Map* (USAJ; TAN; WANG; VANDERSLUIS *et al.*, 2017) mostra que linhagens contendo mutantes *TS* de Cdc37 apresentam interação genética negativa com nocaute de *CKA2*, e também com os mutantes *TS* de eIF5A *hyp2-1*, *hyp2-2* e *hyp2-ts*, indicando que ausência simultânea de Cdc37 e eIF5A é prejudicial para a célula. Dados de nosso grupo também mostram interação genética negativa de mutante *TS* de Cdc37 com os mutantes *TS hyp2-1*, *hyp2-3* e *hyp2^{K56A}* (GALVÃO, 2015).

Estudos prévios do grupo mostram que superexpressão de *CLN2* em linhagens contendo mutante *TS hyp2-3* ou *hyp2^{K56A}* promove fenótipo menos tóxico para estas células quando eIF5A está desativada, mostrando que superexpressão de Cln2 pode aliviar a ausência de eIF5A funcional na progressão do ciclo celular.

Da mesma forma, estes estudos prévios mostram que superexpressão de *WHI5*, o repressor transcricional de genes envolvidos na progressão de G1, em linhagem contendo o mutante *TS hyp2-3*, piora o fenótipo de desativação de eIF5A. Isso provavelmente ocorre por se tratar de um repressor da progressão do ciclo celular, assim, a sua superexpressão pode exacerbar o fenótipo de aprisionamento causado pela ausência de eIF5A funcional.

Estes dados indicam, portanto, que a função de eIF5A pode ter impacto direto na progressão do ciclo celular.

A proteína Gcn2 identifica a indisponibilidade de aminoácidos e, portanto, situação de ausência de nutrientes (WEK; ZHU; WEK, 1995). Gcn2 é regulada por Hsp90 juntamente com Cdc37 (DONZÉ; PICARD, 1999), e atua na progressão G1/S através da regulação da replicação em resposta a dano ao DNA, onde estes danos podem estar ativando Gcn2 independentemente da via de resposta a estresse nutricional (MENACHO-MARQUEZ; PEREZ-VALLE; ARIÑO; GADEA *et al.*, 2007).

A inibidora de Cdk Sic1 atua na transição G1/S, promovendo inibição do complexo Clb5/6–Cdc28 e impedindo a iniciação da replicação do DNA (SCHWOB; BÖHM; MENDENHALL; NASMYTH, 1994). Após o *start* e a expressão das ciclinas de G1, Sic1 é fosforilada por Cln2–Cdc28 levando à sua degradação, regulando assim a entrada em S (VERMA; ANNAN; HUDDLESTON; CARR *et al.*, 1997) (Figura 9).

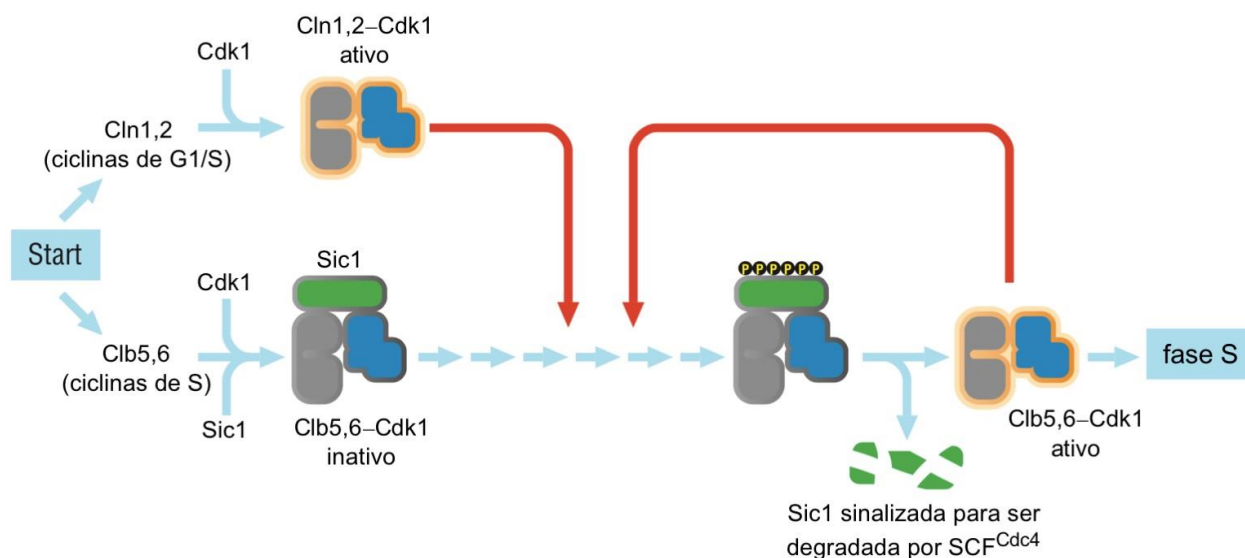
Em situações de estresse há o aprisionamento em G1 pela regulação da estabilidade de Sic1, como em resposta a estresse nutricional (ZINZALLA; GRAZIOLA; MASTRIANI; VANONI *et al.*, 2007) e em resposta a estresse osmótico (ESCOTÉ; ZAPATER; CLOTET; POSAS, 2004). Foi demonstrado que o complexo CK2 também fosforila Sic1, levando a sua degradação, e que desativação de CK2 causa aprisionamento em G1 por causar aumento nos níveis de Sic1 devido a sua estabilização (TRIPODI; ZINZALLA; VANONI; ALBERGHINA *et al.*, 2007).

Em relação a eIF5A, ausência de Sic1 na célula piora o fenótipo de todos os mutantes *TS* de eIF5A testados (*hyp2-1*, *hyp2-2*, *hyp2-3* e *hyp2-ts*) nos ensaios de interação genética depositados no banco de dados *online The Cell Map* (USAJ; TAN; WANG; VANDERSLUIS *et al.*, 2017), onde se observa interação genética negativa do nocaute de *SIC1* com estes mutantes.

Dados de nosso grupo também mostram interação genética negativa de nocaute de *SIC1* com os mutantes *TS hyp2-1*, *hyp2-3*, *hyp2*^{K56A} e *hyp2*^{Q22H/L93F}

(GALVÃO, 2015). Outras interações genéticas negativas do nocaute de *SIC1*, mostradas no banco de dados online *The Cell Map* (USAJ; TAN; WANG; VANDERSLUIS *et al.*, 2017), é com grupo de genes relacionados com a replicação e o reparo do DNA (Tabela 11 – Apêndice), indicando que problemas com Sic1 e eIF5A podem sensibilizar a célula para defeitos de replicação e reparo do DNA.

