
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA
CELULAR E MOLECULAR)**

**AVALIAÇÃO DO FATOR DE INÍCIO DE TRADUÇÃO DE EUCARIOTOS 5A
(eIF5A) NA TRADUÇÃO DAS PROTEÍNAS S6Ks**

LETICIA MENEGUELLO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Março - 2017

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA
CELULAR E MOLECULAR)**

**AVALIAÇÃO DO FATOR DE INÍCIO DE TRADUÇÃO DE EUCARIOTOS 5A
(eIF5A) NA TRADUÇÃO DAS PROTEÍNAS S6Ks**

LETICIA MENEGUELLO

Orientador: Prof. Dr. Augusto Ducati Luchessi

Março - 2017

547.75 Meneguello, Letícia
M541a Avaliação do fator de início de tradução de eucariotos 5A
(eIF5A) na tradução das proteínas S6Ks / Letícia Meneguello.
- Rio Claro, 2017
88 f. : il., figs., tabs., quadros

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Augusto Ducati Luchessi

1. Proteínas. 2. S6Ks. 3. S6K2. 4. eIF5A. 5. Controle
traducional. 6. Síntese proteica. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: AVALIAÇÃO DO FATOR DE INÍCIO DE TRADUÇÃO DE EUCARIOTOS 5A (eIF5A) NA TRADUÇÃO DAS PROTEÍNAS S6Ks

AUTORA: LETICIA MENEGUELLO

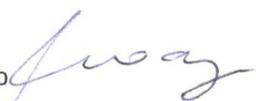
ORIENTADOR: AUGUSTO DUCATI LUCHESSI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. AUGUSTO DUCATI LUCHESSI
Faculdade de Ciências Aplicadas / UNICAMP



Profa. Dra. ALICE CRISTINA RODRIGUES
Departamento de Farmacologia / Universidade de São Paulo



Profa. Dra. MARIA IZABEL SOUZA CAMARGO
Departamento de Biologia / IB-Rio Claro



Rio Claro, 24 de março de 2017

AGRADECIMENTOS

Aos meu pais Aldemir e Fátima e à minha família querida pelo amor e apoio incondicional em todos os momentos. Vocês são o meu maior exemplo de força de vontade, trabalho e dedicação;

À Universidade Estadual Paulista (UNESP) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular) pela oportunidade de realização do mestrado;

Ao Laboratório de Biotecnologia da Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA) da UNICAMP pela estrutura disponível para a realização do projeto de pesquisa;

Ao Prof. Dr. Augusto D. Luchessi pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, pela confiança depositada em mim e por todos os valiosos ensinamentos ao longo desses anos;

Ao meu noivo, amigo e companheiro André Pulschen por estar sempre ao meu lado me incentivando e por ser o meu porto seguro;

Em especial, aos meus amigos do Biotec, Letícia Tamborlin, Karina D. Pereira e André R. G. Proença, pela amizade e colaboração. Agradeço também as colaboradoras, Renata Caroline e Mariana Artal;

Ao Prof. Dr. Sandro R. Valentini pelo fornecimento da estrutura de seu laboratório e reagentes para a realização dos experimentos em colaboração;

À Natalia M. Barbosa do Laboratório de Biologia Molecular de Micro-organismos da UNESP-Araraquara pelos ensinamentos e pela grande ajuda com os experimentos de leveduras;

Ao Dr. Leo K. Iwai do Instituto Butantã pela contribuição com os experimentos de espectrometria de massas;

Ao Dr. Fernando M. Simabuco pela colaboração e contribuição com diversos reagentes utilizados no trabalho;

Aos membros dos Laboratórios NUTRE e LABGEN pela amizade e convivência;

À CAPES pelo primeiro ano de bolsa e a FAPESP pela bolsa de estudos (2014/27154-0) e apoio a pesquisa JP (2010/18095-0).

***“Nunca percorra pelo caminho traçado,
pois ele conduz somente até onde os
outros já foram.”***

Alexander Graham Bell

RESUMO

O fator de início de tradução de eucariotos 5A (eIF5A) caracteriza-se por ser a única proteína conhecida que apresenta o aminoácido hipusina, formado a partir de uma modificação pós-traducional chamada hipusinação. Apesar de originalmente eIF5A ter sido denominado como fator de início de tradução, a função de eIF5A têm sido relacionada principalmente com a etapa de alongação da tradução. Desde 2013, trabalhos importantes apresentaram evidências de que eIF5A hipusinado possui um papel fundamental na tradução de mRNAs específicos de proteínas que contém consecutivos resíduos de aminoácidos prolina (PPP ou PPG). Tendo em vista estas informações, o objetivo principal deste trabalho consiste no estudo da dependência de eIF5A na tradução da proteína ribossomal S6 kinase 2 (S6K2), pois a mesma apresenta em sua extremidade C-terminal uma região contendo cinco resíduos consecutivos de prolina. Neste contexto, por meio da produção de uma proteína mutante (S6K2 Δ Pro), substituindo a região de poli-prolina de S6K2 pela sequência correspondente da proteína homóloga ribossomal S6 kinase 1 (S6K1), foram avaliadas a produção e habilidade fosforilativa da proteína mutante em comparação com S6K2 selvagem. Observou-se que S6K2 Δ Pro é produzida e sua superexpressão aumenta o conteúdo da proteína ribossomal S6 fosforilada, principal alvo de fosforilação das proteínas S6Ks, assim como a superexpressão das proteínas S6K1 e S6K2. Análises de silenciamento gênico em células HeLa, utilizando moléculas de siRNA para eIF5A, mostraram que a proteína S6K2 endógena não tem seu conteúdo alterado em função da depleção do conteúdo de eIF5A nas condições avaliadas. Além disso, regulando a expressão gênica de *TIF51A* (homólogo do gene *EIF5A* humano) em *Saccharomyces cerevisiae* foi observado que a tradução de S6K2 foi apenas levemente afetada pela redução do conteúdo de eIF5A quando comparado à proteína LDB17, uma proteína com conhecida dependência de eIF5A para sua tradução. Ademais, ensaios de imunoprecipitação de S6K2 e S6K2 Δ Pro seguido de identificação dos peptídeos por espectrometria de massas mostraram que a região de poli-prolina influencia as interações proteína-proteína de S6K2, visto que, com a mudança da sequência dessa região, observou-se uma interferência no perfil de proteínas associadas, com destaque para as proteínas com atividade transportadora. Dentre as proteínas identificadas, os resultados indicam que a interação de S6K2 com o fator de alongação 2 (eEF2) é influenciada pela região de prolina presentes no C-terminal de S6K2.

Palavras-chave: S6K2, poli-prolina, eIF5A, S6Ks

ABSTRACT

The eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A), which is highly conserved among eukaryotes, contain the unusual amino acid hypusine, synthesized by a post-translational modification called hypusination. Even though eIF5A was first denominated as an initiation factor, it has been related to elongation step of the translation process. Since 2013, many studies proposed that eIF5A acts on rescue the ribosome stalling promoted by synthesis of poly-proline motifs containing PPP or PPG sequences. The aim of this study is to evaluate the eIF5A dependence on Ribosomal S6 kinase 2 protein (S6K2) translation, once S6K2 contains a poly-proline stretch on its C-terminus with five consecutive prolines (PPPPP). By producing a mutant protein (S6K2Pro), replacing the polyproline motif on S6K2 for the same region found on homologous protein Ribosomal S6 kinase 1 (S6K1), the content and phosphorylation activity were evaluated. It was observed that S6K2 Δ Pro is produced by HeLa cells and its RPS6 phosphorylation ability, which is the mainly target of S6Ks phosphorylation, is maintained. Analyzes using siRNA molecules for eIF5A gene silencing in HeLa cells have shown that the endogenous S6K2 protein does not have its content altered as a function of the depletion of the eIF5A content, under the conditions evaluated. Furthermore, by regulating the *TIF51A* gene expression (homologous of the human *EIF5A* gene) in *Saccharomyces cerevisiae* it was observed that the translation of S6K2 was only slightly affected by the reduction of the content of eIF5A when compared to the poly-proline LDB17 protein, a protein with known dependence of eIF5A for its translation. In addition, immunoprecipitation assays of S6K2 and S6K2 Δ Pro followed by identification of the peptides by mass spectrometry showed that the poly-proline region influences the protein-protein interactions of S6K2, since it was observed an interference in the profile of associated proteins, especially proteins classified as transport activity, in function of poly-proline replacement. Among the identified proteins, the results indicate that the interaction between S6K2 and the elongation factor 2 (eEF2) is influenced by the poly-proline region present at the C-terminal of S6K2.

Keywords: S6K2, polyproline, eIF5A, S6Ks

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismo de início da síntese proteica em eucariotos.	23
Figura 2 – Mecanismo de alongação da tradução de eucariotos.	24
Figura 3 – Mecanismo de hipusinação da proteína eIF5A.	25
Figura 4 – Proteínas envolvidas na via de mTOR/S6Ks.....	29
Figura 5 – Isoformas e domínios das proteínas S6K1 e S6K2 e os resíduos de ativação das proteínas via fosforilação pelo complexo mTORC1 e PDK1.	31
Figura 6 – Alinhamento das sequências de aminoácidos das regiões C-terminal de S6K1 e S6K2 humanas, com destaque para a sequência contendo cinco resíduos de prolina consecutivas.	33
Figura 7 – Alinhamento das sequências de aminoácidos das regiões C-terminal da proteína S6K2 de diferentes espécies de mamíferos.	33
Figura 8 – Mapa do vetor plasmidial pcDNA-FLAG utilizado na realização das construções pFLAG-S6K1, pFLAG-S6K2 e pFLAG-S6K2ΔPro.	37
Figura 9 – Sistema TET-OFF regulando a expressão gênica de <i>TIF51A</i>	48
Figura 10 – Plasmídeo utilizado nas construções pYES2-S6K1, pYES2-S6K2 e pYES2-S6K2ΔPro.	49
Figura 11 – Representação da sequência da construção S6K2ΔPro e análise do conteúdo das proteínas FLAG-S6K1, FLAG-S6K2 e FLAG-S6K2ΔPro.	52
Figura 12 – Análise da funcionalidade das proteínas FLAG-S6K1, FLAG-S6K2 e FLAG-S6K2ΔPro.	54
Figura 13 – Avaliação do conteúdo proteico e do transcrito de eIF5A em células HeLa após o silenciamento gênico por RNA de interferência e análise do conteúdo endógeno da proteína S6K2.....	56
Figura 14 – Leveduras com promotor de eIF5A reprimível por tetraciclina ou doxiciclina transformadas com os plasmídeos pBG1805-LDB17, pYES2-S6K1, pYES2-S6K2, pYES2-S6K2ΔPro.	58

Figura 15 – Gel corado com prata dos eluidos da IP de GFP (27 kDa), S6K2 (54 kDa) e S6K2 Δ Pro (54 kDa).	59
Figura 16 – Diagrama de Venn da representação das quantidades de proteínas identificadas pelo espectrômetro de massa nos ensaios de imunoprecipitações.....	60
Figura 17 – Classificações pelo sistema PANTHER das funções moleculares das proteínas identificadas no ensaio de interactoma de S6K2.....	62
Figura 18 – Classificações pelo sistema PANTHER das funções moleculares das proteínas identificadas no ensaio de interactoma de S6K2 Δ Pro.....	62
Figura 19 – Classificações pelo sistema PANTHER das funções moleculares das 74 proteínas identificadas na imunoprecipitação de S6K2 mas não de S6K2 Δ Pro.....	63
Figura 20 – Classificação pelo sistema PANTHER das funções biológicas das 74 proteínas identificadas na imunoprecipitação de S6K2 mas não de S6K2 Δ Pro.....	63
Figura 21 – Demonstração do <i>network</i> de interações de S6K2 com as 74 proteínas identificadas apenas no interactoma de S6K2 e não de S6K2 Δ Pro utilizando o programa STRING.	65
Figura 22 – Validação das interações de S6K2 por <i>western blotting</i>	67
Figura 23 – Certificado da premiação <i>SBBQ Award 2016</i>	88

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Oligonucleotídeos utilizados nas ampliações por PCR	36
Quadro 2 – Oligonucleotídeos utilizados nas ampliações de qPCR	44
Quadro 3 – Genótipo da levedura utilizada nos ensaios	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

40S	Subunidade menor ribossomal eucariótica
60S	Subunidade maior ribossomal eucariótica
80S	Ribossomo eucariótico
4E-BP	Proteína ligante do fator de início de tradução de eucariotos 4E
AGC	quinases PKA, PKG e PKC
ATP	Adenosina trifosfato
cDNA	DNA complementar
CTD	Domínio carboxi-terminal
C-terminal	extremidade carboxi-terminal
DHS	Deoxihipusina sintase
DMEM	<i>Dulbecco's modification of Eagle's medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP)
DOOH	Deoxihipusina hidroxilase
EBOV	Ebola vírus
eEF1A	Fator de alongação de eucariotos 1A
eEF1B	Fator de alongação de eucariotos 1B
eEF2	Fator de alongação de eucariotos 2
eEF2K	Fator de alongação de eucariotos 2 - quinase
eIF1	Fator de início de tradução de eucariotos 1
eIF1A	Fator de início de tradução de eucariotos 1A
eIF2	Fator de início de tradução de eucariotos 2

eIF3	Fator de início de tradução de eucariotos 3
eIF4A	Fator de início de tradução de eucariotos 4A
eIF4B	Fator de início de tradução de eucariotos 4B
eIF4E	Fator de início de tradução de eucariotos 4E
eIF4F	Fator de início de tradução de eucariotos 4F
eIF4G	Fator de início de tradução de eucariotos 4G
eIF4H	Fator de início de tradução de eucariotos 4H
eIF5	Fator de início de tradução de eucariotos 5
eIF5A	Fator de início de tradução de eucariotos 5A
eIF5B	Fator de início de tradução de eucariotos 5B
EF-P	Fator de elongação P
EVH1	Drosophila vasodilatador-estimulado fosfo-proteína homóloga 1
GBL	Proteína G da subunidade-semelhante- β
GDP	Guanosina difosfato
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GTP	Guanosina trifosfato
GYF	Domínio glicina-tirosina-fenilalanina
HEK293	<i>Human Embryonic Kidney 293 cells</i>
HIV-1	Vírus da Imunodeficiência Humana-1
HM	Motivo hidrofóbico
IGF	(<i>Insulin Growth Factor 1</i>) - Fator de crescimento Insulina-1
IgG	Imunoglobulina G
KD	Domínio de quinase
LC	Cromatografia líquida

LB	meio Luria-Bertani
LBD17	LOB <i>domain-containing protein 17</i>
mRNA	RNA mensageiro
MS	Espectrometria de massas
mTORC1	Complexo1 <i>mammalian target of rapamycin</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NLS	Sítio de localização nuclear
NMD	<i>Nonsense mediated-decay</i>
NPC	Complexo do poro nuclear
NTD	Domínio amino-terminal
N-terminal	extremidade amino-terminal
p54-S6K2	Ribossomal S6 kinase 2 (54 kDa)
p70-S6K1	Ribossomal S6 kinase 1 (70 kDa)
PABP	Proteínas ligantes da cauda de poli-A
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDCD4	<i>Programmed cell death protein 4</i>
PDK1	Fosfoinosítídeo-dependente quinase-1
PDZ	Proteínas PSD95, DlgA e zo-1
PEG	polietilenoglicol
PI3K/AKT	Fosfatidilinositol-3-quinase
PKA	cAMP-dependent protein kinase
PKB	Protein kinase B/AKT
PKC	Proteína quinase C

PKG	cGMP-dependente proteina quinase
PPG	prolina-prolina-guanina
PPP	prolina-prolina-prolina
PTC	códon de terminação precoce
RAS/MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
REV	Regulador da transcrição do gene viral
RNA	Ácido ribonucleico
RPL11	proteína ribossomal L11
RPP0	proteína ribossomal P0
RPS5	proteína ribossomal S5
RPS6	proteína ribossomal S6
<i>RPS6KB1</i>	gene codificador da proteína humana S6K1
<i>RPS6KB2</i>	gene codificador da proteína humana S6K2
RT-PCR	<i>Reverse transcription</i> - PCR
qPCR	PCR quantitativa
S6K1	proteína ribossomal S6 kinase 1
S6K2	proteína ribossomal S6 kinase 2
S6K2 Δ Pro	proteína ribossomal S6 kinase 2 mutante de prolina
S6Ks	proteína ribossomal S6 kinase
siRNA	<i>small interfering</i> RNA
SDS	dodecilo sulfato de sódio
SDS-PAGE	dodecilo sulfato de sódio – Eletroforese gel de poli-acrilamida
SFB	soro fetal bovino
SH3	Domínio homólogo SRC 3

SC	meio sintético completo para levedura
Sítio A	sítio aminoacil
Sítio E	sítio de saída " <i>exit</i> "
Sítio P	sítio peptídil
TM	<i>turn motif</i>
TOS-MOTIF	motivo de reconhecimento de mTOR
t-RNA	RNA transportador
TET-OFF	Sistema de expressão gênica reprimível por tetraciclina
<i>TIF51A</i>	gene codificador de eIF5A
Triton X-100	polietilenoglicol-terc-octilfenil eter
Tween 20	monolaurato de polietilenoglicol-sorbitana
WW	Domínio de ligação WW
YPD	" <i>yeast extract, peptone, dextrose</i> " (meio rico para levedura)
ZIKV	Zika vírus

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
μL	microlitro
μM	micromolar
μg	micrograma
ACN	acetonitrila
CaCl ₂	cloreto de cálcio
Cm	centímetro
cm ³	centímetro cúbico
CO ₂	gás carbônico (dióxido de carbono)
DEPC	Dicarbonato de dietila
DMSO	dimetilsufóxido
DO	Densidade Óptica
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
HCl	ácido clorídrico
KCl	cloreto de potássio
kDa	quilodáton
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotássico
kV	quilovolt
M	molar
m/z	massa/carga
MgCl ₂	cloreto de magnésio

mL	mililitro
mM	milimolar
mm	milímetro
ms	milisegundo
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Fosfato dissódico heptahidratado
NaCl	cloreto de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
ng	nanograma
nL	nanolitro
nm	nanômetro
pmol	picomol
ppm	parte por milhão
rpm	rotação por minuto
TFA	ácido trifluoroacético
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
U	unidade de atividade enzimática
V	Volt
xg	aceleração gravitacional

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 O mecanismo de início da síntese proteica	22
1.2 A etapa de alongação da tradução	23
1.3 O fator de início de tradução de eucariotos 5A (eIF5A)	25
1.4 A proteína Ribossomal S6 kinase 2 (S6K2)	28
2 OBJETIVOS GERAIS.....	34
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	34
3 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Clonagem de DNA utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	35
3.1.1 Preparação dos insertos	35
3.1.2 Desfosforilação do vetor plasmidial.....	35
3.1.3 Reação de ligação.....	36
3.1.4 Preparo de <i>E. coli</i> competente	37
3.1.5 Transformação de <i>E. coli</i> competente.....	38
3.1.6 Preparação de DNA plasmidial de <i>E. coli</i> em pequena escala (Miniprep) pelo método de lise alcalina	38
3.1.7 Preparação de DNA plasmidial de <i>E. coli</i> em média escala (Midiprep).....	39
3.2 Análise do conteúdo de proteínas específicas em células HeLa por SDS-PAGE (<i>Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>) seguido de <i>western blotting</i>	39
3.2.1 Cultivo de células HeLa.....	39
3.2.2 Transfecção celular	40
3.2.3 Silenciamento gênico por RNA de interferência (<i>small interference RNA- siRNA</i>).....	40
3.2.4 Preparação de extratos proteicos e quantificação de proteína total.....	40
3.2.5 SDS-PAGE seguido de <i>western blotting</i>	41

3.3 Preparação de RNA total, síntese do cDNA e reação em cadeia pela polimerase (PCR) em Tempo Real	42
3.3.1 Preparação de RNA total	42
3.3.2 Transcrição reversa (RT): Síntese de cDNA	42
3.3.3 Reação em cadeia pela polimerase quantitativa (qPCR)	43
3.3.4 Análise de expressão gênica	43
3.4 Imunoprecipitação seguida de análise por LC-MS	44
3.4.1 Coloração de gel SDS-PAGE com nitrato de prata	45
3.4.2 Digestão Tripsínica em solução	45
3.4.3 Dessalinização com cartuchos Sep-Pak Light tC18	46
3.4.4 Análise no Espectrômetro de Massas	46
3.4.5 Análises proteômicas	47
3.5 Ensaio em modelo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> no sistema TET-OFF regulando a expressão gênica de <i>TIF51A</i>	48
3.5.1 Transformação de leveduras	50
3.5.2 Avaliação da dependência do homólogo de eIF5A em <i>S. cerevisiae</i> na produção das proteínas S6K1, S6K2 e S6K2ΔPro na linhagem TET-OFF	51
3.5.3 Extrato proteico de células de leveduras	51
4 RESULTADOS	52
4.1 Análise do conteúdo das proteínas FLAG-S6K1, FLAG-S6K2 e FLAG-S6K2ΔPro	52
4.2 Análise de expressão da proteína S6K2 mutada (S6K2ΔPro) e sua funcionalidade	53
4.3 Análise do silenciamento gênico de eIF5A via siRNA por RT-qPCR e <i>western blotting</i> e verificação da influência de seu <i>knockdown</i> na produção da proteína S6K2 em células HeLa	55
4.4 Análise da influência do homólogo de eIF5A em <i>S. cerevisiae</i> na tradução de S6K1, S6K2 e S6K2ΔPro regulando a expressão gênica de <i>TIF51A</i> no sistema TET-OFF	57

4.5 Imunoprecipitação das proteínas FLAG-GFP, FLAG-S6K2 e FLAG-S6K2ΔPro superexpressas em células HeLa e identificação das proteínas de interação por espectrometria de massas.....	58
4.6 Classificação das proteínas presentes na imunoprecipitação de S6K2 e de S6K2ΔPro utilizando o PANTHER	60
4.7 <i>Network</i> das interações de S6K2 com outras proteínas que podem ser influenciadas pela região de poli-prolina.....	64
4.8 Imunoprecipitação de FLAG-GFP, FLAG-S6K2 e FLAG-S6K2ΔPro superexpressas em células HeLa e validação das proteínas de interação por <i>western blotting</i>	66
5 DISCUSSÃO	68
6 CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
ANEXO 1 - Proteínas identificadas pelo espectrômetro de massas e as quantidades de peptídeos identificados.....	80
ANEXO 2 - Produções bibliográficas.....	87

1 INTRODUÇÃO

1.1 O mecanismo de início da síntese proteica

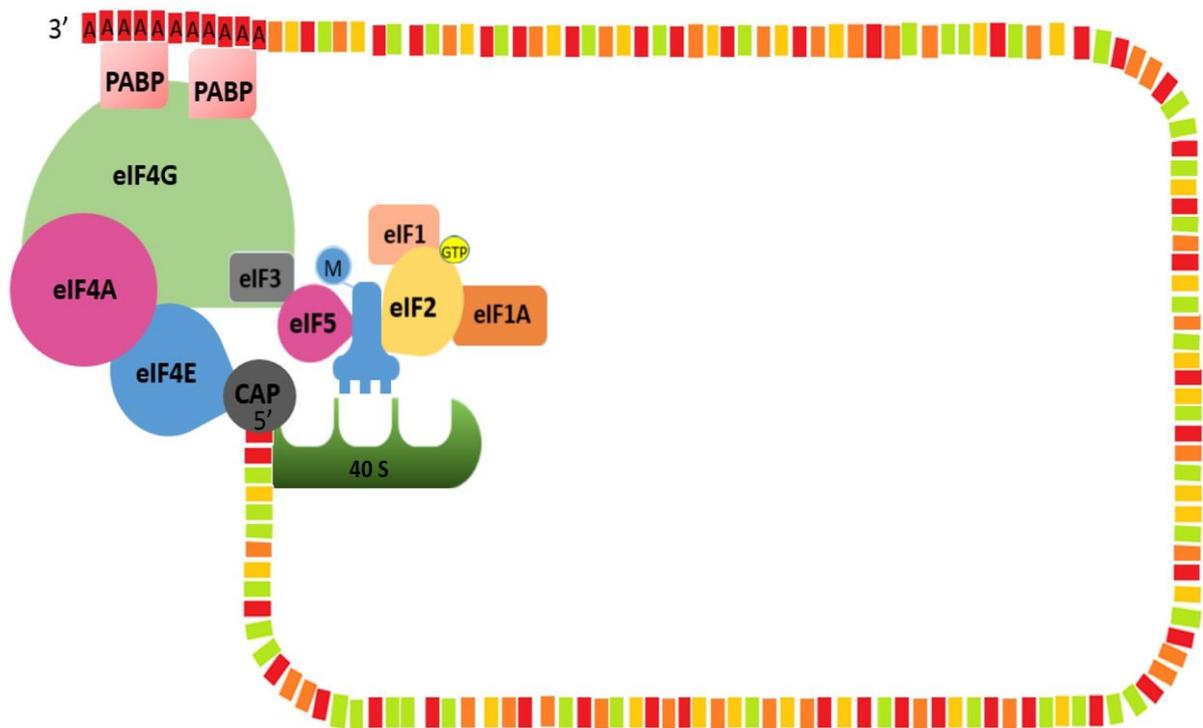
O mecanismo de síntese proteica consiste em um processo altamente regulado e complexo que ocorre de maneira coordenada com a atuação de uma série de proteínas denominadas eIF's, do inglês *eukaryotic Initiation Factors*, que são os fatores de início de tradução eucarióticos. A iniciação do processo de tradução ocorre com a formação do complexo de pré-iniciação 43S. O complexo 43S é composto pelo aminoácido metionina ligada à seu t-RNA (Met-tRNA) associado ao fator eIF2 ligado a uma molécula de GTP (eIF2-GTP) e a subunidade menor ribossomal 40S. A formação deste complexo conta com a participação de outros fatores de início de tradução como eIF3, eIF1, eIF1A, eIF5, que se associam a esse complexo (HINNEBUSCH AND LORSCH, 2012).

Em sequência, o complexo 43S reconhece e se liga à extremidade 5' de um RNA mensageiro, em um processo facilitado pela presença de fatores de início de tradução associados ao quepe, como eIF4B, eIF4H e o complexo eIF4F, formado pelos fatores eIF4E, eIF4G e eIF4A (HINNEBUSCH AND LORSCH, 2012). A presença destes fatores associados ao mRNA é um dos mecanismos de controle do processo de tradução, visto que o complexo eIF4F interage simultaneamente ao quepe, através de eIF4E, e a cauda de poli-A pela ligação de eIF4G com as proteínas ligantes da cauda de poli-A (PABP) e eIF4E (Figura 1), desta forma estabilizando a estrutura do mRNA (TARUN AND SACHS, 1996; WAKIYAMA et al., 2000). Com isso, antes de iniciar a síntese proteica é verificado se ambas as extremidades do mRNA encontram-se intactas, além de permitir a manutenção da conformação circular do mRNA para que a tradução ocorra de maneira eficiente (PESTOVA et al., 2007).

A seguir, o complexo 43S se transloca ao longo do RNA mensageiro na direção 5' para 3', até identificar o códon de iniciação, sendo a facilidade de reconhecimento determinada pela sequência consenso kozak A/GXXAUGA/G (KOZAK, 1981). O correto pareamento de bases entre o anti-códon do tRNA e o códon do mRNA permitindo que Met-tRNA_i fique presente no sítio P ribossomal é o evento inicial do reconhecimento do códon de iniciação. Após este reconhecimento,

ocorre a conversão eIF2-GTP em eIF2-GDP, que neste estado por apresentar baixa afinidade pelo Met-tRNA é dissociado (KAPP AND LORSCH, 2004), assim como os outros fatores, e é recrutada a subunidade maior do ribossomo 60S, completando a montagem da estrutura ribossomal 80S, com auxílio do fator eIF5B (PESTOVA et al., 2000).

Figura 1 – Mecanismo de início da síntese proteica em eucariotos.



Fonte: Elaborado pela autora.

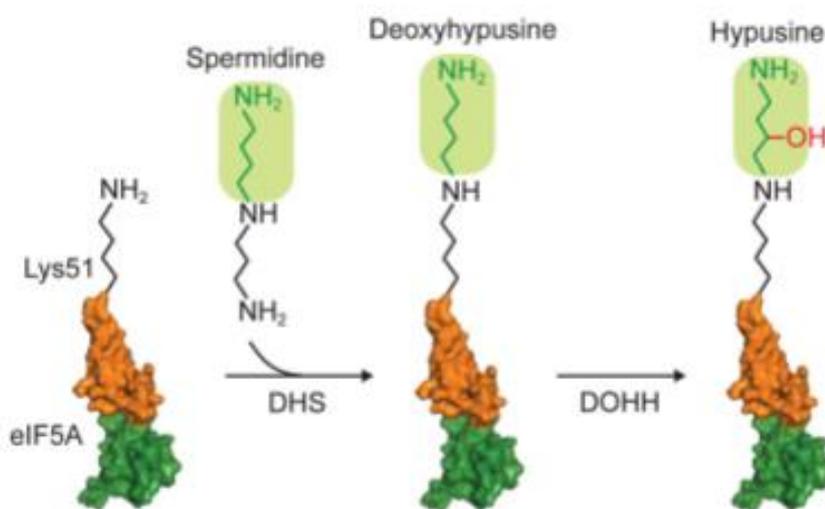
1.2 A etapa de alongação da tradução

Após o reconhecimento do códon de iniciação e consequente montagem do ribossomo eucariótico 80S, o próximo aminoácido a ser incorporado na cadeia polipeptídica ligado à seu t-RNA, é trazido ao sítio A ribossomal “escorado” pelo fator eEF1A-GTP (DEVER AND GREEN, 2012). O reconhecimento do códon pelo tRNA gera a hidrólise de GTP do fator eEF1A, liberando este fator e permitindo que o aminoacil-tRNA se acomode ao sítio A ribossomal (BROWNE AND PROUD, 2002). Após o correto pareamento, a ligação peptídica é rapidamente formada entre o aminoácido presente no sítio-P e o aminoácido do sítio A, sendo este mecanismo

1.3 O fator de início de tradução de eucariotos 5A (eIF5A)

O fator de início de tradução de eucariotos 5A (eIF5A) é uma proteína de aproximadamente 17 kDa altamente conservada entre eucariotos e seus homólogos em archaeas (KLIER et al., 1993a; KLIER et al., 1993b; PARK et al., 1997; PARK et al., 1993). As sequências de eIF5A de *Saccharomyces cerevisiae* e de humanos compartilham 63% de identidade, sendo que a proteína humana é capaz de substituir a de levedura, indicando que eIF5A de humano e de leveduras atue em processos celulares similares, como na síntese proteica (SCHNIER et al., 1991; CHEN AND LIU, 1997). eIF5A é a única proteína descrita que apresenta o resíduo do aminoácido hipusina, formado a partir de uma modificação pós-traducional denominada hipusinação (CHEN AND LIU, 1997; PARK et al., 1997). A hipusinação ocorre em duas etapas enzimáticas, em que na primeira etapa o radical amino-butil proveniente da poliamina espermidina é incorporado ao aminoácido lisina (K50, em humanos) pela enzima deoxyhipusina sintase (DHS), em sequência o intermediário deoxyhipusina é hidroxilado pela enzima deoxyhipusina hidroxilase (DOHH), formando a hipusina (PARK et al., 1993) (Figura 3). Da mesma forma, em procariotos uma modificação pós-traducional correlacionada com a hipusinação ocorre com o ortólogo de eIF5A encontrado em bactérias, o fator de alongação P (EF-P), em que apresenta no resíduo de lisina da região correspondente a modificação denominada lisinação (ROSSI et al., 2014).

Figura 3 – Mecanismo de hipusinação da proteína eIF5A.



Fonte: Retirado de Dever et al., (2014).

A proteína eIF5A por ser a única proteína eucariótica que contém a hipusina, têm-se sugerido que este fator pode atuar em processos biológicos fundamentais. Inicialmente, foi proposto a atuação de eIF5A na etapa da iniciação da tradução na qual a presença da hipusinação é essencial para sua atividade, visto que eIF5A humana recombinante, não hipusinada, foi incapaz de estimular a síntese *in vitro* de metionil-puomicina, ensaio que avalia a formação da primeira ligação peptídica (PARK, 1989; SMIT-MCBRIDE et al., 1989). eIF5A foi identificado associado à complexos de ribossomos durante a tradução, fortalecendo sua correlação com a síntese proteica (JAO AND CHEN, 2006, ZANELLI et al., 2006). Ademais, em ensaios de co-purificação seguidos de identificação por espectrometria de massas mostraram que eIF5A interage com componentes da maquinaria de tradução como as proteínas ribossomais RPP0, RPS5, RPL11 e com o fator eEF2 (ZANELLI et al., 2006). O fator eIF5A também já foi relacionado com a degradação de RNAs mensageiros com mutações sem sentido como códons de terminação precoce (PTC) pelo mecanismo do NMD (*Nonsense-mediated Decay*) (SCHRADER et al., 2006), além de ter sido associado ao transporte de macromoléculas pelo complexo do poro nuclear (NPC) (ROSORIOUS et al., 1999) destacando-se sua participação como cofator da proteína REV do vírus HIV-1 (BEVEC et al., 1996; KLIER et al., 1995; RUHL et al., 1993). Também foi demonstrado a atividade antirretroviral de fármacos que induzem a apoptose preferencial de células infectadas por HIV-1, através da inibição da reação de hidroxilação associada ao processo de hipusinação de eIF5A (HANAUSKE-ABEL et al., 2013). Mais ainda, sugere-se que a inibição da hipusinação e redução do conteúdo de poliaminas pode ser utilizado como terapia antiviral de infecções causadas pelos vírus HIV-1, ebola (EBOV) e flavivírus como dengue e Zika (OLSEN AND CONNOR, 2017). Além disto, alguns estudos atestam que eIF5A está correlacionada com o desenvolvimento de algumas doenças como diabetes, malária, e diferentes tipos de câncer, sendo apontada como um possível e promissor alvo terapêutico por meio da utilização de drogas inibidoras da hipusinação (KAISER, 2012).

A partir de 2013, alguns estudos em leveduras apresentaram evidências de que eIF5A possui um papel fundamental na etapa de alongação da tradução de proteínas contendo sequências com regiões ricas em aminoácidos prolina. Isto se deve ao alívio da estagnação ribossômica que ocorre durante a tradução de

sequências PPG ou PPP promovida por eIF5A (GUTIERREZ et al., 2013). O mesmo fato foi observado em seu ortólogo bacteriano, o fator de alongação P (EF-P), que também promove a formação da ligação peptídica e estabiliza o RNA transportador (tRNA) presente no centro catalítico do ribossomo. Além disto, verifica-se que na ausência de EF-P ocorre uma severa repressão na produção de proteínas com longas extensões de prolinas (DOERFEL AND RODNINA, 2013, DOERFEL et al., 2013; UDE et al., 2013). Ademais, com a remoção de EF-P, também foi observado uma estagnação ribossomal em motivos di-prolil, no qual verificou nestes casos que a pausa ribossomal depende da natureza dos aminoácidos localizados antes e depois da dupla de resíduos de prolina (PEIL et al., 2013; WOOLSTENHULME et al., 2013). Com isso, a presença de duas prolinas ligadas no sítio P com o tRNA pode ocasionar a formação de uma conformação cis-trans ou de uma ligação rígida entre as prolinas (SAHA AND SHAMALA, 2012), fato que pode gerar o requerimento de EF-P/eIF5A para a síntese destas sequências. Entretanto, apesar destas observações, a função precisa de eIF5A hipusinada para este cenário ainda não encontra-se plenamente estabelecida. Alguns autores sugerem que a ligação de eIF5A hipusinado ao sítio adjacente ao sítio P e a inserção da hipusina no centro peptidil-transferase do ribossomo pode estericamente restringir a posição das prolinas no sítio P, permitindo o alinhamento apropriado do substrato para que ocorra a ligação peptídica (DEVER et al., 2014). Ou ainda, também sugere-se que eIF5A pode atuar como uma cis-trans isomerase de prolinas para corrigir a geometria de di-prolinas no sitio P, para que as prolinas entrem no túnel de saída ribossomal e formem a ligação peptídica com o substrato presente no sítio A (DEVER et al., 2014).

Proteínas com regiões ricas em prolinas são comumente encontradas em eucariotos (WILLIAMSON, 1994). Em humanos, observa-se em que 4,4% de todos os resíduos de prolina ocorrem em trímeros ou em sequências mais longas (MORGAN AND RUBENSTEIN, 2013). Já em bactérias, das aproximadamente 4000 proteínas existentes, cerca de 270 apresentam sequências com três ou mais prolinas sucessivas (DOERFEL et al., 2013). Proteínas ricas em prolinas estão presentes em diversas funções celulares, entretanto, proteínas com sequências consecutivas de seis ou mais prolinas foram associadas com o processamento do DNA/RNA (MORGAN AND RUBENSTEIN, 2013). Recentemente, um trabalho de

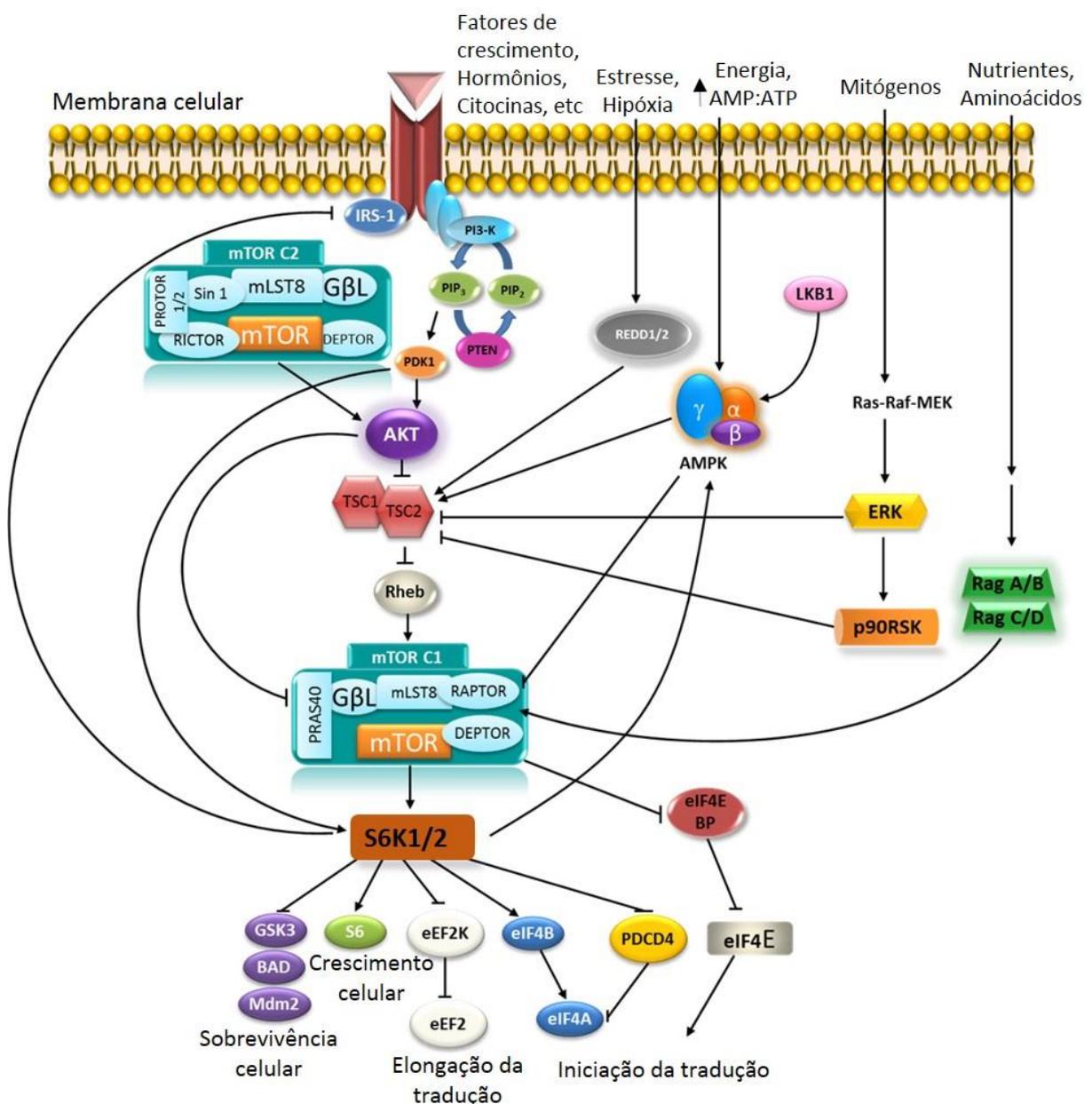
bioinformática relacionou a frequência de motivos PPP e PPG com a complexidade biológica do organismo, mostrando que o alto nível de poli-prolina associa-se a alguns processos biológicos específicos, incluindo funções relacionadas a actina e ao citoesqueleto, *splicing* de RNA, sinalização celular, entre outras. Neste contexto, sugere-se que eIF5A pode ter apresentado um importante papel durante a evolução (MANDAL et al., 2014). Proteínas contendo regiões ricas em prolinas estão também associadas à mecanismos de controle traducional, como por exemplo a proteína Ribossomal S6 kinase 2 (S6K2), que apresenta cinco resíduos de aminoácido prolina em sua porção C-terminal.