Figura 9. Atuação de Sic1 no ciclo celular da levedura. Sic1 atua inibindo o complexo Clb5,6–Cdk1 (Cdk1 = Cdc28) impedindo a transição de G1 para S. A fosforilação pelo complexo Cln1,2–Cdk1 leva Sic1 a degradação permitindo que Clb5,6–Cdk1 inicie a replicação do DNA e o ciclo celular progrida para S.



Fonte: MORGAN, 2007 (Adaptada)

5.2. Análise de perfil transcricional comparativo de linhagem contendo eIF5A selvagem versus linhagem contendo mutante

5.2.1. Níveis dos transcritos dos genes de interesse

Para entender se os níveis das proteínas de interesse, descritas em 5.1, estavam alterados devido à sua expressão gênica, foi procurado se os níveis de seus transcritos estavam alterados nos perfis transcricionais comparativos de linhagem contendo o mutante *TS hyp2-3* em relação a linhagem contendo selvagem, durante desativação de eIF5A, nas temperaturas 30 e 37°C, obtido por meio da técnica de *RNA sequencing* (RNA-Seq) (BARBOSA, 2019).

A Tabela 7 mostra como está o nível destes transcritos de interesse no ensaio, em ambas as temperaturas realizadas (BARBOSA, 2019).

Tabela 7. Situação dos transcritos de genes relacionados ao ciclo celular de *S. cerevisiae*, obtido por meio de perfil transcricional comparativo, cujas proteínas apresentam níveis diferenciais em perfil proteômico diferencial (BARBOSA, 2019).

	30°C		37°C	
Gene	Diminuído	Aumentado	Diminuído	Aumentado
BCK2	X	-	X	-
CAK1	-	-	-	X
CDC37	X	-	X	-
CKA2	-	-	X	-
CLB2	X	-	X	-
CLN2	-	-	-	-
GCN2	-	-	-	X
GLC7	X	-	-	-
SIC1	-	X	X	-

5.2.2. Busca por potenciais fatores de transcrição

A ação de determinados fatores de transcrição é essencial para a regulação do ciclo celular e sua correta progressão. Uma das possibilidades para a presença diferencial das proteínas durante desativação de eIF5A seria que seus próprios fatores de transcrição estivessem desregulados, alterando a expressão dos genes destas proteínas. Portanto, foi pesquisado quais seriam os potenciais fatores de transcrição que regulam a expressão dos genes diferencialmente expressos nos perfis transcricionais comparativos, nas temperaturas 30 e 37°C (BARBOSA, 2019) (descrito em 4.14.2).

Estão demonstrados na Tabela 8 os fatores de transcrição que têm função relacionada ao ciclo celular, de acordo com o banco de dados *online SGD* (CHERRY; HONG; AMUNDSEN; BALAKRISHNAN *et al.*, 2012), e que possam estar regulando os genes com transcritos diminuídos. Enquanto os fatores de transcrição na Tabela 9, que têm função relacionada ao ciclo celular, podem estar regulando os genes com transcritos aumentados.

Tabela 8. Fatores de transcrição que possam regular os transcritos diminuídos nos perfis transcricionais comparativos de linhagem contendo o mutante *hyp2-3*, durante desativação de eIF5A, realizados a 30 e 37°C (BARBOSA, 2019).

Nome sistemático	Abreviação	Nome completo do gene
YIL131C	<i>FKH1</i>	<i>ForK head Homolog</i>
YNL068C	<i>FKH2</i>	<i>ForK head Homolog</i>
YDL056W	<i>MBP1</i>	<i>Mlu1-box Binding Protein</i>
YGR044C	<i>RME1</i>	<i>Regulator of MEiosis</i>
YER111C	<i>SWI4</i>	<i>SWItching deficient</i>
YLR182W	<i>SWI6</i>	<i>SWItching deficient</i>

Tabela 9. Fatores de transcrição que possam regular os transcritos aumentados nos perfis transcricionais comparativos de linhagem contendo o mutante *hyp2-3*, durante desativação de eIF5A, realizados a 30 e 37°C (BARBOSA, 2019).

Nome sistemático	Abreviação	Nome completo do gene
YJR094C	<i>IME1</i>	<i>Inducer of MEiosis</i>
YBR267W	<i>REI1</i>	<i>REquired for Isotropic bud growth</i>
YHL027W	<i>RIM101</i>	<i>Regulator of IME2</i>
YPL128C	<i>TBF1</i>	<i>TTAGGG repeat-Binding Factor</i>

A Tabela 10 mostra como está o nível dos transcritos destes potenciais fatores de transcrição no perfil transcricional comparativo, em ambas as temperaturas realizadas (BARBOSA, 2019).

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 *hyp2-3* (BARBOSA, 2019).