1.4 A proteína Ribossomal S6 kinase 2 (S6K2)

A proteína S6K2 pertence as S6Ks, que são da classe de quinases do tipo AGC, juntamente com PKA, PKG e PKC. Existem dois genes codificadores de S6Ks, denominados de *RPS6KB1* e *RPS6KB2*, que produzem proteínas com 83% de identidade chamadas p70-S6K1 (70 kDa) e p54-S6K2 (54 kDa). As maiores divergências entre as sequencias de S6K1 e S6K2 são encontradas nas regiões N-terminal e C-terminal, enquanto S6K1 contém um domínio de ligação PDZ (denominado desta maneira devido as primeiras proteínas descritas contendo este domínio serem PSD95,DlgA e zo-1) em sua região C-terminal, já S6K2 possui um domínio rico em prolina (Pro) e um sítio de localização nuclear (NLS) em seu C-terminal (PARDO AND SECKL, 2013) (Figura 5). As proteínas S6Ks e o fator de início de tradução 4E binding protein (4E-BP) são substratos do Complexo1 mTOR (*mammalian target of rapamycin*), visto que suas ativações dependem da fosforilação por mTOR (PARDO AND SECKL, 2013). A fosforilação dos alvos de mTOR depende de três proteínas associadas: i) Adaptador sensível a rapamicina de mTOR, ii) Proteína G da subunidade-semelhante- β (GBL), iii) proteína rica em prolina kinase B (PKB) (KIM et al., 2002). A proteína mTOR funciona como um sensor da disponibilidade de nutrientes na célula sendo estimulada por quantidades elevadas de aminoácidos, ATP e insulina. Com isso, a via de insulina/IGF consiste no principal ativador das S6Ks, via sinalização por PI3K (phosphoinositide 3-kinase)/Akt para ativar mTORC1. Além disto, mTORC1 também pode ser ativado pela via Ras/MAPK de maneira independente de PI3K (FOSTER AND FINGAR, 2010). Sendo assim, ambas contribuem para a ativação das S6Ks. Quando a

disponibilidade de nutrientes é reduzida, mTOR é inibido e a autofagia passa a ser estimulada, permitindo que ocorra menor competição nas células pelos nutrientes escassos (EISENBERG-LERNER et al., 2009). Além disto, o complexo mTOR é fundamental em vários processos bioquímicos envolvidos com o metabolismo e crescimento celular, tais como, tradução, transcrição, biogênese do ribossomo, transporte de nutrientes e controle espacial da célula através do citoesqueleto (HALL, 2008).

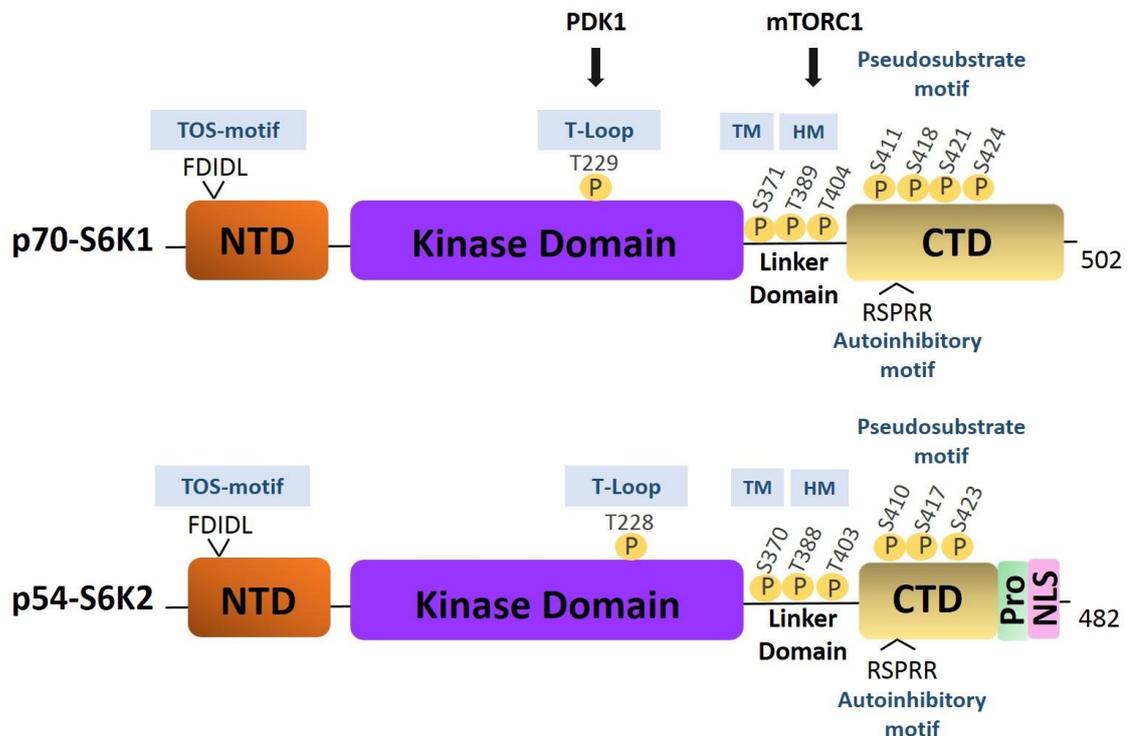
Figura 4 – Proteínas envolvidas na via de mTOR/S6Ks.



Fonte: Retirado de Hurtado et al., (2013), modificado.

Apesar de regiões divergentes nas sequências das S6Ks, vários aminoácidos em regiões regulatórias presentes em S6K1 são conservados em S6K2, como os sítios de fosforilação dirigidos por prolina (*proline-directed*), e os sítios de fosforilação de mTOR e PDK1, o que sugere mecanismos de ativação similares (LEE-FRUMAN et al., 1999). A região C-terminal de S6K1 possui uma função auto-inibitória pela interação com seu próprio N-terminal e desta forma, bloqueia a ativação do domínio de quinase da proteína (PRICE et al., 1991). O mecanismo de ativação de S6K1 inicia com a fosforilação de quatro resíduos de serina (Ser411, Ser418, Ser421 e Ser424) presentes no domínio auto-inibitório, resultando na exposição da região interna da proteína e permitindo a fosforilação do resíduo Thr389 por mTORC1. De maneira similar, a ativação de S6K2 é iniciada com fosforilações nos resíduos Ser410, Ser417 e Ser423, expondo a região interna para que mTORC1 fosforile S6K2 em Thr388 (Figura 5) (MAGNUSON et al., 2012; PHIN et al., 2003). Entretanto, em trabalhos anteriores foi relatado que a ativação de S6K2 pode sofrer influência de mecanismos independentes da fosforilação, como acetilação e ubiquitinação (WANG et al., 2008), destacando um possível mecanismo de regulação por interações proteína-proteína através da sua região rica em prolina na região C-terminal (GOUT et al., 1998). Esta região pode facilitar a interação com moléculas que contém os domínios *Src homology 3* (SH3) (YU et al., 1994), domínios WW (CHEN AND SUDOL, 1995) e outros domínios como EVH1 (BALL et al., 2002), GYF (FREUND et al., 2003) e Profilina (MAHONEY et al., 1997).

Figura 5 – Isoformas e domínios das proteínas S6K1 e S6K2 e os resíduos de ativação das proteínas via fosforilação pelo complexo mTORC1 e PDK1.



NLS: sinal de localização nuclear; NTD: domínio amino-terminal; KD: domínio de quinase; CTD: domínio carboxi-terminal; TOS-motif: região de reconhecimento de mTOR; TM: “turn motif”; HM: motivo hidrofóbico; Pro: domínio rico em prolina, domínio de pseudosubstrato auto-inibitório e motivo RSPRR. Fonte: Adaptado de Magnuson et al., (2012).

As proteínas S6Ks possuem como principal alvo de fosforilação a proteína ribossomal S6 (RPS6), na qual ambas são necessárias para a completa fosforilação da proteína, mas evidências indicam que S6K2 apresenta maior contribuição a esta resposta (PENDE et al., 2004). Historicamente, a fosforilação de RPS6 foi a primeira modificação pós-traducional descrita na literatura (GRESSNER AND WOOL, 1974). Entretanto, apesar da exata função desta fosforilação ainda não estar bem estabelecida, sabe-se que a ativação de RPS6 promove aumento na síntese proteica e progressão do ciclo celular, levantando a hipótese de que as S6Ks regulam o crescimento celular por afetarem positivamente a síntese proteica (CHAUVIN et al., 2014; KOH, 2013). Além de RPS6, fatores controladores do início da tradução (PDCD4 e eIF4B) e da elongação da tradução (eEF2K) também são

alvos de S6K1 e colaboram com o estímulo da síntese proteica mediada pelas S6Ks (MAGNUSON et al., 2012)

Diversas publicações apresentaram evidências de que as proteínas S6Ks desempenham papéis importantes em diferentes patologias, incluindo obesidade, diabetes, envelhecimento e câncer (FENTON AND GOUT, 2011). Além disto, a desregulação da via mTOR/S6K tem sido relatado como um evento que pode predispor a evolução de carcinomas. Porém, entre as S6Ks, a S6K2 possui maior evidência em relação à progressão de tumores, pois foi demonstrado sua importância na proliferação e sobrevivência celular em resposta à ativação de mTORC1, não envolvendo S6K1 (SRIDHARAN AND BASU, 2011). Outro trabalho identificou que a superexpressão de S6K2 em tecidos com câncer é mais frequente que a de S6K1, como nos cânceres de mama e endométrio (PARDO and SECKL, 2013).

A proteína S6K2 possui em sua extremidade C-terminal uma região rica em prolina, que contém cinco resíduos de aminoácidos prolina consecutivos, diferentemente da isoforma S6K1 que apresenta nesta mesma posição a sequência de resíduos de aminoácidos VTMSG (Figura 6). Além disto, observa-se através do alinhamento local da sequência de aminoácidos proteína S6K2 humana com diferentes espécies, que esta região é conservada em outros primatas e mamíferos (Figura 7). Embora S6K2 apresente semelhanças a S6K1 quanto a sua ativação, as possíveis interações proteína-proteína através da sua região rica em prolina na cauda C-terminal já foram citadas como um possível mecanismo de regulação (GOUT et al., 1998). Contudo, ainda não há relatos que descrevam tal mecanismo. Além disto, tendo em vista as evidências apresentadas na literatura de que a tradução de proteínas contendo sequências três ou mais prolinas (PPP ou PPG) dependem de eIF5A, buscou-se avaliar se a tradução da proteína S6K2 também ocorre neste contexto, uma vez que S6K2 contém um motivo contendo cinco resíduos de prolinas consecutivas.

Figura 6 – Alinhamento das sequências de aminoácidos das regiões C-terminal de S6K1 e S6K2 humanas, com destaque para a sequência contendo cinco resíduos de prolinas consecutivas.

S6K1_Hs	RKKTIDKILKCKLNLPPYLTPQEARDLLKLLKRNAASRLGAGPGDAGEVQAHPFFRHINW
S6K2_Hs	RKKTMDKIIRGKLALPPYLTPDARDLVKKFLKRNPSQRIGGGPGDAADVQRHPFFRHMNW ***:***: : ** ***** :***:***:*** :.*.*.***.*** *****:***
S6K1_Hs	EELLARKVEPPFKPLLQSEEDVVSQFDSKFTTRQTPVDSRDDSTLSEANQVFLGFTYVAPS
S6K2_Hs	DDLLAWRVDPFRPCLQSEEDVVSQFDRFTRQTPVDSRDDTALSEANQVFLGFTYVAPS :*** :*:***:* *****:*****:*****.*****
S6K1_Hs	VLESVKEKFSFEPKIRSPRRFIGSPRTPVSPVKFSPGDFWGRGASASTANPQTPEYPMPE
S6K2_Hs	VLDSIKEGFSFQPKLRSPRRLNSSPRAPVSPLKFSPEGFRPSPLPE-----PTLPLP **.*:** ***:***:*****: .***:***:*** : : . * *.* **:
S6K1_Hs	TSGIEQMDVTMSGEASAPLPIRQPNSSGPYKKQAFPMISKRPEHLRMNL 502
S6K2_Hs	P-----LLPPPPPSTTAPLPIRPPSGTKKSKRGRG----RPGR----- 482 : .:***** *.. .*:. ** :

Alinhamento realizado utilizando o programa ClustalW: *Multiple sequence alignment program-version 1.83 European Molecular Biology Laboratory- European Bioinformatics Institute (EMBL-IBI) (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>)*. Sequências S6K1 (NP_001258989.1) e S6K2 (NP_003943.2) obtidas do GeneBank.

Figura 7 – Alinhamento das sequências de aminoácidos das regiões C-terminal da proteína S6K2 de diferentes espécies de mamíferos.

<i>H. sapiens</i>	436	S P S L P E P T E L P L P P --- L L P P P --- P P S T T A P L P I R P P S G T K K S K R G ---	476
<i>P. troglodytes</i>	436	S P S L P E P T E L P L P P --- V L P P P --- P P S T T A P L P I R P P S G T K K S K R G ---	476
<i>M. mulatta</i>	463	S P S L P E P M E P L P P --- L L P P P P L P P S I T A P L P I R P P S G T K K S K R G ---	506
<i>C. lupus</i>	434	S S G P P E P M E P L P P --- L L P P P P P - P P S S T A P L P I R P P S G T K K S K R G ---	476
<i>B. taurus</i>	436	S P G P Q E L V E P L P P --- L L P P P P P P P S S T A P L P I R P P S G T K K S K R G ---	479
<i>M. musculus</i>	436	S P G P P E P M E P S L P P --- L L P S P P S P P P T S T A P L P I R P P S G T K K S K K G ---	479
<i>R. norvegicus</i>	436	S P G P P E P M E P S L P P --- L L P P P S S P P P T S T A P L P I R P P S G T K K S K K G ---	479

Fonte: Alinhamento realizado pelo HomoloGene do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene>). Observa-se a conservação da sequência de poli-prolina de S6K2 entre as espécies.

2 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo geral deste trabalho consiste na avaliação da dependência de eIF5A para tradução da proteína S6K2 e buscar uma caracterização funcional da região de prolina do C-terminal de S6K2.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

i) Produzir a construção pFLAG-S6K2 Δ Pro. Analisar a expressão de S6K1, S6K2 e S6K2 Δ Pro em células HeLa utilizando os plasmídeos pFLAG-S6K1, pFLAG-S6K2 e pFLAG-S6K2 Δ Pro e analisar a funcionalidade da proteína S6K2 Δ Pro.

ii) Avaliar a dependência de eIF5A na tradução de S6K2 por silenciamento gênico de eIF5A por RNA de interferência.

iii) Avaliar a tradução das S6Ks humanas superexpressas em ensaios em modelo de *Saccharomyces cerevisiae* no sistema TET-OFF regulando a expressão gênica de *TIF51A*.

iv) Analisar a importância da sequência de poli-prolina de S6K2 para interações proteína-proteína por meio de ensaios de imunoprecipitação seguido de espectrometria de massas. Em seguida, validar as interações diferenciais entre S6K2 e S6K2 Δ Pro por *western blotting*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Clonagem de DNA utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As construções pFLAG-p70-S6K1 e pFLAG-p54-S6K2 foram obtidas previamente (PAVAN et al., 2016) (Figura 8). Para a clonagem de pFLAG-S6K2 Δ Pro, utilizou-se como *template* a construção pFLAG-p54-S6K2. A mutação na região poli-prolina da porção C-terminal foi realizado através da amplificação do gene da S6K2 com oligonucleotídeos contendo as bases correspondentes aos aminoácidos da mesma região de S6K1. Para preparar as construções no plasmídeo pYES2 (Figura 10) foi realizada subclonagem das construções pFLAG-p70-S6K1, pFLAG-p54-S6K2, pFLAG-S6K2 Δ Pro. O plasmídeo pBG1805-LDB17, contendo a proteína de poli-prolina de levedura LDB17 utilizado no trabalho foi gentilmente cedido pelos autores de Gutierrez et al., (2013). Após o preparo das construções, as mesmas foram sequenciadas para confirmação da sequência.

3.1.1 Preparação dos insertos

Produtos da PCR purificados que se destinam a clonagem foram submetidos à digestão com as enzimas de restrição *Bam* HI, *Xho* I e *Eco* RI (Thermo Scientific, MA, EUA) seguindo as condições recomendadas pelo fabricante (GE Healthcare, Inc., Nova Jersey, EUA). Os sítios de restrição estão presentes nas extremidades do produto amplificado, decorrente da presença destes sítios nos oligonucleotídeos utilizados (Quadro 1). Os oligonucleotídeos utilizados nas clonagens foram obtidos da empresa Exxtend-Paulínia, SP, Brasil. Os produtos de digestão foram purificados após eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando o Kit GFX PCR DNA and gel band purification (GE Healthcare, Inc., Nova Jersey, EUA).

3.1.2 Desfosforilação do vetor plasmidial

Após digestão plasmidial, os vetores de interesse foram desfosforilados seguindo as condições recomendadas pelo fabricante da enzima FASTAP (GE Healthcare, Inc., Nova Jersey, EUA) e purificados após eletroforese em gel de

agarose 1%, utilizando o Kit GFX PCR DNA and gel band purification (GE Healthcare, Inc., Nova Jersey, EUA).

3.1.3 Reação de ligação

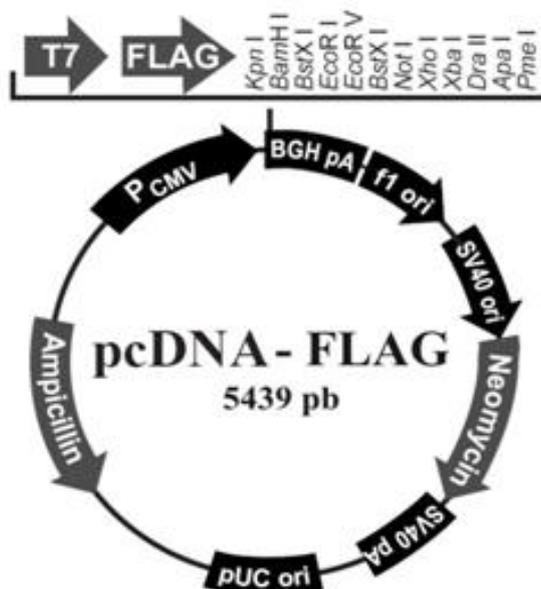
As concentrações do inserto e do vetor foram estimadas por eletroforese em gel de agarose 1%. A reação de ligação foi realizada utilizando um volume final de 20 µL, com um excesso de inserto em relação ao vetor numa proporção de 5:1 e 400 U da enzima T4 DNA ligase (Life Technologies, Inc., Nova York, EUA). A reação foi incubada durante uma noite a 4°C. Os produtos da ligação foram introduzidos em bactérias *E. coli* utilizando o protocolo de transformação bacteriana.

Quadro 1 – Oligonucleotídeos utilizados nas ampliações por PCR

Oligonucleotídeos	Alvo	Sequência
S6K1 F	S6K1	5' <u>AGGATCC</u> ATGGCAGGAGTGTGGACATAGAC 3'
S6K1 R	S6K1	5' <u>ACTCGAG</u> TCATAGATTCATACGCAGGTGCTCTG 3'
S6K2 F	S6K2/ S6K2Δ	5' <u>AGGATCC</u> ATGGCGGCCGTGTTTGATTTGG 3'
S6K2 R	S6K2	5' <u>ACTCGAG</u> TTCTAGCGCCCTGGACGCC 3'
S6K2 mutada – R	S6K2Δ	5'AA <u>ACTCGAG</u> CTAGCGCCCTGGACGCCACGGCCCCTCTT GGACTTCTTGGTCCCTGAGGGGGGACGGTGGGGAGAGGG GCGGTGGTTCGACCCACTCATTGTCACCAGGAGTGGAGGTA G 3'

A sequência 5' CTCGAG 3' representa o sítio de restrição da enzima *Xho* I e a sequência 5' GGATCC 3' representa o sítio de restrição da enzima *Bam* HI.

Figura 8 – Mapa do vetor plasmidial pcDNA-FLAG utilizado na realização das construções pFLAG-S6K1, pFLAG-S6K2 e pFLAG-S6K2ΔPro.



Plasmídeo pcDNA3. Fonte: Addgene #20011. Disponível online em <https://www.addgene.org/20011/>.

3.1.4 Preparo de *E. coli* competente

Uma colônia de *E. coli* foi inoculada em 5 mL de meio LB líquido (10 g/L triptona; 5 g/L extrato de levedura e 10 g/L NaCl) e incubada a 37°C durante uma noite sob agitação de 220 rpm. O pré-inóculo produzido foi diluído 1/100 em 100 mL de meio LB líquido e incubado a 37°C sob agitação de 220 rpm até atingir DO 600 nm entre 0,3 e 0,5. A cultura bacteriana foi resfriada em gelo e centrifugada a 3200 xg por 15 minutos a 4°C. Posteriormente, o sobrenadante foi desprezado e as células suspensas em 20 mL de uma solução de CaCl₂ 0,1 M gelada. As células foram mantidas em banho de gelo por 20 minutos e centrifugadas a 3200 xg por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e as células foram suspensas em 8 mL de 0,1 M CaCl₂ gelado. A suspensão foi mantida por duas horas em gelo e foram adicionados 2 mL de glicerol 50% gelado. A suspensão bacteriana foi fracionada em tubos de microcentrífuga estéreis e armazenados a -80°C.

3.1.5 Transformação de *E. coli* competente

Células de *E. coli* competentes estocadas a -80°C foram descongeladas em gelo. Em um tubo de microcentrífuga contendo 100 μL das células competentes foram adicionados 50–250 ng de DNA plasmidial. Os tubos foram mantidos em gelo por 30 minutos seguido de banho-maria a 42°C por 2 minutos. A seguir, 1 mL de meio LB-broth high salt (LB) líquido foi adicionado ao tubo, o qual foi incubado a 37°C por 1 hora a 220 rpm. Decorrido o período de incubação, 100 μL da cultura foram plaqueados em placa de Petri contendo meio LB sólido acrescido de ampicilina (100 mg/mL). Como controle negativo foram utilizadas células competentes não transformadas com DNA plasmidial ou transformadas com vetor vazio (sem inserto). As placas foram incubadas a 37°C durante uma noite.