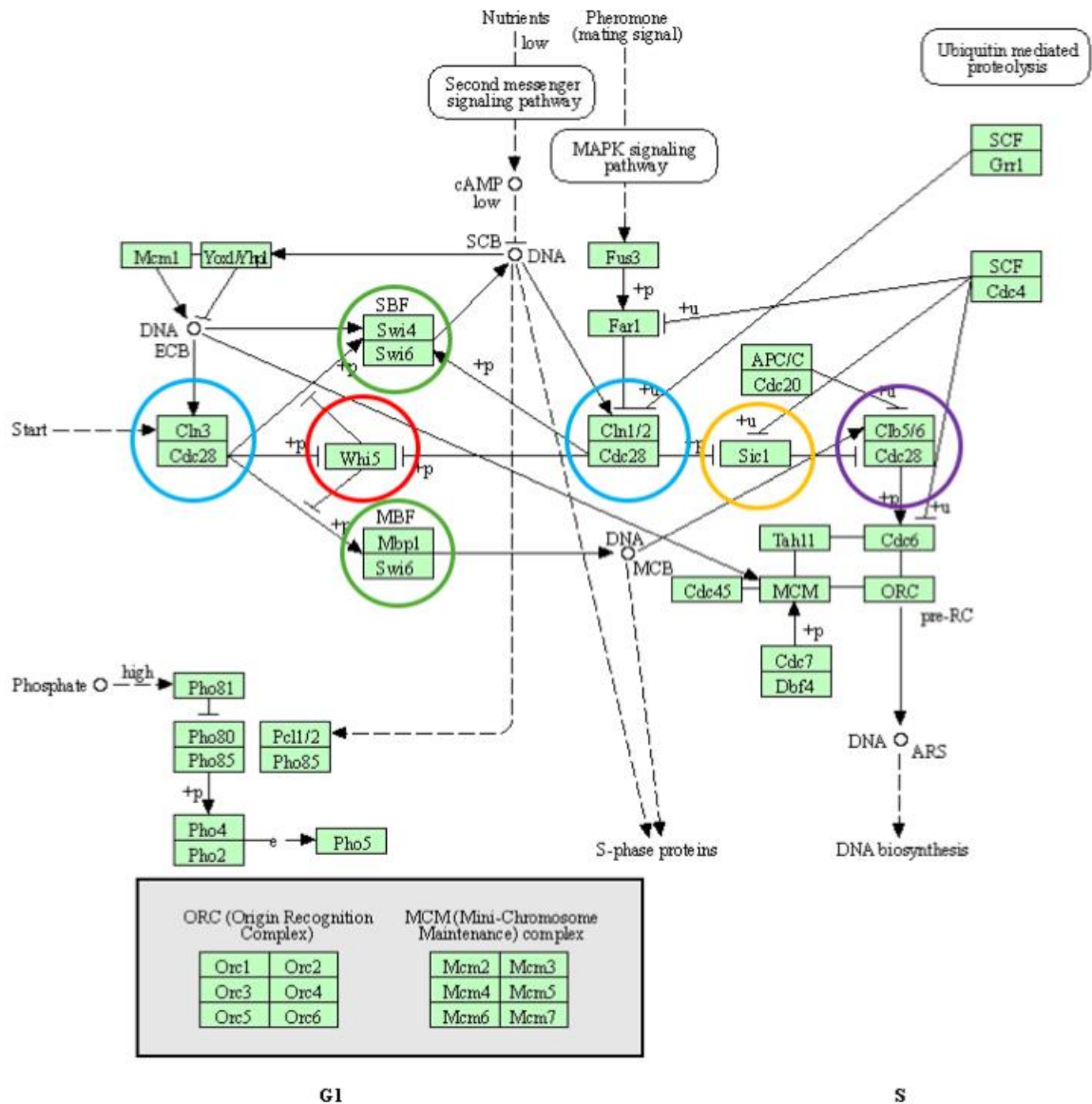
Gene	30°C		37°C	
	Diminuído	Aumentado	Diminuído	Aumentado
<i>FKH1</i>	X	-	X	-
<i>FKH2</i>	-	-	X	-
<i>IME1</i>	-	-	-	-
<i>MBP1</i>	-	-	X	-
<i>REI1</i>	-	-	-	-
<i>RIM101</i>	-	X	-	X
<i>RME1</i>	-	-	X	-
<i>SWI4</i>	-	-	-	-
<i>SWI6</i>	-	-	-	X

Os fatores de transcrição demonstrados na Tabela 8 são importantes para a regulação e progressão do ciclo celular. A proteína Swi4 faz parte do complexo SBF (Swi4–Swi6) responsável pela expressão de genes importantes para o *start*, enquanto que Mbp1 faz parte do complexo MBF (Mbp1–Swi6), que atua de forma semelhante a SBF regulando a expressão de outros genes importantes para o *start* (KOCH; MOLL; NEUBERG; AHORN *et al.*, 1993).

As proteínas Fkh1 e Fkh2 atuam na regulação da replicação durante G1 e na regulação da transcrição do *cluster CLB2* durante G2/M (KNOTT; PEACE; OSTROW; GAN *et al.*, 2012). Este *cluster* possui genes como *CLB2* e *SWI5*, sendo Swi5 fator de transcrição de *SIC1* (TOYN; JOHNSON; DONOVAN; TOONE *et al.*, 1997). Já a proteína Rme1 é uma ativadora da expressão de *CLN2* em G1, também regulada por Swi5 (FRENZ; JOHNSON; JOHNSTON, 2001).

A Figura 10 mostra esquematizado o envolvimento dos fatores de transcrição, das ciclinas e de Sic1 na progressão do ciclo celular da fase G1 para S.

Figura 10. Progressão do ciclo celular de G1 até S a partir do start. Esquema demonstrativo do envolvimento na progressão do ciclo celular dos complexos Cln1/2/3–Cdc28 (circulados em azul), dos fatores de transcrição SBF (Swi4-Swi6) e MBF (Mbp1-Swi6) (circulados em verde), do repressor transcrricional Whi5 (circulado em vermelho), da inibidora de Cdk Sic1 (circulado em amarelo) e do complexo Clb5/6–Cdc28 (circulado em roxo).



Fonte: KANEHISA; SATO; FURUMICHI; MORISHIMA *et al.*, 2019 (KEGG PATHWAY Database) (Adaptada)

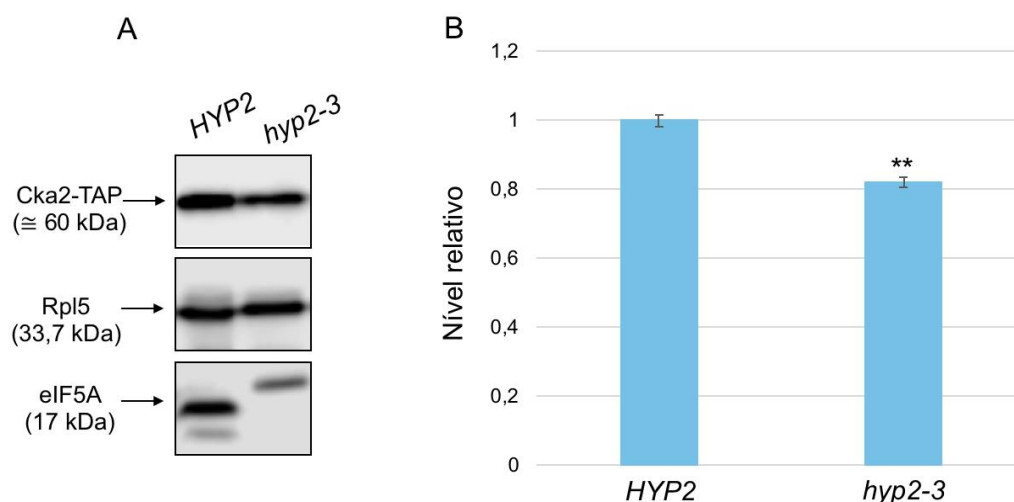
5.3. Validação por metodologia de *Western blot* dos níveis das proteínas de interesse

Para realizar a validação dos níveis diferenciais das proteínas descritas nos itens 5.1 e 5.2, foram feitos ensaios de *Western blot*. As culturas foram sincronizadas na fase G1 do ciclo celular utilizando fator α , ainda em temperatura permissiva, e em seguida foram cultivadas em temperatura semi-permissiva para desativação de eIF5A nas linhagens contendo o mutante *TS hyp2-3*. A sincronização permite que todas as células da cultura cresçam a partir do mesmo estágio, diminuindo o viés da análise de diferença dos níveis das proteínas. A mudança de temperatura induz desativação de eIF5A nas linhagens mutantes mantendo as linhagens selvagens como controle.

5.3.1. Cka2

Nos dados de ensaio proteômico diferencial (BARBOSA, 2019), Cka2 aparece como uma das proteínas diminuídas (Tabela 5), o que pôde ser validado com o ensaio de *Western blot* (Figura 11).

Figura 11. Ensaio de *Western blot* demonstrando o nível da proteína Cka2 diminuído durante desativação de eIF5A. **A.** Revelação do ensaio após incubação com os respectivos anticorpos. Os extratos proteicos totais foram obtidos após sincronização das células em G1 utilizando fator α e cultivo em temperatura semi-permissiva para desativação de eIF5A do mutante *hyp2-3*. Foi carregado 20 μ g de proteína de cada extrato total e utilizado como normalizador a proteína ribossomal Rpl5. A banda dupla de eIF5A ocorre devido a uma degradação comum já descrita (KANG; SCHWELBERGER; HERSHEY, 1993). **B.** Gráfico demonstrando estatisticamente a diferença nos níveis proteicos de Cka2 a partir da intensidade das bandas do ensaio de *Western blot*, utilizando análise de pixels do software *ImageJ* (RASBAND, 1997-2018) e processamento de dados no *Microsoft Excel* (2016). Teste t de Student indica que há estatisticamente diferença entre as amostras, ** equivale a $p < 0,01$. Para ambas as barras, dados são média $\pm$ erro padrão.



Fonte: Autoria própria

A diminuição dos níveis de Cka2 pode explicar o porquê ausência de funcionalidade de eIF5A causa aprisionamento em G1, considerando sua relação e a do complexo CK2 com proteínas importantes para progressão de G1 do ciclo celular, e com a chaperona Cdc37, que está envolvida em diversos processos (BANDHAKAVI; MCCANN; HANNA; GLOVER, 2003a; GERBER; FARRELL; DESHAIES; HERSKOWITZ *et al.*, 1995; HANNA; RETHINASWAMY; GLOVER, 1995; RUSSO; VAN DEN BOS ; SUTTON; COCCETTI *et al.*, 2000; TRIPODI; NICASTRO; BUSNELLI; CIRULLI *et al.*, 2013).

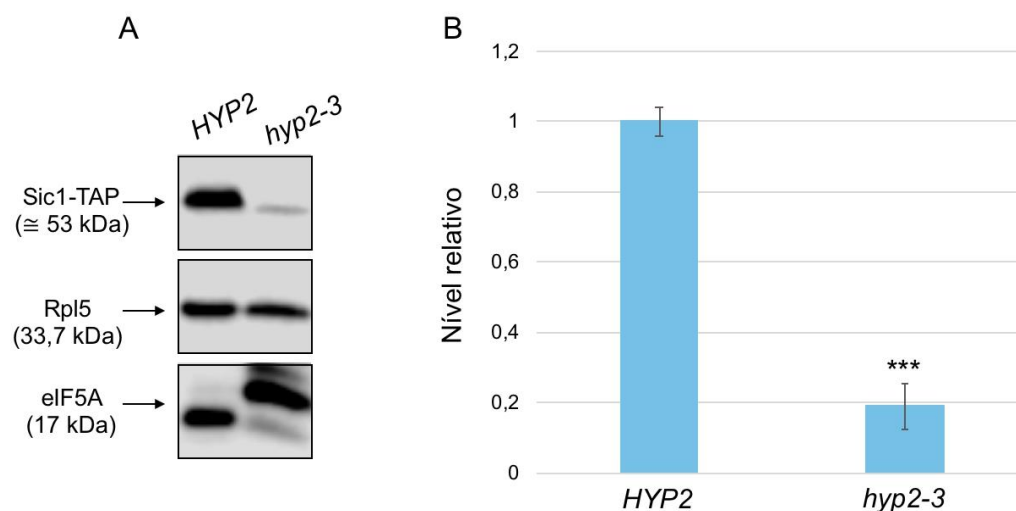
Esta diminuição pode estar afetando a fosforilação e regulação de proteínas que determinam a correta progressão do ciclo em G1. A regulação de Cdc37 pode estar sendo prejudicada e pode não conseguir induzir maior atividade de CK2 por meio do *feedback* em *loop*, devido a indisponibilidade de Cka2 durante desativação de eIF5A.

No perfil transcricional comparativo realizado a 37°C, o transcrito de *CKA2* aparece como diminuído em linhagem contendo *hyp2-3* mutante e eIF5A desativada, em relação ao selvagem, enquanto o transcrito de *CDC37* aparece diminuído em ambos os ensaios, a 30°C e a 37°C (BARBOSA, 2019).

5.3.2. Sic1

Nos dados de ensaio proteômico diferencial (BARBOSA, 2019), Sic1 aparece como uma das proteínas aumentadas (Tabela 6). Entretanto, o ensaio de *Western blot* mostra que, na realidade, a proteína encontra-se diminuída (Figura 12).