3.1.6 Preparação de DNA plasmidial de *E. coli* em pequena escala (Miniprep) pelo método de lise alcalina

Células da linhagem de *E. coli* contendo os plasmídeos de interesse foram inoculadas em 2 mL de meio LB acrescido de ampicilina (100 mg/mL) e incubadas a 37°C por aproximadamente 12 horas. A cultura foi centrifugada a 12000 $\times g$ por 5 minutos a temperatura ambiente. As células foram suspensas em 100 μL de solução GTE (glicose 50 mM; Tris HCl 25 mM, pH 7,4; EDTA 10 mM, pH 8,0). Foram adicionados 200 μL de solução NaOH/SDS (0,2 M NaOH e 1% SDS), e em seguida foram adicionados 150 μL de 3M acetato de sódio pH 4,8 e o tubo foi invertido várias vezes, incubando-se em gelo por 10 minutos. Após o período, os tubos foram centrifugados a 12000 $\times g$ por 5 minutos a 4°C , e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. A seguir, foi adicionado isopropanol gelado (2 vezes o volume da amostra) e o tubo foi invertido várias vezes. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 70%. Depois de seco, o DNA foi suspenso em 30-50 μL de tampão Tris/EDTA 1X com RNase (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e foi incubado a 37°C por 15 minutos.

3.1.7 Preparação de DNA plasmidial de *E. coli* em média escala (Midiprep)

Uma colônia isolada de *E. coli* contendo o plasmídeo de interesse foi inoculada em 100 mL de LB contendo ampicilina (100 mg/mL) e crescida a 37°C por 18 horas sob agitação de 200 rpm. As células foram coletadas por centrifugação a 6000 xg por 10 minutos a 4°C. Os plasmídeos foram purificados utilizando o kit PlasmidPrep Midi Flow (GE Healthcare, Inc., Nova Jersey, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante.

3.2 Análise do conteúdo de proteínas específicas em células HeLa por SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) seguido de *western blotting*

3.2.1 Cultivo de células HeLa

Células HeLa, gentilmente cedidas pela pesquisadora Wirla Tamashiro (UNICAMP) armazenadas em nitrogênio líquido foram submetidas a um rápido descongelamento em banho-maria a 37°C e transferidas para um tubo cônico contendo 10 mL de DMEM suplementado com 10% SFB, 2 mM L-glutamina, 10 U/mL penicilina e 10 µg/mL estreptomicina (DMEM completo). A suspensão celular foi centrifugada a 150 xg por 10 minutos a temperatura ambiente e o sobrenadante descartado. As células foram suspensas em 10 mL de DMEM completo. A suspensão celular foi transferida para uma ou duas placas de 85 mm (diâmetro) em um volume total de 10 mL de DMEM completo por placa. As células foram mantidas em estufa umidificada a 37°C contendo 5% CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada dois dias até a cultura atingir confluência em torno de 80%. O subcultivo foi realizado após remoção do meio, lavagem com 3 mL de PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄·7H₂O; 1,8 mM KH₂PO₄), tratamento com 1 mL de 0,25% Tripsina/EDTA, incubação por 1 minuto a 37°C, agitação para suspensão das células e neutralização da tripsina após adição de 1 mL de DMEM completo. Para o congelamento, 1-2x10⁶ células foram coletadas e centrifugadas a 150 xg por 10 minutos a temperatura ambiente, a seguir foram suspensas em 1 mL de meio completo contendo 5% de DMSO. Em sequência, a suspensão foi transferida para criotubos e mantidas por 1 hora em gelo, a -20°C por 2 horas e -80°C por 2-16 horas. A seguir, as células foram armazenadas em nitrogênio líquido.

3.2.2 Transfecção celular

Primeiramente, foram plaqueadas 3×10^5 células HeLa em placas contendo 6 poços. Para a realização da transfecção foram preparadas duas soluções contendo 500 μ L de meio de cultura na ausência de soro fetal bovino, sendo que na primeira foi adicionado 2,5 μ g de DNA (pFLAG, pFLAG-S6K1, pFLAG-S6K2, pFLAG-S6K2 Δ Pro) e na segunda 5 μ L de Lipofectamine™ 2000 (Life Technologies, Inc., Nova York, EUA). Estas duas soluções foram misturadas e mantidas a temperatura ambiente por 5 minutos para a formação dos complexos DNA-lipossomos antes do tratamento das células de interesse. Após 6 horas de transfecção o meio foi trocado por meio completo e as células foram coletadas após 24 horas.

3.2.3 Silenciamento gênico por RNA de interferência (*small interference RNA*-siRNA)

Um conjunto de siRNAs direcionados ao mRNA de eIF5A (#10797) e um siRNA como controle negativo (non-targeting negative control siRNA, #4390843) foram obtidos da empresa Life Technologies. As células foram transfectadas utilizando-se o reagente Lipofectamina RNAiMAX (Life Technologies, Inc., Nova York, EUA) de acordo com instruções do fabricante e 30 pmol de siRNA. Após 24 horas de tratamento, as células foram re-submetidas a transfecção com as mesmas quantidades de siRNAs (30 pmol) visando aumento na eficiência de silenciamento. A efetividade da depleção do transcrito codificador de eIF5A foi avaliada por transcrição reversa seguido de PCR em tempo real (RT-qPCR) e da proteína eIF5A por meio de ensaios de *western blotting* em diferentes tempos de silenciamento (48, 72 e 96 horas).

3.2.4 Preparação de extratos proteicos e quantificação de proteína total

Células foram removidas em tampão de extração (0,1M Tris-HCl, pH 7,4; 10 mM EDTA, pH 8,0; 1mM DTT; 1% Triton-X100, 1x coquetel de inibidores de protease – Complete e 1x coquetel inibidor de fosfatases - Phosstop). A seguir, os extratos foram mantidos em gelo por 25 minutos com agitação ocasional utilizando *vortex*. As amostras foram centrifugadas a 12000 xg por 10 minutos a 4°C e os sobrenadantes

foram submetidos à quantificação proteica em espectrofotômetro (absorção em 595 nm) utilizando o método de Bradford (NOBLE AND BAILEY, 2009).

3.2.5 SDS-PAGE seguido de *western blotting*

As amostras proteicas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) contendo SDS (SDS-PAGE), utilizando tampão de corrida (50 mM Tris; 0,38 M Glicina; 1,8 mM EDTA; 0,1% SDS) a 100 V. Em seguida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose utilizando um sistema de transferência úmido sob diferença de potencial de 100 V por 1 hora, utilizando tampão de transferência (24,8 mM Tris; 192 mM Glicina; 10% Metanol). A membrana foi bloqueada a temperatura ambiente por 40 minutos em tampão TBS-T (10 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl e 0,02% Tween-20) contendo 5% leite desnatado. Em seguida, a membrana foi incubada *overnight* com diluições adequadas de anticorpos primários diluídos em TBS-T contendo 5% leite desnatado. Anticorpos primários utilizados: Rabbit anti-FLAG (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) 1:10000, Mouse anti-GAPDH (Life Technologies, Inc., Nova York, EUA) 1:2000, Rabbit anti-eIF5A total 1:2000 (Abcam), Rabbit anti-S6 fosforilada em Ser 240/244 1:2000 (Cell Signaling Technology, MA, EUA), Mouse anti-S6 total a 1:2000 (Cell Signaling Technology, MA, EUA), Rabbit anti-S6K2 (Thermo Scientific, MA, EUA) 1:2000, Rabbit anti-S6K1 (Cell Signaling Technology, MA, EUA) 1:5000, Mouse-anti- α -tubulina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) 1:5000, Rabbit anti-eEF2 1:10000. Rabbit anti-RPL5 a 1:15000 e Rabbit anti-yelF5A (anti-eEF2, RPL5 e yelF5A foram fornecidos por Sandro R. Valentini). A proteína LDB foi detectada utilizando o anticorpo anti-L5, pois a mesma é produzida fusionada com proteína A (domínio ZZ). Após esse período, a membrana foi lavada quatro vezes por 5 minutos com TBS-T e incubada a temperatura ambiente por 1 hora com anticorpos policlonais anti-IgG conjugados à peroxidase diluídos em TBS-T contendo 5% leite desnatado. Após quatro novas lavagens de 5 minutos com TBS-T, a membrana foi tratada com reagentes quimioluminescentes e revelada em equipamento fotodocumentador G:BOX Chemi XRQ que utiliza como *software* o GeneSys, ou foi exposta a filme autorradiográfico utilizando as soluções reveladora e fixadora (Kodak).

3.3 Preparação de RNA total, síntese do cDNA e reação em cadeia pela polimerase (PCR) em Tempo Real

3.3.1 Preparação de RNA total

Culturas celulares das linhagens HeLa foram homogeneizadas em 1 mL do reagente TRIzol®. Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente foram acrescentados 200 µL de clorofórmio. Após homogeneização a mistura foi submetida a centrifugação de 12000 xg por 15 minutos a 4°C e a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo. A seguir, foram adicionados 500 µL de isopropanol gelado, incubado por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugado a 12000 xg por 10 minutos a 4°C. O precipitado de RNA formado foi lavado com 1 mL de 75% etanol e centrifugado a 12000 xg por 5 minutos a 4°C. A seguir, os precipitados foram mantidos à temperatura ambiente para secagem por 5 minutos e em seguida suspensos em 30 µL de água ultrapura tratada com DEPC. As amostras foram mantidas a 55-60°C por 10 minutos e armazenadas a -80°C. Uma alíquota foi quantificada por leitura em espectrofotômetro a 260 nm ($A_{260nm} = 1$ corresponde a 40 µg/mL) e o grau de pureza determinado pela razão 260/280 nm (razão entre 1,8 e 2 indica o grau aceitável de pureza).

3.3.2 Transcrição reversa (RT): Síntese de cDNA

Inicialmente, 2 µg de RNA total foi tratado com DNase I, em seguida adicionou-se 1 µL de tampão de DNase I 10X (Tris-HCl 100 mM pH 7,5, MgCl₂ 25 mM e CaCl₂ 1 mM), 1 µL da enzima DNase I e o volume foi completado com água ultrapura-DEPC para 10 µL. A seguir, as amostras foram mantidas no termociclador por 30 minutos a 37°C. A inibição da DNase I foi realizada pela adição de 1 µL de EDTA (25 mM) e incubada por 10 minutos a 65°C. Posteriormente, foram adicionados 1 µL de 100 µM *randomhexamerprimers*, 1 µL de 10 mM dNTPmix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) e 2 µL de água ultrapura-DEPC. As amostras foram incubadas por 5 minutos a 65°C e resfriadas rapidamente em gelo. A seguir, foi acrescentado 1 µL da enzima *RevertAid Premium Reverse Transcriptase* (RT) e 4 µL de Tampão da RT (concentrada 5X). As amostras foram incubadas por 10 minutos a 25°C, 30 minutos a 50°C e 5 minutos a 85°C. O cDNA obtido foi armazenado a -80°C.

3.3.3 Reação em cadeia pela polimerase quantitativa (qPCR)

O conteúdo dos transcritos de interesse foram avaliados por PCR em tempo real utilizando o reagente *SYBR Green* como marcador fluorescente. As reações foram realizadas em 25 μ L de água ultrapura contendo 200 ng de cDNA, 0,3 μ M oligonucleotídeos (sense e antisense) descritos no quadro 2, testados previamente (PEREIRA et al., 2016) e 12,5 μ L do reagente *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x)*. Em seguida, a reação foi realizada utilizando as seguintes condições: 95°C por 5 minutos seguida de 40 ciclos de 95°C por 1 minuto e 60°C por 1 minuto. Ao término da reação foi avaliada a temperatura de *melting* do *amplicon*.

3.3.4 Análise de expressão gênica

Os dados da qPCR foram normalizados por meio da avaliação da razão do Ciclo Threshold (Ct) entre o alvo de interesse *EIF5A* e o alvo constitutivo tubulina, que foram amplificados em conjunto. A expressão basal dos alvos foram calculados por meio da fórmula $2^{-(\Delta Ct)}$ e usou-se a fórmula $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ (PFAFFL et al., 2002), para o cálculo da expressão relativa do alvo de interesse em função do alvo constitutivo, onde o $\Delta\Delta Ct$ é o ΔCt (siRNA-EIF5A) - ΔCt (siRNA-controle), sendo que o ΔCt é o Ct (EIF5A) - Ct (Tubulina). A razão da expressão relativa (fold change) foi feita dividindo-se o $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ do siRNA-EIF5A pelo $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ do grupo siRNA-controle, para cada tempo. Para análise de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, os resultados do *fold change* foram transformados em $\log(2)$ e, posteriormente, analisados por meio do teste t de Student ou OneWay com pós teste de Tukey para todos os tempos estudados.

Quadro 2 – Oligonucleotídeos utilizados nas ampliações de qPCR

Oligonucleotídeos	Alvo	Sequências
eIF5A F	EIF5A	5' GCTTGCGCGGCTGTCATAG 3'
eIF5A R	EIF5A	5' CACGGGTCTTAGTACGCAGG 3'
TUBULINA F	Tubulina	5' GCAACAACCTCTCCTCTTCG 3'
TUBULINA R	Tubulina	5' GAATCATCTCCTCCCCCAAT 3'

3.4 Imunoprecipitação seguida de análise por LC-MS

Foram plaqueadas 4×10^6 células HeLa em placas de 150 cm². No dia seguinte, as células foram transfectadas com os plasmídeos pFLAG-GFP, pFLAG-S6K2 e pFLAG-S6K2 Δ Pro utilizando Lipofectamina 2000 (Life Technologies), seguindo as recomendações do fabricante. Foram utilizadas duas placas para cada transfecção. Após 24 horas de transfecção, as células foram lavadas várias vezes com PBS 1X e coletadas com raspagem cuidadosa em PBS 1X. Em seguida, as células foram centrifugadas a 150 xg 4°C por 10 minutos. O PBS foi removido, foi adicionado 400 μ L de Tampão de Lise (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA pH 8.0, Complete EDTA-free Inibitor protease cocktail) às células precipitadas. O tampão de lise ficou em contato com as células por 15 minutos a 4°C sob leve agitação, seguido de centrifugação a 12000 xg, por 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram transferidos para um novo tubo e o conteúdo proteico foi quantificado pelo método de Bradford. Para remoção do glicerol, 20 μ L de resinas ANTI-FLAG M2 Affinity Gel (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foram lavadas com 1 mL de TBS 1X gelado, centrifugando a 3000 xg, 4°C por 3 minutos, repetindo-se por três vezes. Foram adicionadas às resinas 2000 ng de proteína total. Os extratos proteicos com as resinas foram incubados durante uma noite a 4°C sob leve agitação. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 8200 xg

por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado e armazenado, e as resinas foram lavadas 5 vezes com 1 mL de TBS, centrifugando-se a 8200 xg por 3 minutos. Após as lavagens, para a eluição foi adicionado o peptídeo 3XFLAG (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) a uma concentração final de 300 ng/ μ L em um volume final de 100 μ L.

3.4.1 Coloração de gel SDS-PAGE com nitrato de prata

Após realização do SDS-PAGE, o gel foi incubado sob leve agitação por 30 minutos em Solução I (50% metanol, 3% ácido acético, 25 μ L formaldeído 37%). Após incubação, a solução foi retirada e reservada e foi adicionado a Solução II (35% etanol) ficando sobre agitação leve por 5 minutos. Retirada a solução anterior e adicionada a Solução III (10 mg de tiosulfato de sódio) incubou-se por 2 minutos. Após, remoção da Solução III, adicionou-se a Solução IV (100mg de nitrato de prata, 36 μ L de formaldeído 37%), e incubou-se por 10 minutos. Em seguida, foi adicionado a Solução V (3 g de carbonato de sódio, 25 μ L de formaldeído e 1 mL da solução III), foi agitado levemente e acompanhado o aparecimento das bandas. Para pausar a reação foi retirado a Solução V e colocado a Solução I. Após cada incubação com as soluções, foram realizados três lavagens com água destilada. Foi utilizado 50 mL de cada solução e as incubações foram realizadas a temperatura ambiente.

3.4.2 Digestão Tripsínica em solução

As amostras dos eluidos da imunoprecipitação foram lisadas com uréia 8M, adicionadas 5 μ L de ditioneitol 1M (DTT) para redução das pontes dissulfeto e incubados por 1,5 horas em temperatura ambiente. Após a incubação com DTT, foi adicionado 20 μ L de iodoacetamida para a alquilação das cisteínas por 1 hora no escuro em temperatura ambiente. Para consumir a iodoacetamida que não reagiu, foram adicionados 20 μ L de DTT e incubado por mais 1h. Após a incubação, foram adicionados 775 μ L de água Milli-Q e 2 μ L de tripsina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) quantidade suficiente para se obter uma razão proteica de 1:50 e então incubado a 37°C durante uma noite. No dia seguinte, a reação foi interrompida adicionando-se 2 μ L de ácido acético 100%.

3.4.3 Dessalinização com cartuchos Sep-Pak Light tC18

As amostras foram dessalinizadas utilizando colunas de extração em fase sólida *Sep-Pak Light tC18* (Waters Corporation, Estados Unidos). Inicialmente, as colunas foram condicionadas com 2 mL de metanol, seguido de 2 mL de ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% e acetonitrila (ACN) 50% e 1 mL de TFA 0,1%, após o condicionamento, a amostra foi carregada com 1 mL de TFA 0,1% duas vezes, lavada com TFA 0,1%, e eluída da coluna com 2 mL de TFA 0,1% e ACN 50% transferindo lentamente para um tubo novo de 2 mL, em seguida o *Sep-Pak* foi lavado com 2 mL de ACN 100%. As amostras foram secadas e concentradas em *Speed-Vac* (RVC 2-18, CHRIST, Analítica). Após a secagem completa, as amostras foram ressuspendidas em 20 µL de ácido fórmico 0,1% e centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos para análise no espectrômetro de massas.

3.4.4 Análise no Espectrômetro de Massas

Cinco microgramas de cada amostra foram analisadas no espectrômetro de massas LTQ Orbitrap Velos (Thermo Scientific, Estados Unidos) acoplado ao cromatógrafo líquido de nano-fluxo EASY-nLC (Thermo Scientific, Estados Unidos). Os peptídeos foram separados por um programa de gradiente de 120 minutos, da seguinte forma: 5-40% do solvente B (90% acetonitrila em 0,1% de ácido fórmico) por 90 minutos, seguido por 40-90% do solvente B por 20 minutos no fluxo de 200 nL/min usando uma pré coluna empacotada com 5 cm de *beads* de C18 de 10 µm (Jupiter, Phenomenex) em um capilar de dimensões ID 100 µm x OD 360 µm e uma coluna analítica de ponta com *frit* empacotada com 15 cm de *beads* C18 de 5 µm (Aqua, Phenomenex) em um capilar de dimensões ID 75 µm x OD 360 µm.

O espectrômetro de massas foi operado em modo de aquisição dependente de dados (DDA, do inglês Data Dependent Acquisition), onde os 10 íons mais intensos de cada amostra foram selecionados para a fragmentação no íon trap linear utilizando a dissociação por fragmentação por colisão induzida por dissociação (CID) em MS/MS. A aquisição dos dados foi controlada pelo programa de computador Xcalibur 1.4 (Thermo Scientific). De modo geral, as condições de análise foram: voltagem no capilar do nano-electrospray de 2,3 kV, temperatura da fonte a 250°C, tempo de injeção no ion-trap ajustado a 100 ms e no FT-MS em 1000 ms com uma resolução de 60.000 em m/z 300-1800. O tempo de exclusão dinâmica foi ajustada

para 70 segundos. Os arquivos de dados do massa (.raw) foram convertidos para .mgf usando o software MS Convert (v.3.0.4445, ProteoWizard, SourceForge) e analisados no Mascot (v.2.4, Matrix Science Ltd, Boston, MA, USA). As proteínas foram identificadas através da pesquisa de dados MS e MS/MS em banco de dados *Homo sapiens* baixados do NCBI. A tripsina foi definida para a especificidade das enzimas com no máximo duas *miss cleavages*, foram selecionados as massa monoisotópicas, a tolerância da massa dos peptídeos 10 ppm, tolerância dos íons precursores foi ajustado para 0,17. Na busca dos espectros MS/MS foram determinadas como modificação fixa a carbamidometilação de resíduos de cisteína, enquanto que a oxidação de metionina, fosforilação S/T e fosforilação Tyr, foram definidas como modificações variáveis.

Obs: A digestão tríptica, dessanilização e a análise por LC-MS foram realizadas no laboratório do pesquisador colaborador Dr. Leo Key Iwai do Instituto Butantã-SP.