Figura 12. Ensaio de *Western blot* demonstrando o nível da proteína Sic1 diminuído durante desativação de eIF5A. **A.** Revelação do ensaio após incubação com os respectivos anticorpos. Os extratos proteicos totais foram obtidos após sincronização das células em G1 utilizando fator α e cultivo em temperatura semi-permissiva para desativação de eIF5A do mutante *hyp2-3*. Foi carregado 20 μ g de proteína cada extrato total e utilizado como normalizador a proteína ribossomal Rpl5. A banda dupla de eIF5A ocorre devido a uma degradação comum já descrita (KANG; SCHWELBERGER; HERSHEY, 1993). **B.** Gráfico demonstrando estatisticamente a diferença nos níveis proteicos de Sic1 a partir da intensidade das bandas do ensaio de *Western blot*, utilizando análise de pixels do software *ImageJ* (RASBAND, 1997-2018) e processamento de dados no *Microsoft Excel* (2016). Teste t de Student indica que há estatisticamente diferença entre as amostras, *** equivale a $p < 0,001$. Para ambas as barras, dados são média $\pm$ erro padrão.



Fonte: Autoria própria

Apesar de o perfil proteômico diferencial mostrar Sic1 como uma proteína aumentada durante desativação de eIF5A, este ensaio não utiliza células sincronizadas (BARBOSA, 2019). Por isso, pode ocorrer viés nos resultados obtidos devido a presença de população de células crescendo em diferentes estágios do ciclo celular. Desta forma, após sincronização das culturas na fase G1 e a desativação de eIF5A, observa-se Sic1 diminuída. Estudos prévios de nosso grupo também mostram Sic1 diminuída durante desativação de eIF5A, utilizando o mutante *TS hyp2^{K56A}* em cultura sincronizada em G1.

A diminuição de Sic1 mostra que durante a desativação de eIF5A a proteína pode estar sendo degradada normalmente, e que não é responsável por causar o aprisionamento em G1. Isto leva a crer que as outras vias que regulam sua

estabilidade (ESCOTÉ; ZAPATER; CLOTET; POSAS, 2004; ZINZALLA; GRAZIOLA; MASTRIANI; VANONI *et al.*, 2007) podem não estar apresentando alterações neste momento. Outro indicativo seria o de que a tradução de Sic1 pode ser dependente de eIF5A. Porém, existe a possibilidade de a proteína estar sendo degradada durante a execução da metodologia.

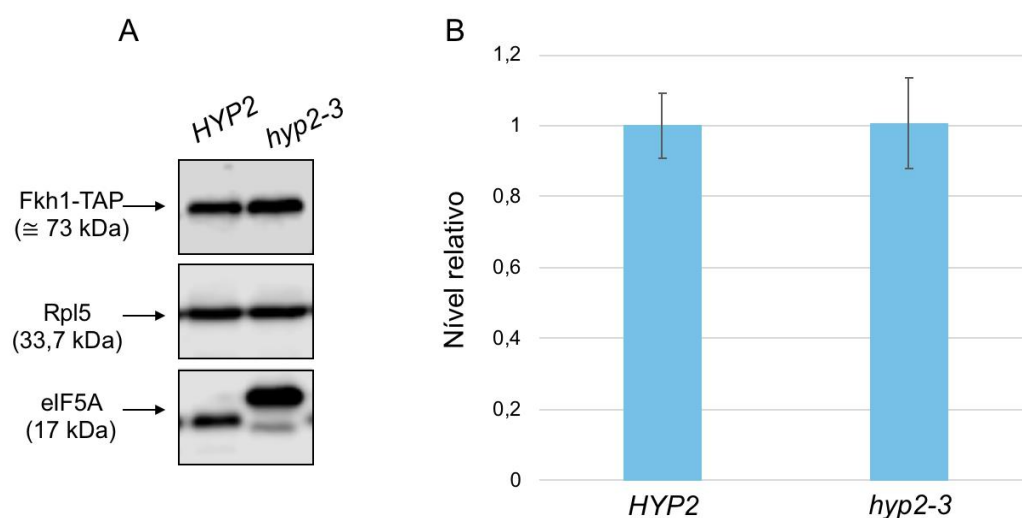
Nos perfis transcricionais comparativos, o transcrito de *SIC1* aparece como aumentado no ensaio realizado a 30°C e diminuído no 37°C (BARBOSA, 2019). A não equivalência do resultado entre os dois perfis transcricionais pode ser devido aos diferentes tratamentos feitos entre os experimentos.

Considerando que o complexo CK2 também atua na degradação de Sic1 (TRIPODI; ZINZALLA; VANONI; ALBERGHINA *et al.*, 2007), e que tanto Cka2 quanto Sic1 se encontram diminuídas, entende-se que caso a diminuição de Cka2 cause o aprisionamento em G1 nas células desativadas de eIF5A, isto não se deve a Sic1.

5.3.3. Fkh1

Nos dados de ensaio proteômico diferencial, Fkh1 não aparece como uma proteína com nível diferente entre linhagem selvagem e mutante de eIF5A durante a desativação (BARBOSA, 2019). A metodologia de *Western blot* também não identificou nível diferencial entre as duas condições (Figura 13).

Figura 13. Ensaio de *Western blot* demonstrando o nível da proteína Fkh1 durante desativação de eIF5A. **A.** Revelação do ensaio após incubação com os respectivos anticorpos. Os extratos proteicos totais foram obtidos após sincronização das células em G1 utilizando fator α e cultivo em temperatura semi-permissiva para desativação de eIF5A do mutante *hyp2-3*. Foi carregado 20 μ g de proteína cada extrato total e utilizado como normalizador de carregamento a proteína ribossomal Rpl5. A banda dupla de eIF5A ocorre devido a uma degradação comum já descrita (KANG; SCHWELBERGER; HERSHEY, 1993). **B.** Gráfico demonstrando estatisticamente a diferença nos níveis proteicos de Fkh1 a partir da intensidade das bandas do ensaio de *Western blot*, utilizando análise de pixels do software *ImageJ* (RASBAND, 1997-2018) e processamento de dados no *Microsoft Excel* (2016). O valor de p associado ao Teste t de Student foi de $p > 0,05$. Para ambas as barras, dados são média $\pm$ erro padrão.



Fonte: Autoria própria

Portanto, apesar de aparecer como um dos possíveis fatores de transcrição que regulam a expressão dos genes presentes nos perfis transcricionais comparativos (BARBOSA, 2019), como descrito em 5.2, o fato de não se observar diferença no seu nível proteico durante desativação de eIF5A mostra que Fkh1 pode não estar envolvida no aprisionamento de G1 causada pela desativação de eIF5A.

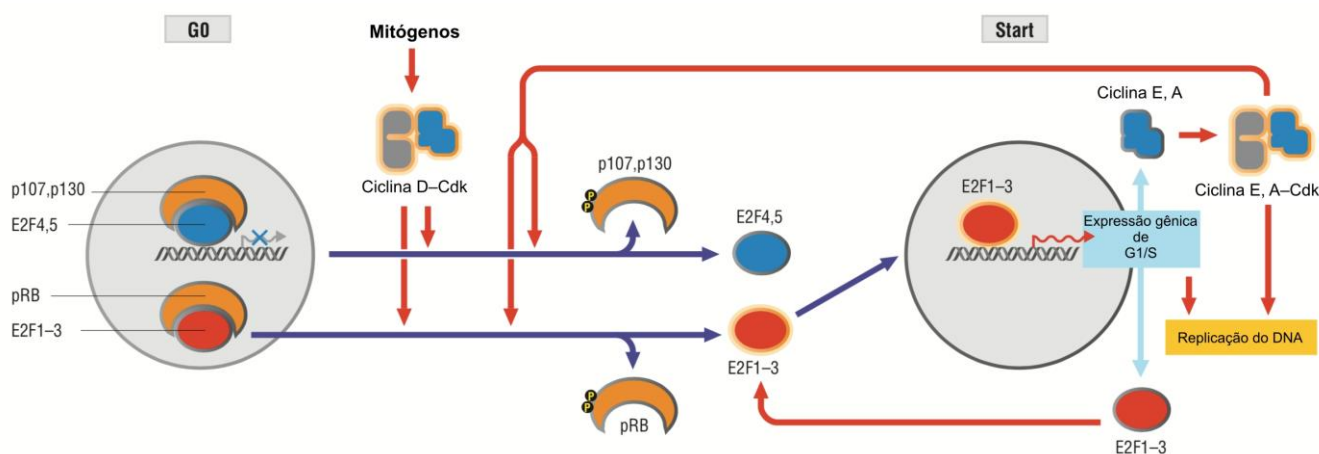
Entretanto, também nos perfis transcricionais comparativos, o transcrito de *FKH1* aparece como diminuído em ambos os ensaios realizados, a 30°C e 37°C (BARBOSA, 2019).

5.4. Ensaio de qRT-PCR em tempo real utilizando mRNA total obtido de células RAW 264.7 tratadas com GC7

Como descrito anteriormente, em estudo utilizando linhagem de adenocarcinoma pancreático ductal, a inibição de eIF5A causa diminuição nos níveis das proteínas da via de organização do citoesqueleto e proliferação RHOA, ROCK1 e ROCK2 (FUJIMURA; CHOI; WYSE; STRNADEL *et al.*, 2015). A inibição de ROCK1 e ROCK2 causa aprisionamento do ciclo em G1, pois leva à diminuição nos níveis de expressão e proteicos de CKS1, CDK1 e Ciclina A, proteínas importantes para a progressão do ciclo celular (KÜMPER; MARDAKHEH; MCCARTHY; YEO *et al.*, 2016). Outro estudo também mostra que a inibição das proteínas ROCK causa diminuição nos níveis de expressão e proteicos das Ciclinas D1 e D3, das ciclinas dependente de quinase CDK4 e CDK6 (CHEN; GUERRIERO; LATHROP; SUNDARRAJ, 2008).

Nos mamíferos, a proteína Rb é fosforilada pelos complexos Ciclina D–CDK4/6 durante G1, permitindo que regule os fatores de transcrição E2F responsáveis pela progressão desta fase do ciclo celular (EZHEVSKY; NAGAHARA; VOCERO-AKBANI; GIUS *et al.*, 1997). Ao final de G1, o complexo Ciclina E–CDK2 fosforila Rb novamente, levando à nova regulação de E2F e permitindo que ocorra transição de G1 para S (LUNDBERG; WEINBERG, 1998) (Figura 14).

Figura 14. Fosforilação de Rb e regulação dos fatores de transcrição E2F. A fosforilação da proteína Rb (pRB) pelo complexo Ciclina D–CDK leva à sua dissociação dos fatores de transcrição E2F1-3. Estes, por sua vez, irão promover a expressão de genes importantes para a progressão de G1 para S, incluindo as Ciclina E, importante para a progressão para S, e Ciclina A da fase S.



Fonte: MORGAN, 2007 (Adaptada)