3.4.5 Análises proteômicas

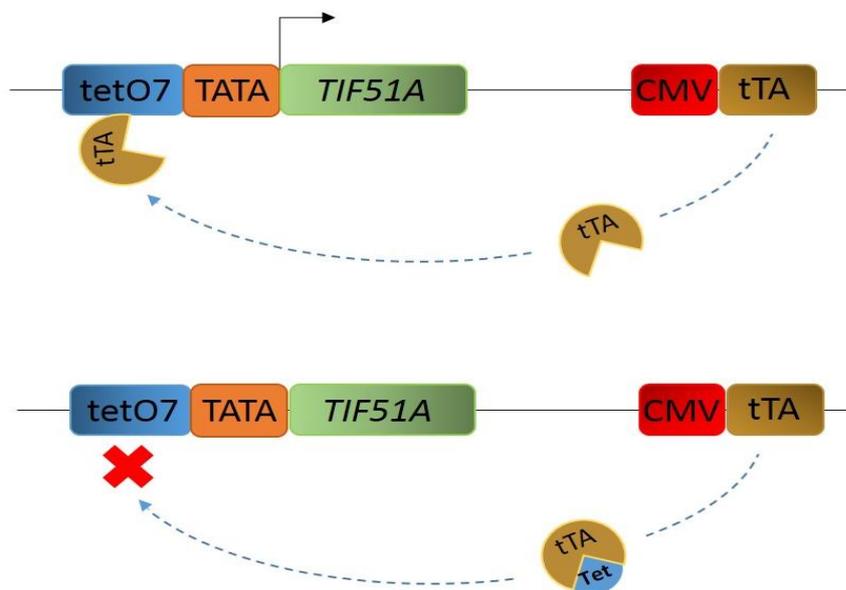
Para caracterizar as proteínas identificadas pelo espectrômetro de massas, utilizou-se o sistema de classificação PANTHER (*Protein Annotation Through Evolutionary Relationship*) disponível online (www.pantherdb.org/) para realizar as classificações segundo os termos de Gene Ontology (GO) e classes de proteína PANTHER (MI et al., 2013). No site, os dados foram submetidos através dos Genes IDs, foi selecionado o organismo *Homo sapiens* e em seguida gerou-se a lista dos genes das proteínas estudadas com suas respectivas informações. Foram gerados os gráfico de setores para as classificações Função Molecular e Função Biológica. Em função dos dados obtidos no programa, os gráficos apresentados foram gerados no Excel 2013. As análises de *network* de associação de proteínas foi realizado utilizando STRING (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*) versão 10 disponível online (<http://string-db.org/>) (SZKLARCZYK et al., 2015). Foi fornecido como entrada a lista dos genes das proteínas em análise de múltiplas proteínas e em seguida selecionando o organismo *H. sapiens*. Foi selecionado na busca as interações descritas: experimentalmente, por banco de dados e em co-expressão com alta estringência (confidência $\geq 0,7$) e os resultados estão apresentados de acordo com a ação molecular. Linhas azuis significam ligação,

linhas pretas significam reação, rosa significa modificação pós-traducional e linhas roxas representam catálise.

3.5 Ensaios em modelo de *Saccharomyces cerevisiae* no sistema TET-OFF regulando a expressão gênica de *TIF51A*

A linhagem utilizada neste trabalho possui o sistema tTA-tetO (*tetracycline transactivator-tetracycline operator*), que primeiramente foi desenvolvida para célula de mamíferos e posteriormente adaptada para condicionar a expressão de genes em *S. cerevisiae* (GOSSEN AND BUJARD, 1992; GOSSEN et al., 1993; GARÍ et al., 1997). Neste sistema TET-OFF, a expressão de *TIF51A* que codifica para a proteína eIF5A é controlada por tetO7. Isto é, a adição de tetraciclina ou seus derivados interrompe a expressão do gene *downstream* ao promotor tetO. Na ausência de tetraciclina, o transativador tTA se liga ao promotor tetO, ativando a expressão do gene alvo, quando a tetraciclina é adicionada ao meio de cultura ela se liga ao transativador tTA impedindo que este se ligue ao promotor tetO. Ou seja, na presença de tetraciclina ou seus derivados, como doxiciclina, não haverá produção de eIF5A endógena (Figura 9).

Figura 9 – Sistema TET-OFF regulando a expressão gênica de *TIF51A*.



tetO7 é o promotor de tetraciclina construído a partir de sete repetições da sequência tetO; TATA: sequência de DNA TATA-box responsável pela interação dos fatores de início de transcrição; CMV: promotor citomegalovírus; tTA: transativador controlado por tetraciclina. A) Na ausência de tetraciclina, a proteína tTA se liga ao tetO7 (promotor de tetraciclina), ativando a expressão do gene *TIF51A*. B) Na

presença de tetraciclina, a proteína tTA se liga a tetraciclina e não pode se ligar ao tetO7, impedindo a expressão do gene *TIF51A*. Fonte: Baseado em <https://www.addgene.org/tetracycline/>.

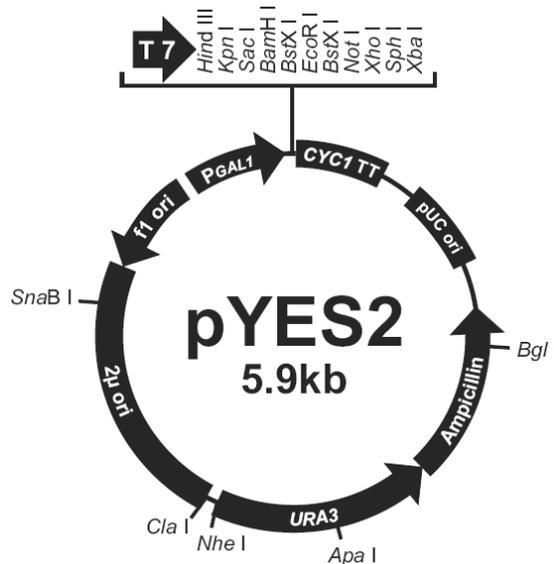
A linhagem de leveduras VZL1074 e o vetor plasmidial pYES2 (Figura 10) foram fornecidos pelo pesquisador colaborador Prof. Dr. Sandro R. Valentini (FCF-UNESP). O genótipo da levedura utilizada está descrito no quadro 3.

Quadro 3 – Genótipo da levedura utilizada nos ensaios

Linhagem	Genótipo	Origem
VZL1074	MAT α <i>his3 leu2 ura3::CMV-tTA</i> (TH2639 modificada) <i>kanR-tetO7-TATA-TIF51A*</i>	Open Biosystem

Legenda: **kanR-tetO7-TATA* corresponde ao cassete contendo o promotor Tet (reprimível por tetraciclina) e a marca de resistência a geneticina (G418), *kanR*.

Figura 10 – Plasmídeo utilizado nas construções pYES2-S6K1, pYES2-S6K2 e pYES2-S6K2 Δ Pro.



Vetor de expressão em leveduras pYES2. Fonte: Invitrogen, USA. Disponível online em: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/V82520>.

3.5.1 Transformação de leveduras

A linhagem de *S. cerevisiae* de interesse foi inoculada e incubada em 5 mL de meio YPD (meio rico para levedura contendo extrato de levedura, peptona e glicose) por 12-16 horas a 30°C, sob agitação. Foi centrifugado 1 mL de cultura por 1 minuto a 5000 xg e o sobrenadante foi descartado. As células foram suspensas em 1 mL de acetato de lítio 100 mM e incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente. Simultaneamente, uma alíquota de ssDNA (DNA de esperma de salmão; DNA carregador) foi fervido por 5 minutos a 96°C e mantido em gelo. Após a incubação, as células foram centrifugadas por 5 segundos a 5000 xg e o sobrenadante foi removido. A seguir, foram adicionados os seguintes reagentes ao *pellet* de células, seguindo a ordem dos reagentes da tabela 1.

Tabela 1 – Reagentes para transformação de leveduras.

Reagentes	Volume
PEG (50% w/v)	240 µL
Acetato de Lítio 1 M	36 µL
ssDNA (2,0 mg/mL)	50 µL
DNA plasmidial (100 ng a 5 µg)	5 µL
H ₂ O Milli-Q	45 µL

Após adicionar os reagentes, as células foram suspensas e incubadas por 20 minutos a 42°C. Posteriormente, as células foram centrifugadas por 10 segundos a 5000 xg e o sobrenadante foi removido. O *pellet* foi suspenso em 200 µL de água milli-Q e, por fim, as células foram plaqueadas em meio seletivo apropriado, neste caso, em meio sintético completo para levedura sem uracila (SC-ura) adicionado de glicose e incubadas por 2-4 dias a 30°C.

3.5.2 Avaliação da dependência do homólogo de eIF5A em *S. cerevisiae* na produção das proteínas S6K1, S6K2 e S6K2ΔPro na linhagem TET-OFF

Os genes das proteínas humanas S6K1, S6K2, S6K2ΔPro clonados em plasmídeo pYES2 e a construção pBG1805-LDB17 foram transformados nas leveduras VZL1074, cuja expressão do gene *TIF51A* é controlada por promotor reprimível por tetraciclina. Inicialmente, para confirmação dos clones, foi realizado um teste de expressão inoculando 3 clones de cada transformante durante uma noite na presença de meio SC-ura acrescido de galactose para indução da expressão das proteínas. Neste ensaio piloto, foi verificada a expressão das proteínas heterólogas e selecionado 1 clone de cada levedura transformante positivas para a expressão das proteínas para a realização dos ensaios. Para realização dos ensaios, as linhagens foram inoculadas no dia anterior em meio SC-ura adicionado de rafinose. Os inóculos foram diluídos ($D.O._{600nm} = 0,3 - 0,6$) em 50 mL de meio SC-ura adicionado de rafinose com 4 µg/mL de doxiciclina (Sigma Aldrich), como controle as células também foram inoculadas em meio sem doxiciclina. Os frascos foram incubados em *shaker* a 30°C a 200 rpm. Após 7 horas de ensaio, o conteúdo dos frascos foram centrifugados, o meio foi trocado por 40 mL de meio SC-ura com galactose para induzir a expressão dos plasmídeos com 4 µg/mL de doxiciclina. Em diferentes períodos do ensaio foram coletadas amostras para realização de extrato proteico e posterior análise por *western blotting*.

3.5.3 Extrato proteico de células de leveduras

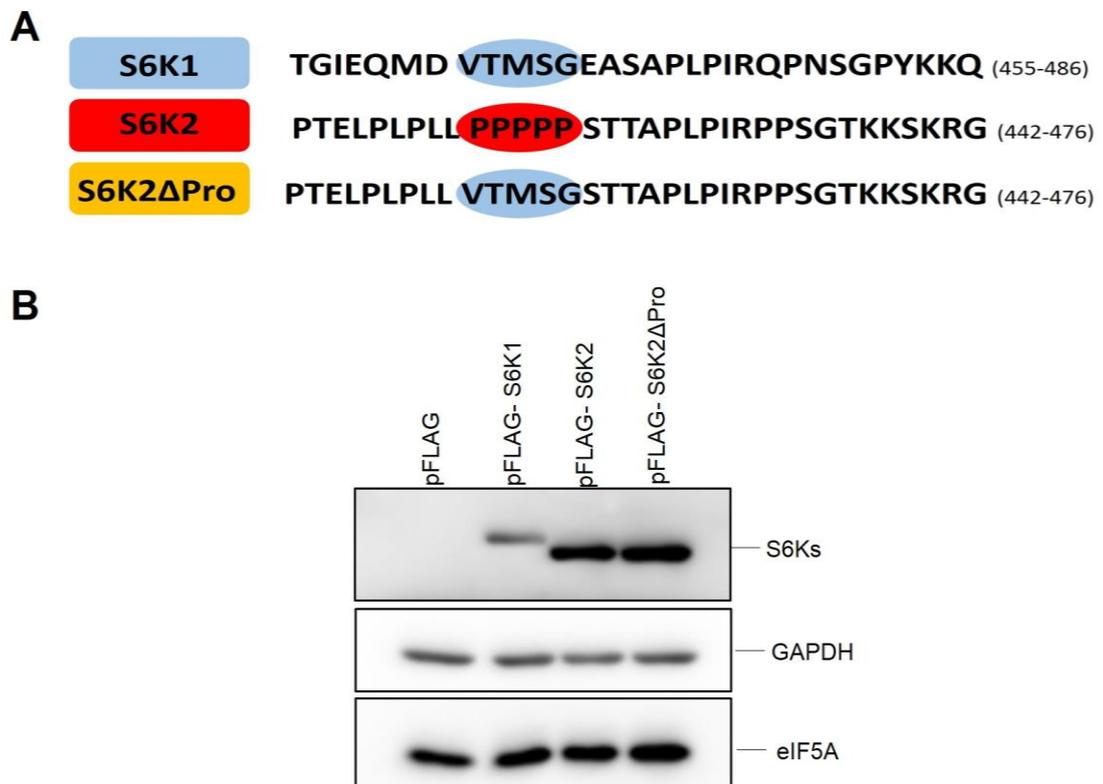
As células foram coletadas e suspensas em 50 µL de Tampão de Lise (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM DTT, 5 mM EDTA, 5% SDS, 5% glicerol, Complete EDTA-free Inibitor protease cocktail) e fervido a 96°C por 3 minutos. Em seguida, o lisado foi centrifugado por 10 minutos a 12000 xg. Os sobrenadantes foram coletados e quantificados pelo método de Bradford.

4 RESULTADOS

4.1 Análise do conteúdo das proteínas FLAG-S6K1, FLAG-S6K2 e FLAG-S6K2ΔPro

Com o objetivo de certificar que as células transfectadas com as construções pFLAG-S6K1, pFLAG-S6K2 e pFLAG-S6K2ΔPro estavam produzindo as proteínas de interesse, extratos proteicos foram preparados após 24h de transfecção, quantificados pelo método de Bradford e analisados por *western blotting* (Figura 11). A partir dos resultados obtidos conclui-se que as células transfectadas superexpressaram as proteínas de interesse fusionadas a FLAG, e que a proteína mutada, com depleção da sequência de prolinas, foi traduzida eficientemente. No presente trabalho, também verificou-se que não ocorreu alteração no conteúdo de eIF5A em função da superexpressão das proteínas S6Ks.

Figura 11 – Representação da sequência da construção S6K2ΔPro e análise do conteúdo das proteínas FLAG-S6K1, FLAG-S6K2 e FLAG-S6K2ΔPro.

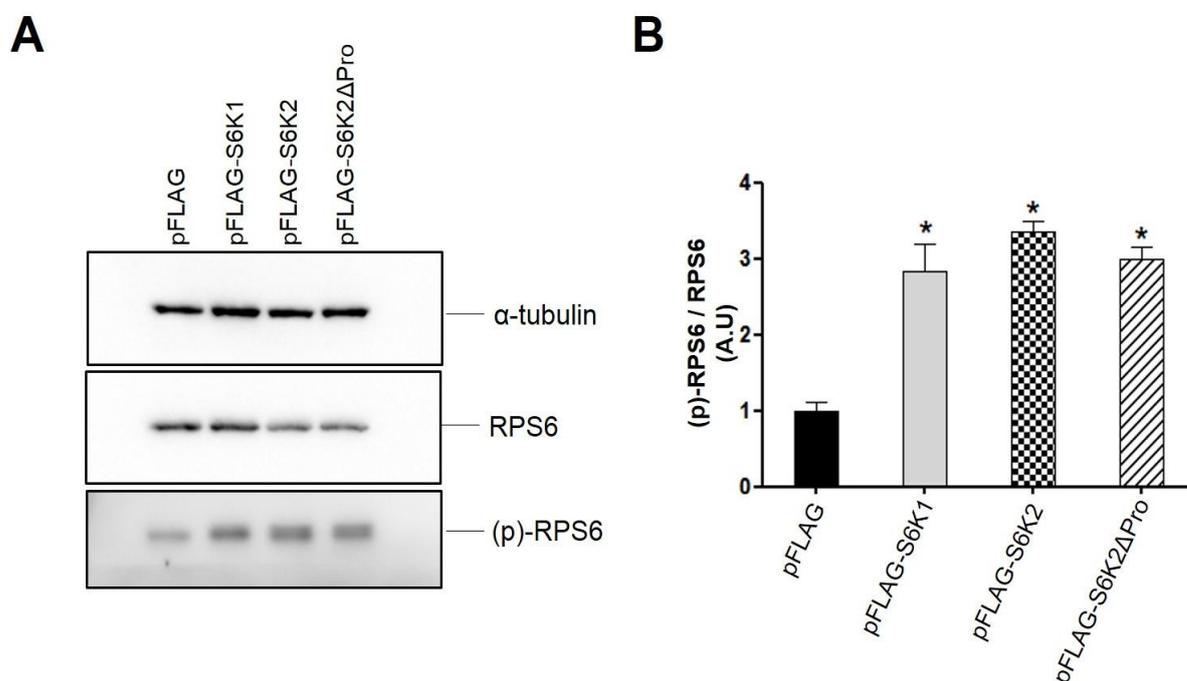


Extratos proteicos foram preparados de células HeLa com as construções (pFLAG vazio, pFLAG-S6K1, pFLAG-S6K2 e pFLAG-S6K2ΔPro) e analisadas por *western blotting* utilizando anticorpo anti-FLAG, anti-GAPDH (~40 kDa) e anti-eIF5A total (~17 kDa). Fonte: própria autora.

4.2 Análise de expressão da proteína S6K2 mutada (S6K2 Δ Pro) e sua funcionalidade

Para análise da funcionalidade da proteína mutada, buscou-se verificar sua capacidade em fosforilar a proteína S6, principal alvo de fosforilação das proteínas S6Ks. Para isto, foram realizados extratos proteicos de células HeLa transfectadas por 24 horas com as construções pFLAG vazio, pFLAG-S6K1, pFLAG-S6K2 e pFLAG-S6K2 Δ Pro, os quais foram depois analisados por *western blotting*. Como resultado, foi observado que a superexpressão de S6K1, S6K2 e S6K2 Δ Pro aumentam significativamente a fosforilação da proteína ribossomal S6, comparado à transfecção utilizando o vetor plasmidial vazio. Entretanto, não há diferenças significativas no estado de fosforilação de S6 pela ação das diferentes S6Ks avaliadas. Com isso, pode-se afirmar que a retirada da sequência de poli-prolina da proteína S6K2 não afetou sua capacidade de fosforilação, sendo, portanto, uma proteína funcional quanto à sua capacidade fosforilativa intrínseca (Figura 12). Importante destacar que a depleção do domínio poli-prolina poderia suprimir a interação e conseqüente fosforilação de um subgrupo de ligantes alvos.

Figura 12 – Análise da funcionalidade das proteínas FLAG-S6K1, FLAG-S6K2 e FLAG-S6K2ΔPro.



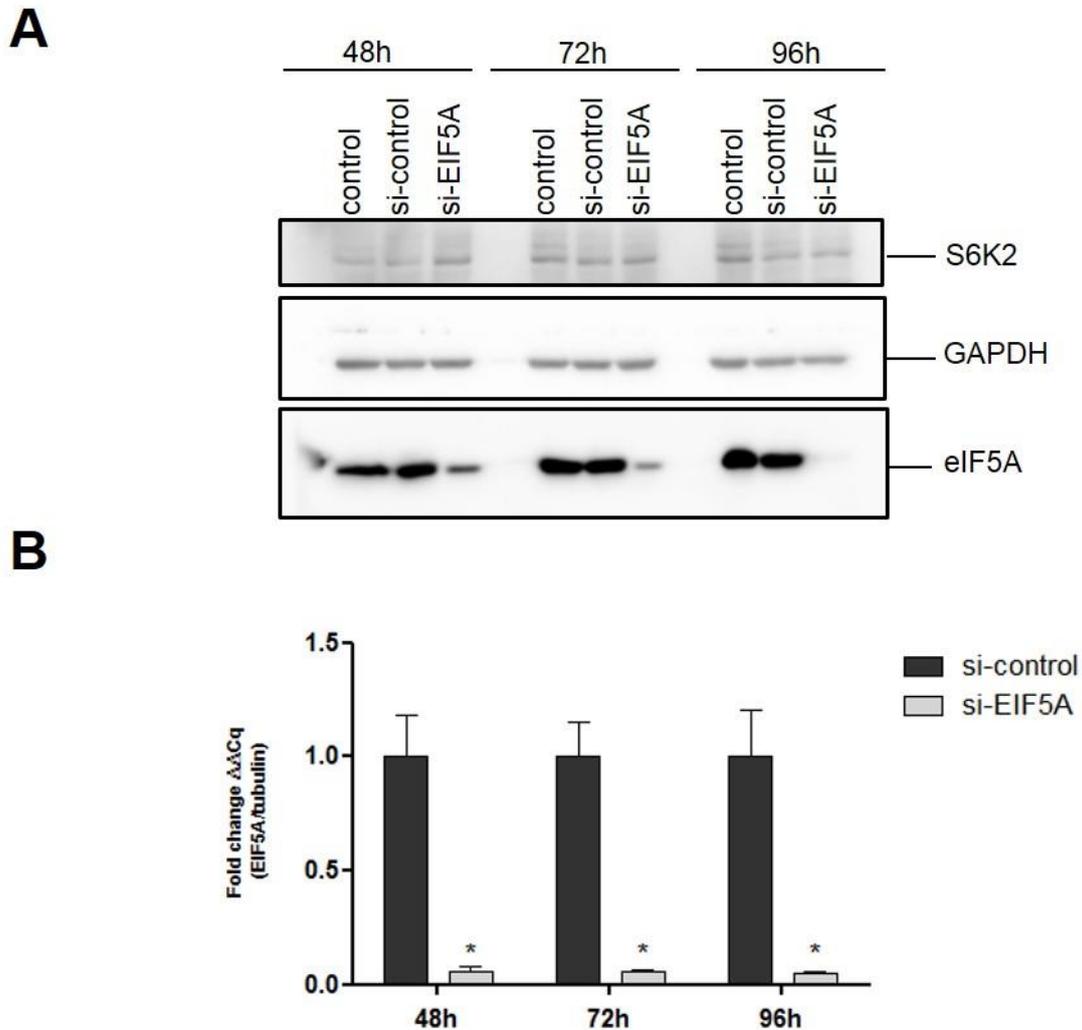
A) Extratos proteicos totais foram preparados de células HeLa com as construções (pFLAG vazio, pFLAG-S6K1, pFLAG-S6K2 e pFLAG-S6K2ΔPro) e analisadas por *western blotting* utilizando anticorpo anti-FLAG, anti-S6 fosforilado (~32 kDa) e anti-S6 total (~32 kDa), após *stripping* da membrana. B) Análise estatística utilizando o teste de análise de variância (ANOVA) One Way para avaliar a existência de diferenças entre os grupos. O pós-teste Bonferroni, foi empregado com o objetivo de comparar as diferenças entre os grupos. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão e o grau de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$). As análises foram feitas a partir do *software* Sigma Plot para Windows versão 10.0 (Systat Software, Alemanha, 2006). O gráfico foi gerado pelo programa GraphPad Prism (versão 5, março de 2007). Fonte: própria autora.