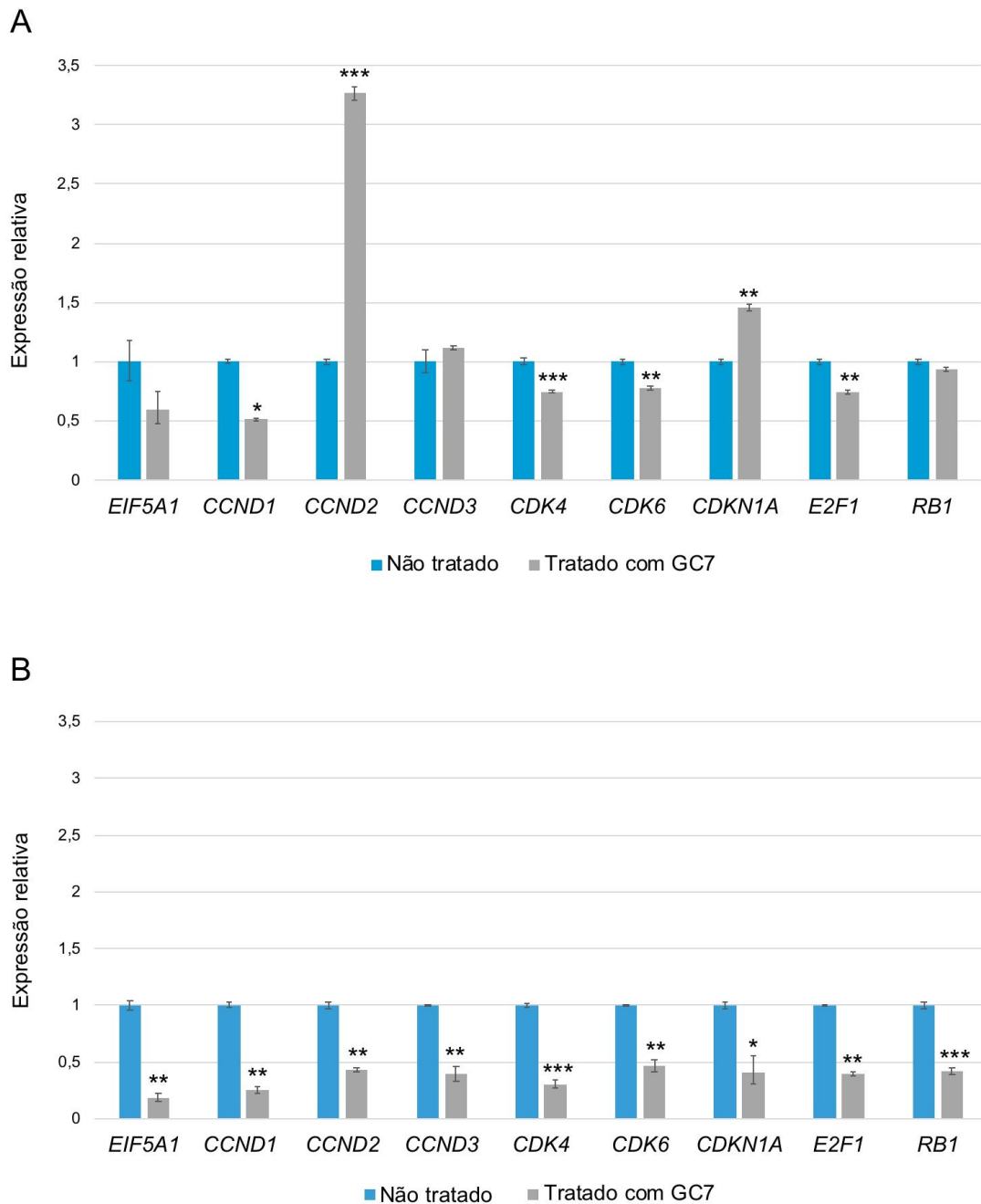
Já foi demonstrado que tratamento de linhagem celular de neuroblastoma humano com GC7, composto inibidor da hipusinação de eIF5A, causa diminuição nos níveis proteicos de CDK4, de Rb total e fosforilada, e aumento de p21 (BANDINO; GEERTS; KOSTER; BACHMANN, 2014). De forma semelhante, inibição direta em linhagem de carcinoma hepatocelular do outro homólogo em mamífero de eIF5A, o eIF5A-2, que é muito relacionado a neoplasias, leva à diminuição nos níveis proteicos de CDK6, das Ciclinas D1 e E, e aumento de p21 (CAO; LIN; FU; TANG *et al.*, 2017). A proteína p21 é uma inibidora de CDK, ela impede a posterior fosforilação de Rb pelo complexo Ciclina E–CDK2, levando ao aprisionamento em G1 em situações de estresse (BRUGAROLAS; MOBERG; BOYD; TAYA *et al.*, 1999). Já as proteínas ROCK não parecem regular a expressão de p21 (KÜMPER; MARDAKHEH; MCCARTHY; YEO *et al.*, 2016).

Portanto, para determinar se a inibição de eIF5A em mamífero leva à alteração da expressão destes genes relacionados a progressão de G1, foi realizado ensaio de qRT-PCR em tempo real a partir do tratamento de células da linhagem RAW 264.7 de camundongo com o inibidor de hipusinação GC7, onde estudos prévios de nosso grupo mostram que o tratamento com GC7 leva a acúmulo destas células entre G0 e G1 do ciclo celular (DE ALMEIDA JR, 2015).

O composto GC7 atua inibindo a enzima da primeira etapa da via de hipusinação de eIF5A, a DHPS, impedido a formação do aminoácido hipusina (PARK; WOLFF; LEE; FOLK, 1994), necessário para que eIF5A consiga ser funcional (PARK; WOLFF; SMIT-MCBRIDE; HERSHEY *et al.*, 1991). O tratamento das células com GC7 foi feito por 48 horas e por 72 horas, considerando que o tempo de meia-vida de eIF5A hipusinada na linhagem RAW 264.7 é de 24 horas (DE ALMEIDA JR; TOLEDO; ROSSI; ROSSETTO *et al.*, 2014).

Assim, foi avaliada a expressão dos genes *EIF5A1*, *CCND1* (Ciclina D1), *CCND2* (Ciclina D2), *CCND3* (Ciclina D3), *CDK4*, *CDK6*, *CDKN1A* (p21), *E2F1* e *RB1*. O ensaio de qRT-PCR em tempo real mostra que há estatisticamente diferença na expressão dos genes *CCND1* (Ciclina D1), *CCND2* (Ciclina D2), *CDK4*, *CDK6*, *CDKN1A* (p21) e *E2F1* após 48 horas de tratamento das células com GC7 (Figura 15A). Após 72 horas de tratamento todos os genes avaliados tiveram sua expressão estatisticamente diminuída (Figura 15B).

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. A. Gráfico demonstrando a expressão relativa dos genes de interesse após tratamento das células com GC7 por 48 horas. **B.** Gráfico demonstrando a expressão relativa dos genes de interesse após tratamento das células com GC7 por 72 horas. A análise estatística foi feita utilizando o teste t de Student, onde o valor de p está representado como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, e *** $p < 0,001$. Para todas as barras, dados são média $\pm$ desvio padrão.



Fonte: Autoria própria

Como descrito na literatura, a inibição de eIF5A em células de mamífero causa diminuição dos níveis proteicos da Ciclina D1, CDK4, CDK6, Rb, e aumento de p21 (BANDINO; GEERTS; KOSTER; BACHMANN, 2014; CAO; LIN; FU; TANG *et al.*, 2017). Também, a inibição das proteínas ROCK causa diminuição na expressão e nos níveis proteicos da Ciclina D1 e D3, e CDK4 e CDK6 (CHEN; GUERRIERO; LATHROP; SUNDARRAJ, 2008), sendo que ROCK é dependente de eIF5A para sua tradução (FUJIMURA; CHOI; WYSE; STRNADEL *et al.*, 2015).

Dessa forma, o ensaio de qRT-PCR em tempo real valida a informação descrita na literatura mostrando que a alteração nos níveis proteicos de Ciclina D1, CDK4, CDK6 e p21 ocorre devido a alteração em sua expressão, podendo indicar que o aprisionamento em G1 pela inibição da funcionalidade de eIF5A ocorre através da diminuição da expressão destes genes envolvidos na progressão de G1, e pelo aumento na expressão da inibidora de CDK p21, que atua bloqueando a progressão de G1 para S.