4.3 Análise do silenciamento gênico de eIF5A via siRNA por RT-qPCR e *western blotting* e verificação da influência de seu *knockdown* na produção da proteína S6K2 em células HeLa

Buscando-se avaliar se o silenciamento de eIF5A influencia a tradução da proteína S6K2 endógena, células HeLa foram tratadas segundo as recomendações do fabricante com uma concentração de 30 pmol das moléculas siRNA-eIF5A e siRNA controle (controle negativo) em diferentes tempos. Para avaliar o conteúdo do mRNA de eIF5A nos tratamentos com as moléculas de silenciamento gênico, foi realizado RT-qPCR. Após tratamento das células, foi extraído o RNA total pelo método do reagente TRIzol® das seguintes amostras: Controle, si-controle e si-eIF5A, em três diferentes tempos de tratamento: 48, 72 e 96 horas. Em seguida, foi realizada a síntese de cDNA dos mesmos para realização do qPCR, e como normalizador utilizamos como alvo o mRNA codificador de tubulina. Além disso, extratos proteicos foram preparados após 48 horas, 72 horas e 96 horas de tratamento, quantificados pelo método de Bradford e analisados por *western blotting*. Os experimentos foram repetidos três vezes para confirmação dos resultados.

Como resultado, foi observado uma diminuição no conteúdo da proteína eIF5A em todos os tempos de tratamento, principalmente em 72 e 96 horas (Figura 13A). O silenciamento de eIF5A aqui obtido foi considerado eficiente, tendo em vista que o tempo de meia vida da proteína ser relativamente alta (aproximadamente 20 horas) (GERNER et al. 1986; DE ALMEIDA et al. 2014), além de eIF5A ser uma das proteínas mais abundantes em células HeLa (DUNCAN AND HERSHEY, 1986). A combinação dessas duas características influenciam negativamente a depleção de eIF5A por moléculas de silenciamento de RNA ou por compostos inibidores da hipusinação. Os resultados obtidos nas análises de PCR em tempo real corroboram com os observados nos ensaios de *western blotting* (Figura 13), sendo observado redução expressiva dos níveis de mRNA de *EIF5A* em todos os tempos de tratamento, quando comparado a amostra siRNA controle. Entretanto, apesar da diminuição da quantidade da proteína eIF5A, não foram observadas alterações no conteúdo de S6K2 endógena.

Figura 13 – Avaliação do conteúdo proteico e do transcrito de eIF5A em células HeLa após o silenciamento gênico por RNA de interferência e análise do conteúdo endógeno da proteína S6K2.



A) Extratos proteicos foram preparados de células HeLa das amostras do ensaio: controle, si-controle e siRNA-EIF5A em diferentes tempos, 48, 72 e 96 horas e analisadas por *western blotting* utilizando anticorpo anti-S6K2 (~54 kDa), anti-GAPDH (~40 kDa) e anti-eIF5A total (~17 kDa). B) Análise do conteúdo do transcrito de *EIF5A* em células HeLa tratadas com siRNA para eIF5A. Os dados foram expressos utilizando razão da expressão relativa *fold change* e o grau de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$). Foi realizada análise estatística utilizando o teste de análise de variância (ANOVA) One Way para avaliar a existência de diferenças entre os grupos, foi realizado pós teste de Tukey para comparar as diferenças entre os grupos. As análises foram feitas a partir do *software* Sigma Plot para Windows versão 10.0 (Systat Software, Alemanha, 2006). O gráfico foi gerado pelo programa GraphPad Prism (versão 5, março de 2007). Fonte: própria autora.

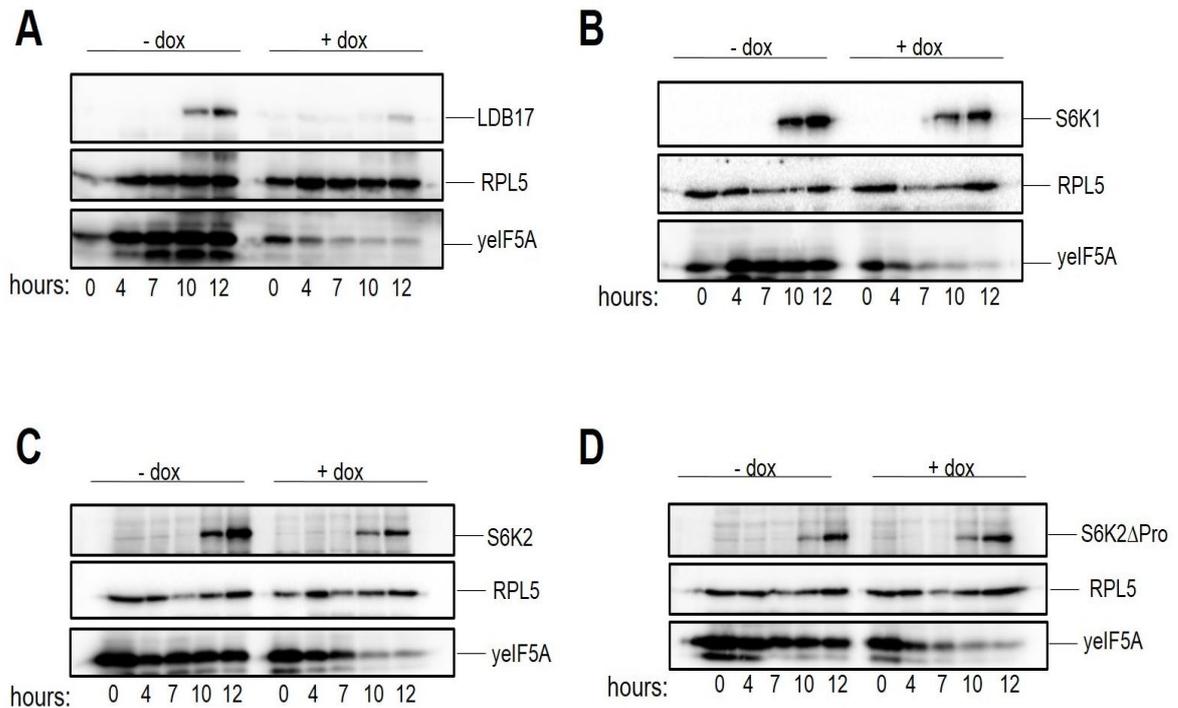
4.4 Análise da influência do homólogo de eIF5A em *S. cerevisiae* na tradução de S6K1, S6K2 e S6K2ΔPro regulando a expressão gênica de TIF51A no sistema TET-OFF

Para confirmação dos resultados observados em ensaios utilizando células HeLa foi utilizada uma linhagem de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, cuja expressão do gene de TIF51A (homólogo do gene de eIF5A humano) é controlada por promotor reprimível por tetraciclina (TET-OFF). Os ensaios buscaram avaliar a dependência de eIF5A na tradução das S6Ks. Para isto, as leveduras transformadas com as construções pYES-S6K1, pYES-S6K2, pYES2-S6K2ΔPro e pBG1805-LDB17 foram crescidas em meio de cultura SC-ura contendo rafinose e na presença ou ausência de doxiciclina nas primeiras 7 horas de ensaio. Neste período, o conteúdo da proteína eIF5A já havia começado reduzir nos frascos contendo a doxiciclina. Para manter a repressão da transcrição de TIF51A e induzir a produção das proteínas contidas nos vetores de expressão controlados por galactose (pYES2 e pBG1805), após 7 horas do início do ensaio, o conteúdo dos frascos foram centrifugados e o meio de cultura foi substituído por SC-ura contendo galactose com ou sem doxiciclina. Desta forma, foi induzida a produção das proteínas S6Ks e LDB17 por 5 horas, ocorrendo repressão do promotor de eIF5A durante todo o ensaio que totalizou 12 horas. Já nos frascos que não foram adicionados doxiciclina foi observado a produção das proteínas na presença do conteúdo normal de eIF5A. Os frascos foram mantidos a 30°C sob agitação de 200 rpm em *shaker* a durante todo o ensaio.

Foram coletadas amostras durante os experimentos em diferentes tempos (0, 4, 7, 10 e 12 horas) para posterior análise de conteúdo proteico por *western blotting*. Nos ensaios, é possível verificar que devido à troca do açúcar do meio de rafinose para galactose ocorre a indução da produção das proteínas presentes no vetores (Figura 14). Observou-se que com a redução do conteúdo de eIF5A por doxiciclina a produção da proteína LDB17, que contém uma sequência de nove resíduos de prolina em seu C-terminal, é altamente prejudicada, como já havia sido reportado (GUTIERREZ et al., 2013). Contudo, o conteúdo proteico de S6K2 sofreu apenas uma leve redução com a diminuição do conteúdo de eIF5A, efeito sutil quando comparado a proteína controle LDB17. Além disso, não foi observada alteração na

produção das proteínas S6K1 e S6K2 Δ Pro. Com isso, aparentemente a tradução das S6Ks não são afetadas pela redução no conteúdo de eIF5A.

Figura 144 – Leveduras com promotor de eIF5A reprimível por tetraciclina ou doxiciclina transformadas com os plasmídeos pBG1805-LDB17, pYES2-S6K1, pYES2-S6K2, pYES2-S6K2 Δ Pro.



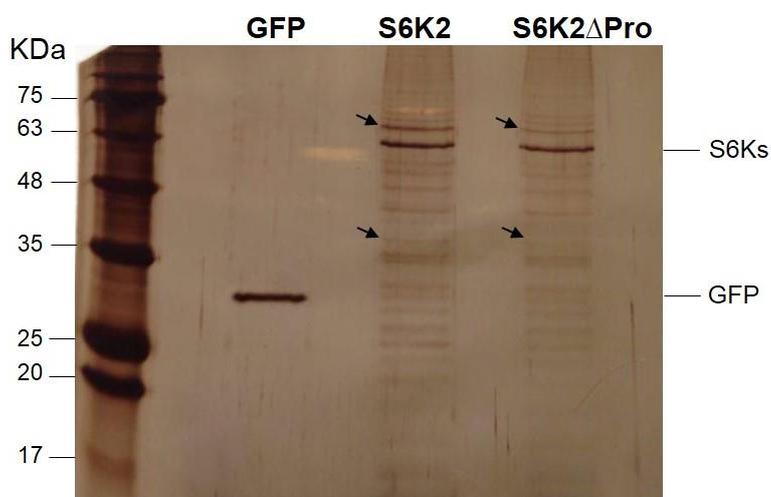
Leveduras transformadas com: A) pBG1805-LDB17, B) pYES2-S6K1, C) pYES2-S6K2, D) pYES2-S6K2 Δ Pro. Os vetores plasmidiais possuem promotor indutível por galactose. No ensaio as leveduras foram analisadas para avaliar repressão de eIF5A por doxiciclina (dox) seguido da indução da expressão por galactose da proteína LDB17 e das proteínas humanas S6K1, S6K2 e S6K2 Δ Pro contidos nos plasmídeos. Extratos totais proteicos foram analisados por *western blotting* utilizando os anticorpos anti-RPL5 (~35 kDa) e anti-yelF5A (~17 kDa), anti-S6K1 (~70 kDa) e anti-S6K2 (~54 kDa). Fonte: própria autora.

4.5 Imunoprecipitação das proteínas FLAG-GFP, FLAG-S6K2 e FLAG-S6K2 Δ Pro superexpressas em células HeLa e identificação das proteínas de interação por espectrometria de massas

Com o objetivo de identificar se a região de poli-prolina de S6K2 apresenta influência nas interações proteína-proteína de S6K2, foram realizados ensaios de imunoprecipitações de FLAG-GFP, FLAG-S6K2 e FLAG-S6K2 Δ Pro superexpressas em células HeLa. Uma alíquota das amostras dos eluídos foram separados por SDS-

PAGE e corados com nitrato de prata. No gel corado com prata é possível observar que o conjunto de bandas determinado pelos ligantes de S6K2 apresenta perfil diferente do observado para S6K2 Δ Pro, como exemplificado com as setas, demonstrando que a região de poli-prolina aparenta ser importante para a interação destas proteínas com S6K2 (Figura 15).

Figura 15 – Gel corado com prata dos eluidos da IP de GFP (27 kDa), S6K2 (54 kDa) e S6K2 Δ Pro (54 kDa).

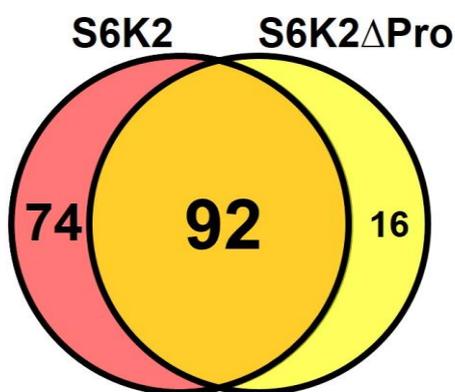


As setas indicam algumas bandas que foram observadas em S6K2 mas não em S6K2 Δ Pro. Ao lado esquerdo encontra-se o padrão de massa molecular utilizado com as respectivas massas em kDa. Fonte: própria autora.

Para identificar quais proteínas em que a interação com a proteína S6K2 pode ser influenciada pela região de poli-prolina, ou seja, foram imunoprecipitadas com S6K2, mas não com S6K2 Δ Pro, os produtos da imunoprecipitação foram digeridos com tripsina, separados por nano cromatografia líquida (nLC) e analisados por espectrometria de massas. Os dados obtidos pelo espectrômetro de massas foram analisados pelo *software* MASCOT. Para as análises foram eliminadas proteínas contaminantes do processo de imunoprecipitação manualmente. Ao todo foram identificadas 192 proteínas diferentes, dentre elas, 10 proteínas foram consideradas como de ligação inespecífica, pois também foram identificadas na imunoprecipitação de FLAG-GFP. Das 182 proteínas identificadas (após a eliminação de proteínas contaminantes e de proteínas consideradas ligantes inespecíficas), 166 proteínas estavam presentes na imunoprecipitação de S6K2 e 108 na imunoprecipitação de S6K2 Δ Pro. Observou-se que 92 proteínas foram encontradas em S6K2 e S6K2 Δ Pro

simultaneamente, sugerindo que a interação da maioria das proteínas que interagem com S6K2 não depende da região de poli-prolina, o que de fato já era esperado. Entretanto, 74 proteínas presentes em S6K2 não foram detectadas na imunoprecipitação com S6K2 Δ Pro, o que sugere que a interação destas proteínas possa ser influenciada pela região poli-prolina de S6K2 (Figura 16). No Anexo 1, encontra-se a lista das proteínas identificadas no ensaio e a quantidade de peptídeos identificados.

Figura 16 – Diagrama de Venn da representação das quantidades de proteínas identificadas pelo espectrômetro de massa nos ensaios de imunoprecipitações.



Fonte: Elaborado pela autora.

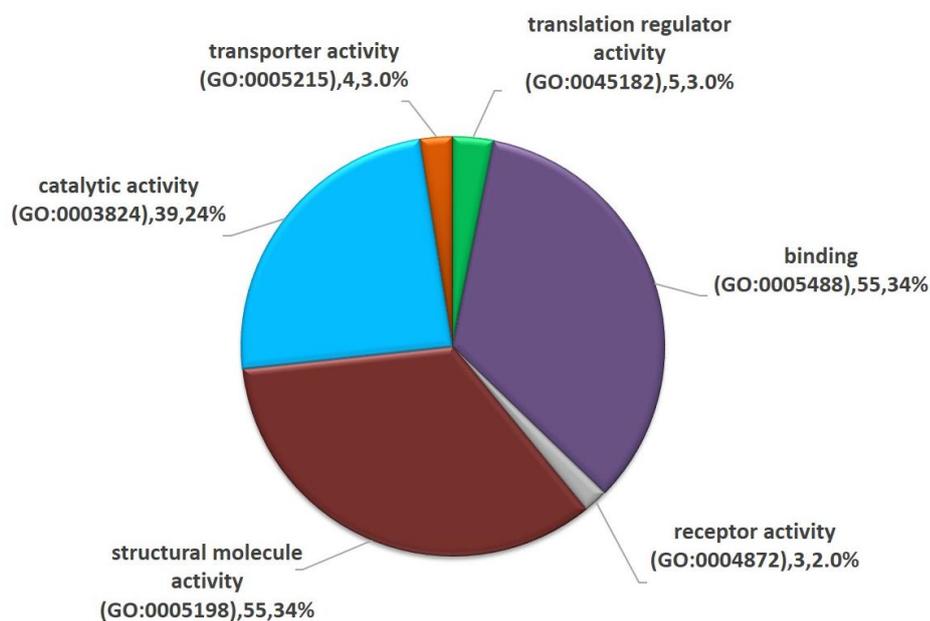
4.6 Classificação das proteínas presentes na imunoprecipitação de S6K2 e de S6K2 Δ Pro utilizando o PANTHER

Buscando-se caracterizar o interactoma de S6K2 segundo suas funções moleculares foi utilizado o sistema de classificação PANTHER. Através dos resultados obtidos, verifica-se que, devido ao fato da maioria das proteínas encontradas estarem presentes em ambas as imunoprecipitações, as classes de funções moleculares em que as proteínas foram classificadas apresentam grande semelhança. Entretanto, destaca-se que o interactoma de S6K2 apresenta proteínas em que segundo sua função molecular gerada pelo PANTHER são classificadas em “atividade transportadora”, diferente de S6K2 Δ Pro (Figura 17 e 18), ou seja, possuindo, portanto, uma classe de classificação de proteínas a mais que a proteína mutante composta pelas proteínas ATP5A1, ATP5O, LRPPRC e ATP2A2. Este fato sugere que as interações de S6K2 com as proteínas transportadoras identificadas pode ser influenciada pela região de poli-prolina.

Além disto, as 74 proteínas que foram detectadas na imunoprecipitação de S6K2 mas não S6K2 Δ Pro foram classificadas de acordo com sua função molecular. Através dos resultados, observa-se que as classes de funções moleculares que mais proteínas foram relacionadas são: atividade catalítica (37%), ligação (ligantes de ácido nucleico e proteínas) (38%) e atividade molecular estrutural citosólica e ribossomal (13%). Além destas, as proteínas também foram classificadas em outras classes de funções moleculares como atividade transportadora transmembrana (6%), atividade receptora transmembrana (2%) e atividade reguladora da tradução (6%) (Figura 19), o que sugere que as interações de S6K2 que ocorrem nestes contextos moleculares podem depender da região de resíduos de poli-prolina.

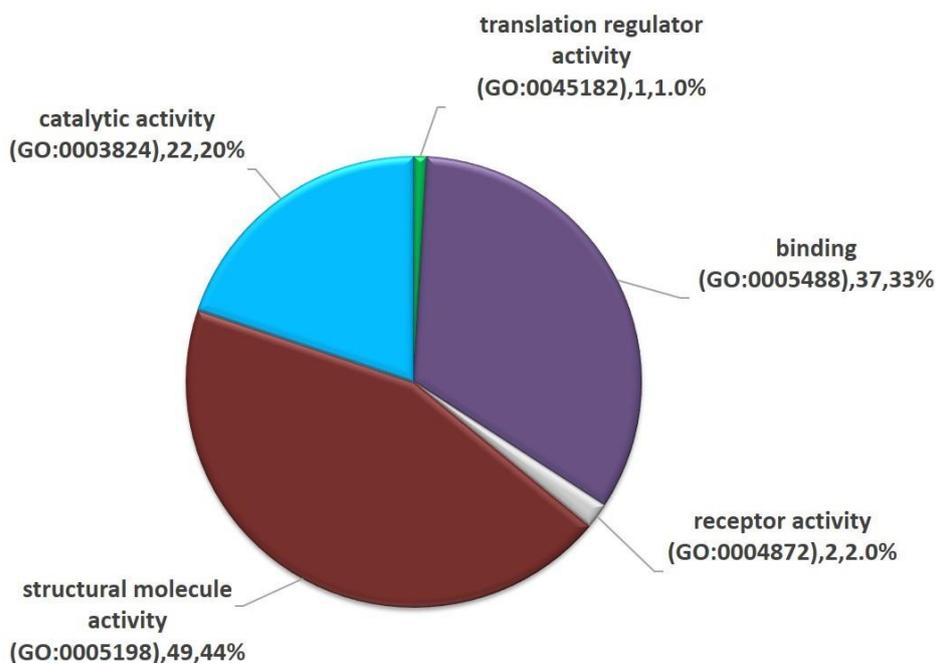
Em sequência, essas proteínas também foram classificadas segundo sua função biológica. A partir dos resultados pode-se observar que os processos metabólicos consistem na função biológica com mais representatividade, principalmente processos metabólicos primários (38%), seguido de processos celulares de ciclo celular ou comunicação celular (32%). Além destes, também foram identificadas proteínas envolvidas com outras funções biológicas como: organização dos componentes celulares ou biogênese (12%), reprodução (1%), resposta a estímulos (externos ou estresse) (5%), regulação biológica e homeostase (2%), processos do sistema imune (5%), adesão celular biológica (1%), processo de desenvolvimento (diferenciação celular e morte celular) (3%), localização (transporte e localização de RNA ou proteína) (5%), processo de organismo multicelular (2%) (Figura 20).

Figura 17 – Classificações pelo sistema PANTHER das funções moleculares das proteínas identificadas no ensaio de interactoma de S6K2.



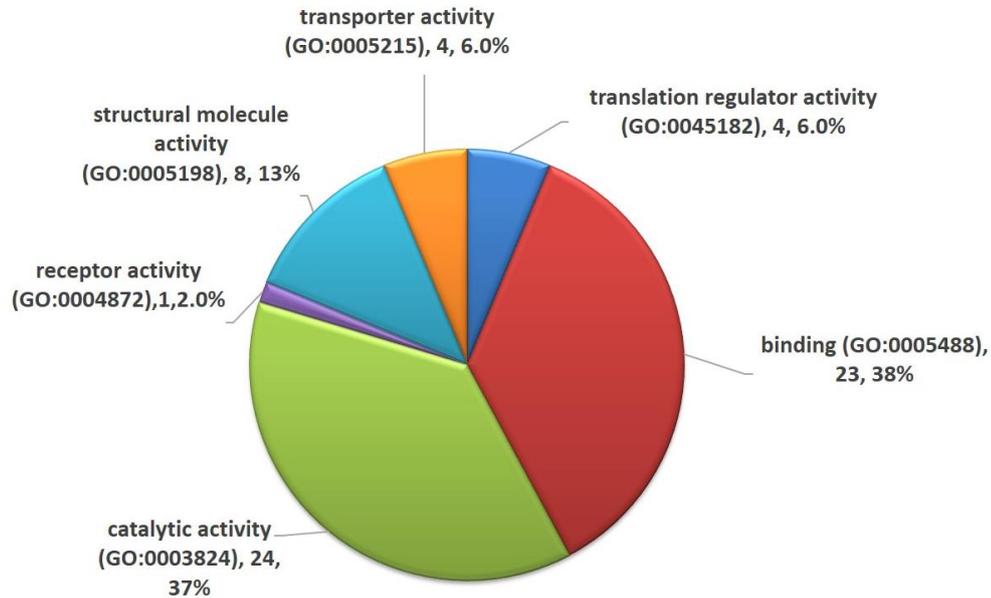
Fonte: Sistema PANTHER disponível online (www.pantherdb.org).

Figura 18 – Classificações pelo sistema PANTHER das funções moleculares das proteínas identificadas no ensaio de interactoma de S6K2 Δ Pro.



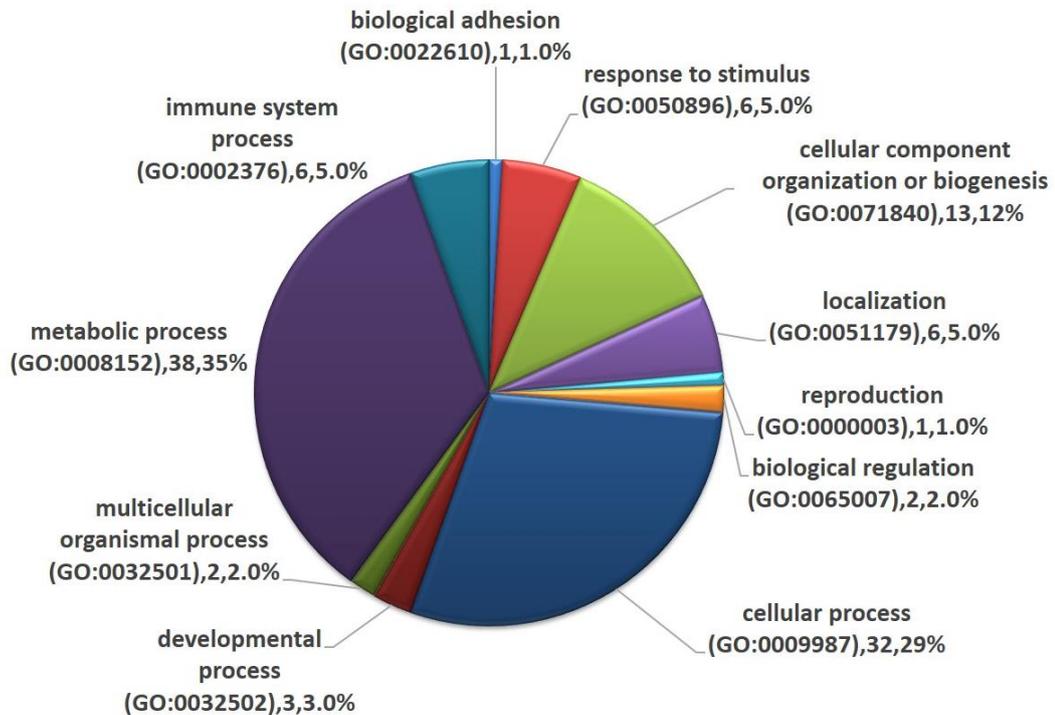
Fonte: Sistema PANTHER disponível online (www.pantherdb.org).

Figura 19 – Classificações pelo sistema PANTHER das funções moleculares das 74 proteínas identificadas na imunoprecipitação de S6K2 mas não de S6K2ΔPro.



Fonte: Sistema PANTHER disponível online (www.pantherdb.org/).

Figura 20 – Classificação pelo sistema PANTHER das funções biológicas das 74 proteínas identificadas na imunoprecipitação de S6K2 mas não de S6K2ΔPro.

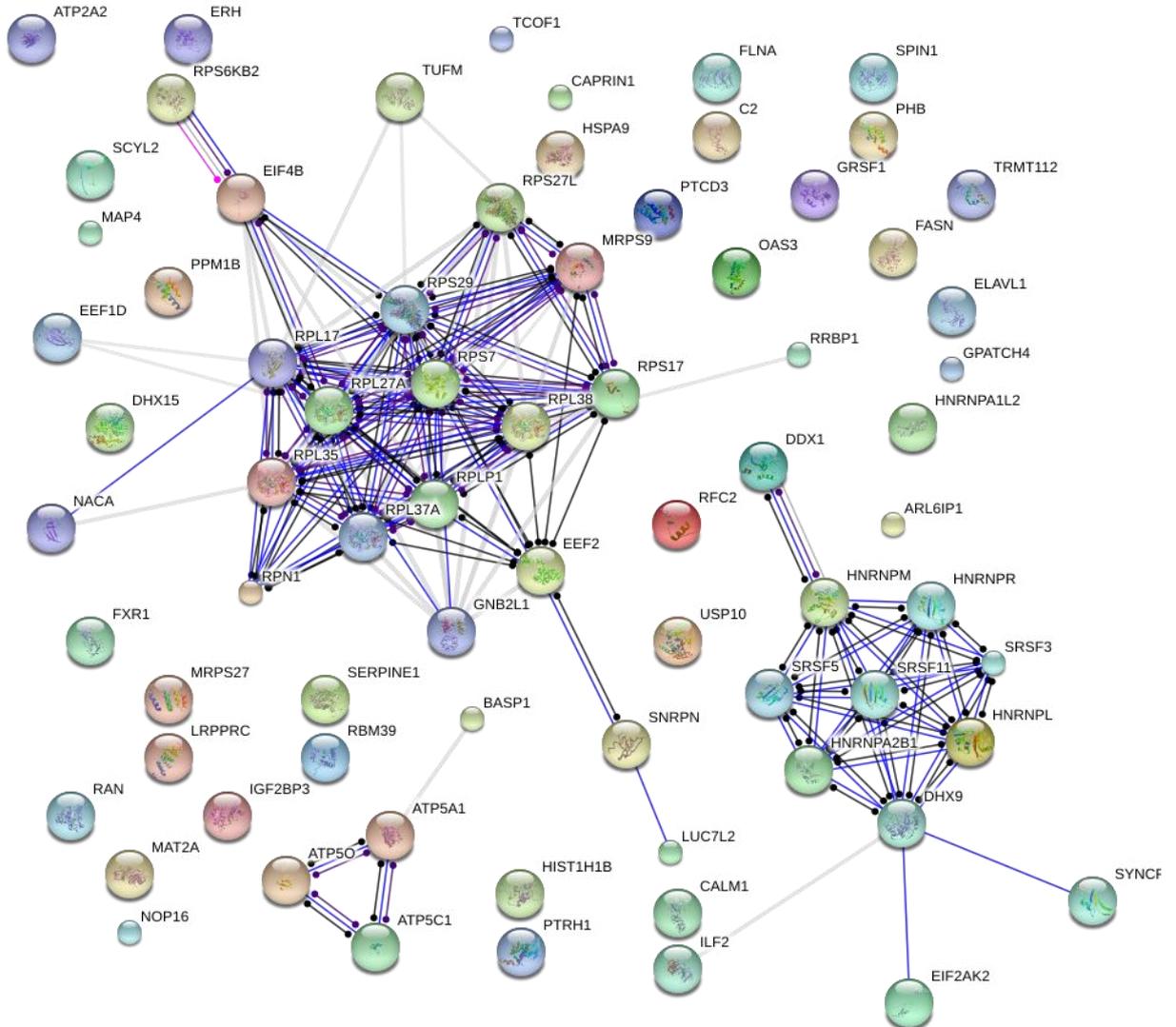


Fonte: Sistema PANTHER disponível online (www.pantherdb.org/).

4.7 *Network* das interações de S6K2 com outras proteínas que podem ser influenciadas pela região de poli-prolina

Visando observar as interações de S6K2 que podem ser influenciadas pela região de poli-prolina, foi realizado a observação do *network* de interações utilizando o programa STRING v.10 com as 74 proteínas identificadas apenas em S6K2 e não em S6K2 Δ Pro (Figura 16). A partir da visualização do *network* é possível observar que S6K2 representada pelo gene *RPS6KB2* associa-se principalmente com componentes da maquinaria da síntese proteica (Figura 21), fato que já foi demonstrado anteriormente com a fosforilação de diversas proteínas controladoras do processo de síntese proteica pelas S6Ks, o que promove e estimula a tradução (MAGNUSON et al., 2012).

Figura 21 – Demonstração do *network* de interações de S6K2 com as 74 proteínas identificadas apenas no interactoma de S6K2 e não de S6K2ΔPro utilizando o programa STRING.

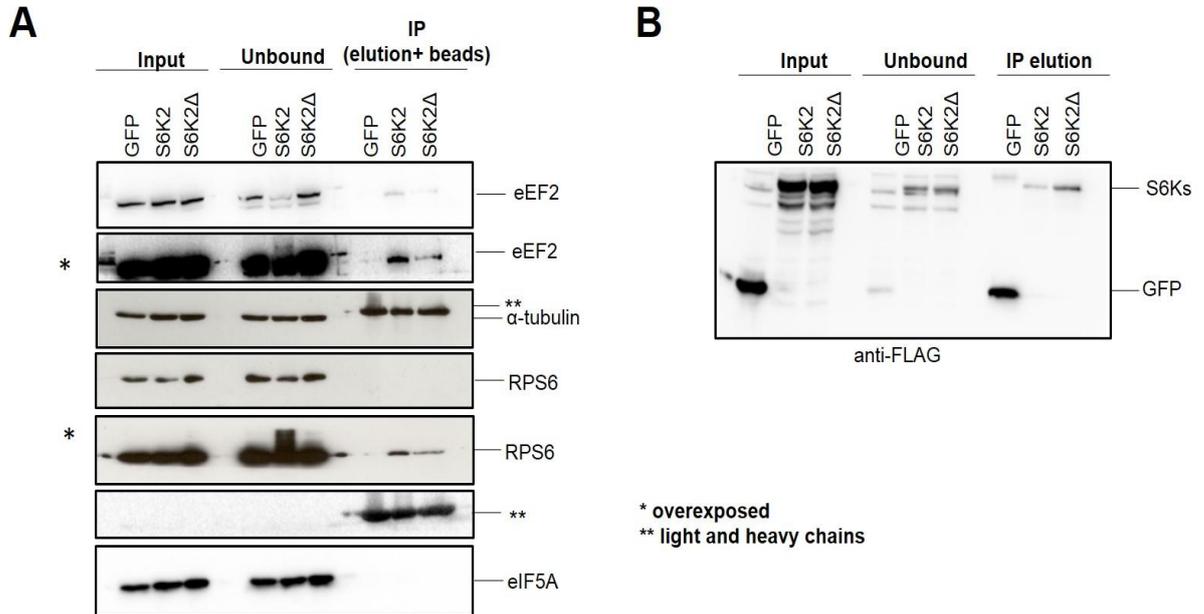


Foi utilizado o programa STRING v.10.0 disponível em (<http://www.string-db.org/>). As análises de *network* foram realizadas utilizando uma alta estrigência (STRING score ≥ 0.7) e as evidências das interações buscadas foram: Experimentais, Banco de dados e Co-expressão. O *network* está representado na forma de ação molecular. Linhas azuis significam ligação, linhas pretas indicam reação, linhas rosa evidenciam modificação pós-traducional e linhas roxas representam catálise.

4.8 Imunoprecipitação de FLAG-GFP, FLAG-S6K2 e FLAG-S6K2 Δ Pro superexpressas em células HeLa e validação das proteínas de interação por *western blotting*

A partir do resultado obtido no ensaio de imunoprecipitação (IP) seguido de espectrometria de massas, obteve-se algumas proteínas candidatas, em que a interação com S6K2 pode ser dependente da sua região de poli-prolina. Para validar as interações identificadas no espectrômetro de massas foi realizado *western blotting* com experimentos de imunoprecipitação independentes. Como alvo principal, foi testado o Fator de alongação 2 (eEF2) identificado na imunoprecipitação apenas de S6K2 e a proteína RPS6 identificada em ambas as imunoprecipitações, como controle positivo. Como resultado, através do ensaio de *western blotting* foi detectado o principal alvo das S6Ks, a proteína ribossomal S6 (RPS6) no precipitado de S6K2 e S6K2 Δ Pro, validando o resultado prévio (Figura 22). Além disto, foi visto tanto na imunoprecipitação analisada por espectrometria de massas quanto na *western blotting* que a proteína eIF5A não interage com S6K2. Utilizando-se anticorpo específico para a proteína eEF2 foi possível observar que a interação entre S6K2 e eEF2 encontra-se prejudicada na proteína S6K2 mutante, o que sugere que a região de poli-prolina pode influenciar ou contribuir para a formação desta interação, que pode ocorrer de maneira direta ou indiretamente.

Figura 22 – Validação das interações de S6K2 por *western blotting*.



A) Extratos proteicos foram obtidos para realização de *western blotting* realizadas com as amostras do ensaio de imunoprecipitação de GFP-FLAG, S6K2-FLAG e S6K2ΔPro-FLAG superexpressos em células HeLa. Foram utilizados os anticorpos anti-eEF2 (92 kDa), anti-α-tubulin (50 kDa), anti-RPS6 (32 kDa), anti-eIF5A (17 kDa). A visualização das cadeias leves e pesadas das *beads* presentes no amostra do eluido foi realizado através da incubação com o anticorpo policlonal Mouse anti-IgG conjugados à peroxidase. B) Análise do conteúdo das GFP-FLAG, S6K2-FLAG e S6K2ΔPro-FLAG durante o ensaio de imunoprecipitação. Extratos proteicos foram preparados de células HeLa transfectadas com as construções (pFLAG-GFP, pFLAG-S6K2 e pFLAG-S6K2ΔPro), extrato total, extrato não-ligado, as *beads* FLAG, e eluidos da imunoprecipitação e analisadas por *western blotting* utilizando anticorpo anti-FLAG.

5 DISCUSSÃO

Buscando-se analisar a região de poli-prolina presente na região C-terminal de S6K2 para caracterização funcional da mesma, foi verificado a capacidade de superexpressão da proteína com a região de poli-prolina mutada S6K2 Δ Pro fusionada a FLAG em células HeLa. Foi observado que a proteína é capaz de ser produzida eficientemente e em conteúdos similares à proteína S6K2 selvagem (Figura 11). Este resultado difere do que observado anteriormente com a proteína contendo poli-prolina VPX (MIYAKE et al., 2014). Neste estudo, a remoção da sequência poli-prolina de VPX afetou negativamente a produção da proteína mutante. Como análise funcional da proteína mutada, observou-se que a superexpressão de S6K2 Δ Pro ocasiona o aumento do conteúdo fosforilado da proteína RPS6, assim como é observado com a superexpressão das proteínas S6K1 e S6K2 (Figura 12). Neste contexto, a capacidade de fosforilação *in vitro* da proteína RPS6 por S6K1/2 já foi reportada em trabalhos anteriores (PHIN et al., 2003). Desta forma, os resultados sugerem que a mutação não influenciou a estabilidade e funcionalidade da proteína. Adicionalmente, verificou-se que a superexpressão das proteínas S6Ks, reconhecidas como reguladoras positivas da tradução, não influenciam a expressão do fator de tradução eIF5A, fato relevante para definir se este fator, reconhecido como importante para a tradução de domínios PPG ou PPP, participa na síntese da S6K2 que contém em seu domínio poli-prolina que contém um número mais expressivo de resíduos consecutivos de prolina (PPPPP).

Recentemente, tem sido proposto a atuação de eIF5A na elongação da tradução de proteínas contendo regiões com 3 ou mais resíduos de prolinas consecutivos (GUTIERREZ et al., 2013). Neste contexto, um estudo em linhagens de *S. cerevisiae* temperatura sensíveis demonstrou que eIF5A é essencial para a tradução da proteína BNI1, que contém prolinas consecutivas e está envolvida no crescimento polarizado de leveduras durante a formação de *shmoo*, uma vez que esta dependência foi perdida com a retirada da sequência de poli-prolina da proteína (LI et al., 2014). Um trabalho realizado em células de origem pancreática mostrou que algumas proteínas do citoesqueleto com domínios de poli-prolina (AKAP13, TJP1, TRIP10 e PEAK1) foram afetadas devido ao silenciamento de eIF5A (FUJIMURA et al., 2015). Estes resultados corroboram a hipótese de que a síntese

de extensões de poli-prolina são dependentes de eIF5A. Contudo, é importante salientar que não foram apenas proteínas com domínios de poli-prolina que foram afetadas com o silenciamento de eIF5A (FUJIMURA et al., 2015).

No presente trabalho foi avaliada a dependência de eIF5A para a tradução da proteína S6K2 e foi observado que a depleção de eIF5A em células HeLa não afetou o conteúdo endógeno de S6K2 (Figura 13). Além disso, avaliando em condições de superexpressão, utilizando um modelo de leveduras, foi visto que embora tenha sido observada uma leve redução no conteúdo de S6K2 com a repressão de eIF5A, a produção de S6K2 ocorre em ambas as condições, diferentemente da proteína controle LDB17 (Figura 14). A proteína LDB17 contém um motivo de poli-prolina no seu C-terminal e sua produção foi extremamente afetada pela depleção de eIF5A como observado anteriormente por (GUTIERREZ et al., 2013) e reproduzido no presente trabalho com o uso da levedura com o gene de *TIF51A* controlado com promotor TET-OFF. Assim como obtido aqui, recentemente, em um trabalho proteômico realizado com células HeLa foi observado que a maioria das proteínas identificadas contendo poli-prolina não tiveram seu conteúdo relativo alterado com a depleção de eIF5A por 72 e 96 horas (MANDAL et al., 2016). Além disso, a redução do conteúdo de eIF5A gerou tanto um efeito positivo quanto negativo na síntese de proteínas com poli-prolinas, sendo observado o aumento do conteúdo de algumas proteínas como SF3B2 (splicing factor 3B subunit 2), que contém sete motivos de poli-prolina (três a 10 prolinas consecutivas), ZYX (Zyxin, *Zn-binding phospho protein*) contém 8 regiões de poli-prolina, e também CKAP4 (*cytoskeleton-associated protein 4*) com 2 regiões ricas em prolina (MANDAL et al., 2016).