Observa-se também aumento de aproximadamente 3,5 (*fold change*) da expressão de *CCND2* (Ciclina D2). Estudo mostra que Ciclina D2 pode apresentar níveis mais altos de expressão em algumas situações de estresse, impedindo a replicação do DNA (MEYYAPPAN; WONG; HULL; RIABOWOL, 1998), o que poderia explicar a alteração de sua expressão durante inibição de eIF5A.

A expressão diminuída de todos os genes testados após o tratamento com GC7 por 72 horas, incluindo a da própria eIF5A, pode indicar que, após um período longo de inibição, a célula apresenta regulação negativa geral devido ao impacto de ausência prolongada da função de eIF5A na linhagem RAW 264.7.

No entanto, é descrito que tratamento com GC7 por 72 horas em linhagem celular de neuroblastoma humano leva a aumento do nível proteico de p21 (BANDINO; GEERTS; KOSTER; BACHMANN, 2014). Diferentemente, o resultado obtido aqui mostra que o tratamento da linhagem RAW 264.7 com GC7 por 72 horas leva a diminuição da expressão de *CDKN1A*, gene que codifica p21. Esta diferença de resultados pode se dar devido às linhagens utilizadas no trabalho citado e aqui não serem as mesmas.

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).

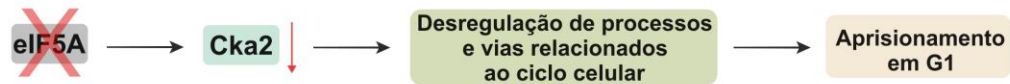
Na levedura, a diminuição dos níveis proteicos de Sic1, inibidora de CDK que regula a transição da fase G1 para S do ciclo celular, pode indicar que o aprisionamento em G1 não ocorre através das vias que atuam na regulação da estabilidade de Sic1. Enquanto a diminuição dos níveis proteicos de Cka2, componente 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).

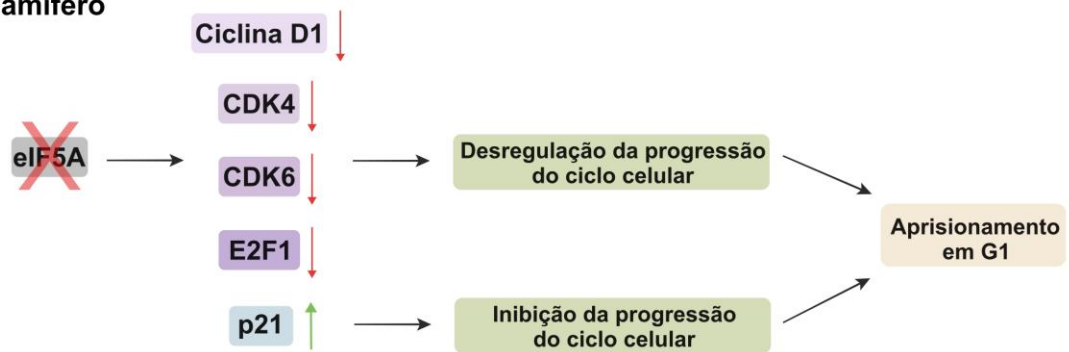
Em mamífero, as diminuições da expressão de *CCND1* (Ciclina D1), *CDK4*, *CDK6* e *E2F1* podem estar contribuindo para o aprisionamento na fase G1, visto que suas proteínas estão diretamente envolvidas na regulação da progressão de G1. Além disso, ocorre aumento na expressão de *CDKN1A*, que codifica 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.

Figura 16. Impacto da ausência de função de eIF5A na levedura e em mamífero. Os resultados obtidos neste trabalho mostram que ausência de eIF5A funcional causa diminuição dos níveis proteicos de Cka2 na levedura *S. cerevisiae*, o que poderia levar este organismo ao aprisionamento em G1 do ciclo celular. Em linhagem celular do mamífero *M. musculus*, a ausência de eIF5A funcional causa diminuição da expressão de *CCND1* (Ciclina D1), *CDK4*, *CDK6* e *E2F1*, e aumento na expressão de *CDKN1A* (p21), o que poderia levar ao aprisionamento em G1 neste organismo.

Levedura



Mamífero



Fonte: Autoria própria

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.

APÊNDICE

Tabela 11. Ontologia genética, utilizando a ferramenta *Rank by GO* do repositório *online Yeastract* (TEIXEIRA; MONTEIRO; PALMA; COSTA *et al.*, 2018), de genes relacionados a ciclo celular que possuem interação genética negativa com o nocaute de *SIC1*, de acordo com o banco de dados *online The Cell Map* (USAJ; TAN; WANG; VANDERSLUIS *et al.*, 2017).

GO ID	GO term	p-value	Genes
GO:0006260	<i>DNA replication</i>	2,18787E-08	MCM7 MRC1 RIM1 CDC34 POL5 MCM3 ECO1 MCM6 ORC6 CDC6 POL32 MCM5 POB3 TOF1 RFC4 REV3 CTF4 ORC4 MCM2 ORC2
GO:0007049	<i>cell cycle</i>	2,19536E-08	MCM7 SHS1 MCD1 CDC34 PDS1 RGP1 SCC2 RAD9 SWM1 YHP1 TOM1 SCC4 RAD24 CDC4 ECO1 CDC14 DOC1 CSE1 MCM6 MAD1 DAM1 BUB1 SDA1 AIM20 CDC6 BFA1 CDC16 SAP190 DAD2 MCM5 FAR8 PDS5 TOF1 APC1 RFC4 NUF2 SLG1 IPL1 RAD53 CHL1 LTE1 CDC27 STU1 MCM2 SMC3 NSP1
GO:0000727	<i>double-strand break repair via break-induced replication</i>	0,000168102	MCM7 MCM3 MCM6 POL32 MCM5 CTF4 MCM2
GO:0000082	<i>G1/S transition of mitotic cell cycle</i>	0,000225438	SHS1 YRB1 CDC34 CDC4 RRD1 CDC6 SAP190
GO:0006302	<i>double-strand break repair</i>	0,000471947	MCD1 SCC2 RAD9 SCC4 ECO1 RSC1 PDS5 RAD17
GO:0006281	<i>DNA repair</i>	0,008268562	MRC1 RAD9 EAF5 KRE29 RAD24 ECO1 SWC4 RRD1 REV7 POB3 PDS5 TOF1 IES2 RPS3 REV1 RAD17 REV3 RAD53 CTF4 LYS20