Estes trabalhos recentes que descrevem proteínas com poli-prolinas que não são produzidas de maneira dependente de eIF5A e os resultados obtidos no presente estudo sugerem que, apesar das evidências presentes na literatura da importância de eIF5A para tradução de sequências contendo PPG ou PPP, este mecanismo não está completamente elucidado. Além disso, aparentemente o mesmo não se aplica para a proteína S6K2 que apresenta uma região PPPPP em seu C-terminal. Possivelmente, a atuação de eIF5A na tradução destas proteínas deve ocorrer de maneira dependente de outros mecanismos, indicando que mais estudos são necessários para o entendimento da especificidade do processo, ou seja, quais mRNAs com poli-prolina dependem de eIF5A e quais não necessitam.

Regiões de poli-prolina em proteínas não são somente estudadas quanto a sua particularidade relacionada ao controle traducional, mas também como sua relevância em interações proteína-proteína (BALL et al., 2005). Interações desta natureza já foram demonstradas como importantes em vias metabólicas (KAY et al., 2000) assim como podem estar associadas com o desenvolvimento de desordens metabólicas em doenças como Huntington (QIN et al., 2004) e Alzheimer (ERMEKOVA et al., 1997).

No presente trabalho, para avaliar a importância da região de poli-prolina de S6K2 para a interação com outras proteínas, foram realizados ensaios de imunoprecipitação seguido de LC-MS. Estes ensaios demonstraram que a região de poli-prolina de S6K2 influencia as interações proteína-proteína de S6K2, visto que, com a mudança da sequência dessa região observa-se que a interação de um sub grupo de proteínas fica possivelmente prejudicada, com destaque para as proteínas com atividade transportadora (Figuras 17 e 18). As proteínas identificadas nesta classe compreendem as proteínas ATP5A1, ATP5O, ATP2A2 e LRPPRC, sendo que ATP5A1 e ATP5O fazem parte do complexo de ATPase F1 mitocondrial, envolvido com a síntese de ATP (KÜHLBRANDT, 2015). Já ATP2A2 catalisa a hidrólise de ATP acoplada com a translocação do cálcio do citosol ao lúmen do retículo sarcoplasmático envolvida com o processo de contração/relaxamento muscular (ARRUDA et al., 2007). Por fim, a proteína LRPPRC pode atuar no metabolismo de RNA no núcleo e na mitocôndria e pode estar envolvida na regulação da transcrição (SASARMAN et al., 2010). O fato destas proteínas não terem sido identificadas na imunoprecipitação de S6K2 Δ Pro sugere que as interações de S6K2 com estas proteínas pode depender da região de poli-prolina, entretanto, mais estudos são necessários para descrever e validar estas interações.

O envolvimento das proteínas S6Ks com o controle da síntese proteica têm sido relatado em diversos trabalhos (DUFNER AND THOMAS, 1999; MAGNUSON et al., 2012) e observado também no *Network* de interações de S6K2 demonstrado pelo programa STRING (Figura 21). Sendo proteínas efetoras de mTOR, as S6Ks respondem a estímulos por insulina e atuam fosforilando uma série de proteínas envolvidas no processo de tradução (MAGNUSON et al., 2012). Um dos alvos bem estabelecidos das S6Ks consiste na quinase do fator de alongação 2 (eEF2K) que

consiste na única proteína quinase dependente de Ca^{2+} /calmodulina (CaM) (WANG et al., 2001).

O sítio de fosforilação das S6Ks consiste na sequência consenso RXXRXXS/T, entretanto, algumas proteínas alvo de fosforilação das S6Ks são exceções a esta regra, como a proteína eEF2K. As proteínas S6Ks fosforilam eEF2K em Ser366 e conseqüentemente inibem sua atividade de modulador negativo da síntese proteica (WANG et al., 2001; RYAZANOV, 2002). Seu mecanismo de regulação ocorre através da fosforilação de eEF2 em Thr56 e inibição da atividade do fator, seu único alvo conhecido, impedindo que eEF2 promova a translocação e movimentação ribossomal durante a etapa de alongação da tradução (FU et al., 2014). A interação de S6K2 com eEF2 já havia sido identificada em ensaios de imunoprecipitação de S6K2 seguido de espectrometria de massas em células HEK293 (PAVAN et al., 2016), entretanto, a indicação e validação de que esta interação pode ocorrer e depender da região de prolinas do C-terminal de S6K2 está sendo proposta pela primeira vez neste trabalho.

Conforme discutido acima, é descrito que as S6Ks exercem sua função sobre eEF2 através de eEF2K. No entanto, o levantamento do porquê ocorrer uma interação entre S6K2 e eEF2 demanda o entendimento de outros processos celulares.

Um dos grandes desafios de células de mamíferos se encontra na necessidade de controlar e processar com eficiência o enorme fluxo de informações e sinais recebidos. Estas regulações ocorrem via cascata de eventos, que apenas podem ocorrer de modo eficiente com as proteínas corretas fisicamente próximas (GOOD et al., 2011). Sabe-se hoje que determinadas proteínas são capazes de formar complexos juntamente com seus parceiros de sinalização relacionados a uma determinada via metabólica, uma vez que a interação ou proximidade física entre proteínas e seus alvos (diretos ou indiretos) de fosforilação facilita uma melhor e mais ágil modulação das vias metabólicas sob seu controle (SHAW AND FILBERT, 2009; GOOD et al., 2011). A organização espaço-temporal de proteínas e seus alvos (mesmo local no momento exato) é crucial para o correto funcionamento de células eucarióticas (GOOD et al., 2011; KHOLODENKO, 2006; KORNAU et al., 1995; HARDING et al., 2005). Neste contexto, podemos supor que a interação observada entre S6K2 e eEF2 seja

importante para manter a proximidade entre as duas proteínas. Esta interação pode aumentar a eficiência com a qual S6K2 é capaz de modular a síntese proteica via eEF2, sendo a região de poli-prolina de S6K2, conforme demonstrado no presente trabalho, importante para tal interação. Além disso, já foi demonstrado que regiões de poli-prolina pode estabilizar a interação entre quinase e substrato, facilitando a fosforilação (PELLICENA AND MILLER, 2001).

Desta forma, a interação ou proximidade física de S6K2 com suas proteínas ligantes poderia ser importante não só para a regulação da síntese proteica via eEF2, mas possivelmente de outras proteínas em que se observou uma possível redução da interação devido a deleção da sequência de poli-prolina (Figuras 17 a 21 e Anexo 1). De fato, a importância desse motivo de poli-prolina é evidenciada através do alto grau de conservação dessa região de S6K2 em mamíferos (Figura 7). Isto sugere que uma elevada pressão seletiva manteve o motivo de poli-prolina em S6K2, mesmo considerando-se diferentes ordens e famílias dentre a classe dos mamíferos. Esta conservação pode ter sido causada, portanto, devido a uma possível importância da interação entre S6K2 e suas proteínas de interação.

6 CONCLUSÕES

Em função dos resultados obtidos conclui-se que a depleção do domínio poli-prolina presente em S6K2, mas ausente em S6K1, não interfere com o seu perfil de expressão e não influencia sua capacidade fosforilativa intrínseca, como evidenciado pela fosforilação do principal alvo de fosforilação, a proteína RPS6 pela proteína mutante S6K2 Δ Pro desenvolvida neste estudo. Esta observação, portanto, revela que a proteína mutante S6K2 Δ Pro apresenta preservada sua atividade catalítica intrínseca.

A proteína S6K2 endógena não tem seu conteúdo alterado quando ocorre a depleção do conteúdo de eIF5A com o silenciamento gênico utilizando moléculas siRNA para eIF5A em células HeLa nos tempos testados. Além disso, diferente da proteína controle LBD17 que têm sua produção altamente prejudicada pela redução do conteúdo de eIF5A, a superexpressão S6K2 foi apenas pouco afetada pela repressão de eIF5A em modelo de *Saccharomyces cerevisiae* regulando a expressão gênica de *TIF51A*, o que indica que eIF5A não está envolvida na tradução de S6K2.

A região de poli-prolina de S6K2 é importante para as interações proteína-proteína de S6K2, como mostrado nos ensaios de imunoprecipitação seguido de LC-MS. Uma vez que, com a mudança da sequência dessa região observa-se que a interação de um sub grupo de proteínas fica possivelmente prejudicada, com destaque para as proteínas com atividade transportadora. Dentre as proteínas identificadas, o fator eEF2 foi validado pela primeira vez como uma das proteínas com interação a S6K2 e esta interação pode sofrer influência do seu domínio poli-prolina de S6K2.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arruda, A. P., M. Nigro, G. M. Oliveira and L. de Meis. (2007), 'Thermogenic Activity of Ca²⁺-ATPase from Skeletal Muscle Heavy Sarcoplasmic Reticulum: The Role of Ryanodine Ca²⁺ Channel', *Biochim Biophys Acta* Vol. 1768, No. 6, pp. 1498-505.
- Ball, L. J., T. Jarchau, H. Oschkinat and U. Walter. (2002), 'Evh1 Domains: Structure, Function and Interactions', *FEBS Lett* Vol. 513, No. 1, pp. 45-52.
- Ball, L. J., R. Kühne, J. Schneider-Mergener and H. Oschkinat. (2005), 'Recognition of Proline-Rich Motifs by Protein-Protein-Interaction Domains', *Angew Chem Int Ed Engl* Vol. 44, No. 19, pp. 2852-69.
- Ben-Shem, A., L. Jenner, G. Yusupova and M. Yusupov. (2010), 'Crystal Structure of the Eukaryotic Ribosome', *Science* Vol. 330, No. 6008, pp. 1203-9.
- Bevec, D., H. Jaksche, M. Oft, T. Wöhl, M. Himmelspach, A. Pacher, M. Schebesta, K. Koettnitz, M. Dobrovnik, R. Csonga, F. Lottspeich and J. Hauber. (1996), 'Inhibition of HIV-1 Replication in Lymphocytes by Mutants of the Rev Cofactor Eif-5a', *Science* Vol. 271, No. 5257, pp. 1858-60.
- Browne, G. J. and C. G. Proud. (2002), 'Regulation of Peptide-Chain Elongation in Mammalian Cells', *Eur J Biochem* Vol. 269, No. 22, pp. 5360-8.
- Chauvin, C., V. Koka, A. Nouschi, V. Mieulet, C. Hoareau-Aveilla, A. Dreazen, N. Cagnard, W. Carpentier, T. Kiss, O. Meyuhas and M. Pende. (2014), 'Ribosomal Protein S6 Kinase Activity Controls the Ribosome Biogenesis Transcriptional Program', *Oncogene* Vol. 33, No. 4, pp. 474-83.
- Chen, H. I. and M. Sudol. (1995), 'The Ww Domain of Yes-Associated Protein Binds a Proline-Rich Ligand That Differs from the Consensus Established for Src Homology 3-Binding Modules', *Proc Natl Acad Sci U S A* Vol. 92, No. 17, pp. 7819-23.
- Chen, K. Y. and A. Y. Liu. (1997), 'Biochemistry and Function of Hypusine Formation on Eukaryotic Initiation Factor 5a', *Biol Signals* Vol. 6, No. 3, pp. 105-9.
- Dever, T. E. and R. Green. (2012), 'The Elongation, Termination, and Recycling Phases of Translation in Eukaryotes', *Cold Spring Harb Perspect Biol* Vol. 4, No. 7, pp. a013706.
- Dever, T. E., E. Gutierrez and B. S. Shin. (2014), 'The Hypusine-Containing Translation Factor Eif5a', *Crit Rev Biochem Mol Biol* Vol. 49, No. 5, pp. 413-25.
- Doerfel, L. K. and M. V. Rodnina. (2013), 'Elongation Factor P: Function and Effects on Bacterial Fitness', *Biopolymers* Vol. 99, No. 11, pp. 837-45.
- Doerfel, L. K., I. Wohlgemuth, C. Kothe, F. Peske, H. Urlaub and M. V. Rodnina. (2013), 'Eif-P Is Essential for Rapid Synthesis of Proteins Containing Consecutive Proline Residues', *Science* Vol. 339, No. 6115, pp. 85-8.
- Dufner, A. and G. Thomas. (1999), 'Ribosomal S6 Kinase Signaling and the Control of Translation', *Exp Cell Res* Vol. 253, No. 1, pp. 100-9.
- Eisenberg-Lerner, A., S. Bialik, H. U. Simon and A. Kimchi. (2009), 'Life and Death Partners: Apoptosis, Autophagy and the Cross-Talk between Them', *Cell Death Differ* Vol. 16, No. 7, pp. 966-75.
- Ermeikova, K. S., N. Zambrano, H. Linn, G. Minopoli, F. Gertler, T. Russo and M. Sudol. (1997), 'The Ww Domain of Neural Protein Fe65 Interacts with Proline-Rich Motifs in Mena, the Mammalian Homolog of *Drosophila* Enabled', *J Biol Chem* Vol. 272, No. 52, pp. 32869-77.
- Fenton, T. R. and I. T. Gout. (2011), 'Functions and Regulation of the 70kDa Ribosomal S6 Kinases', *Int J Biochem Cell Biol* Vol. 43, No. 1, pp. 47-59.

- Foster, K. G. and D. C. Fingar. (2010), 'Mammalian Target of Rapamycin (Mtor): Conducting the Cellular Signaling Symphony', *J Biol Chem* Vol. 285, No. 19, pp. 14071-7.
- Freund, C., R. Kühne, S. Park, K. Thiemke, E. L. Reinherz and G. Wagner. (2003), 'Structural Investigations of a Gyf Domain Covalently Linked to a Proline-Rich Peptide', *J Biomol NMR* Vol. 27, No. 2, pp. 143-9.
- Fu, L. L., T. Xie, S. Y. Zhang and B. Liu. (2014), 'Eukaryotic Elongation Factor-2 Kinase (Eef2k): A Potential Therapeutic Target in Cancer', *Apoptosis* Vol. 19, No. 10, pp. 1527-31.
- Fujimura, K., S. Choi, M. Wyse, J. Strnadel, T. Wright and R. Klemke. (2015), 'Eukaryotic Translation Initiation Factor 5a (Eif5a) Regulates Pancreatic Cancer Metastasis by Modulating Rhoa and Rho-Associated Kinase (Rock) Protein Expression Levels', *J Biol Chem*.
- Garí, E., L. Piedrafita, M. Aldea and E. Herrero. (1997), 'A Set of Vectors with a Tetracycline-Regulatable Promoter System for Modulated Gene Expression in *Saccharomyces Cerevisiae*', *Yeast* Vol. 13, No. 9, pp. 837-48.
- Good, M. C., J. G. Zalatan and W. A. Lim. (2011), 'Scaffold Proteins: Hubs for Controlling the Flow of Cellular Information', *Science* Vol. 332, No. 6030, pp. 680-6.
- Gossen, M., A. L. Bonin and H. Bujard. (1993), 'Control of Gene Activity in Higher Eukaryotic Cells by Prokaryotic Regulatory Elements', *Trends Biochem Sci* Vol. 18, No. 12, pp. 471-5.
- Gossen, M. and H. Bujard. (1992), 'Tight Control of Gene Expression in Mammalian Cells by Tetracycline-Responsive Promoters', *Proc Natl Acad Sci U S A* Vol. 89, No. 12, pp. 5547-51.
- Gout, I., T. Minami, K. Hara, Y. Tsujishita, V. Filonenko, M. D. Waterfield and K. Yonezawa. (1998), 'Molecular Cloning and Characterization of a Novel P70 S6 Kinase, P70 S6 Kinase Beta Containing a Proline-Rich Region', *J Biol Chem* Vol. 273, No. 46, pp. 30061-4.
- Gressner, A. M. and I. G. Wool. (1974), 'The Phosphorylation of Liver Ribosomal Proteins in Vivo. Evidence That Only a Single Small Subunit Protein (S6) Is Phosphorylated', *J Biol Chem* Vol. 249, No. 21, pp. 6917-25.
- Gutierrez, E., B. S. Shin, C. J. Woolstenhulme, J. R. Kim, P. Saini, A. R. Buskirk and T. E. Dever. (2013), 'Eif5a Promotes Translation of Polyproline Motifs', *Mol Cell* Vol. 51, No. 1, pp. 35-45.
- Hall, M. N. (2008), 'Mtor-What Does It Do?', *Transplant Proc* Vol. 40, No. 10 Suppl, pp. S5-8.
- Hanauske-Abel, H. M., D. Saxena, P. E. Palumbo, A. R. Hanauske, A. D. Luchessi, T. D. Cambiaghi, M. Hoque, M. Spino, D. D'Alliessi Gandolfi, D. S. Heller, S. Singh, M. H. Park, B. M. Cracchiolo, F. Tricta, J. Connelly, A. M. Popowicz, R. A. Cone, B. Holland, T. Pe'ery and M. B. Mathews. (2013), 'Drug-Induced Reactivation of Apoptosis Abrogates Hiv-1 Infection', *PLoS One* Vol. 8, No. 9, pp. e74414.
- Harding, A., T. Tian, E. Westbury, E. Frische and J. F. Hancock. (2005), 'Subcellular Localization Determines Map Kinase Signal Output', *Curr Biol* Vol. 15, No. 9, pp. 869-73.
- Hinnebusch, A. G. and J. R. Lorsch. (2012), 'The Mechanism of Eukaryotic Translation Initiation: New Insights and Challenges', *Cold Spring Harb Perspect Biol* Vol. 4, No. 10.
- Hurtado, V., I. Roncero, E. Blazquez, E. Alvarez and C. Sanz. (2013), 'Glucagon-Like Peptide-1 and Its Implications in Obesity, Hot Topics in Endocrine and Endocrine-Related Diseases', *Hot Topics in Endocrine and Endocrine-Related Diseases*.

- Jao, D. L. and K. Y. Chen. (2006), 'Tandem Affinity Purification Revealed the Hypusine-Dependent Binding of Eukaryotic Initiation Factor 5a to the Translating 80s Ribosomal Complex', *J Cell Biochem* Vol. 97, No. 3, pp. 583-98.
- Kaiser, A. (2012), 'Translational Control of Eif5a in Various Diseases', *Amino Acids* Vol. 42, No. 2-3, pp. 679-84.
- Kapp, L. D. and J. R. Lorsch. (2004), 'Gtp-Dependent Recognition of the Methionine Moiety on Initiator Trna by Translation Factor Eif2', *J Mol Biol* Vol. 335, No. 4, pp. 923-36.
- Kay, B. K., M. P. Williamson and M. Sudol. (2000), 'The Importance of Being Proline: The Interaction of Proline-Rich Motifs in Signaling Proteins with Their Cognate Domains', *FASEB J* Vol. 14, No. 2, pp. 231-41.
- Kholodenko, B. N. (2006), 'Cell-Signalling Dynamics in Time and Space', *Nat Rev Mol Cell Biol* Vol. 7, No. 3, pp. 165-76.
- Kim, D. H., D. D. Sarbassov, S. M. Ali, J. E. King, R. R. Latek, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and D. M. Sabatini. (2002), 'Mtor Interacts with Raptor to Form a Nutrient-Sensitive Complex That Signals to the Cell Growth Machinery', *Cell* Vol. 110, No. 2, pp. 163-75.
- Klier, H., R. Csonga, H. C. João, C. Eckerskorn, M. Auer, F. Lottspeich and J. Eder. (1995), 'Isolation and Structural Characterization of Different Isoforms of the Hypusine-Containing Protein Eif-5a from Hela Cells', *Biochemistry* Vol. 34, No. 45, pp. 14693-702.
- Klier, H., T. Wohl, C. Eckerskorn, V. Magdolen and F. Lottspeich. (1993), 'Determination and Mutational Analysis of the Phosphorylation Site in the Hypusine-Containing Protein Hyp2p', *FEBS Lett* Vol. 334, No. 3, pp. 360-4.
- Klier, H., T. Wöhl, C. Eckerskorn, V. Magdolen and F. Lottspeich. (1993), 'Determination and Mutational Analysis of the Phosphorylation Site in the Hypusine-Containing Protein Hyp2p', *FEBS Lett* Vol. 334, No. 3, pp. 360-4.
- Klinge, S., F. Voigts-Hoffmann, M. Leibundgut, S. Arpagaus and N. Ban. (2011), 'Crystal Structure of the Eukaryotic 60s Ribosomal Subunit in Complex with Initiation Factor 6', *Science* Vol. 334, No. 6058, pp. 941-8.
- Koh, P. O. (2013), 'Ferulic Acid Attenuates Focal Cerebral Ischemia-Induced Decreases in P70s6 Kinase and S6 Phosphorylation', *Neurosci Lett* Vol. 555, pp. 7-11.
- Kornau, H. C., L. T. Schenker, M. B. Kennedy and P. H. Seeburg. (1995), 'Domain Interaction between Nmda Receptor Subunits and the Postsynaptic Density Protein Psd-95', *Science* Vol. 269, No. 5231, pp. 1737-40.
- Kozak, M. (1981), 'Possible Role of Flanking Nucleotides in Recognition of the Aug Initiator Codon by Eukaryotic Ribosomes', *Nucleic Acids Res* Vol. 9, No. 20, pp. 5233-52.
- Kühlbrandt, W. (2015), 'Structure and Function of Mitochondrial Membrane Protein Complexes', *BMC Biol* Vol. 13, pp. 89.
- Lee-Fruman, K. K., C. J. Kuo, J. Lippincott, N. Terada and J. Blenis. (1999), 'Characterization of S6k2, a Novel Kinase Homologous to S6k1', *Oncogene* Vol. 18, No. 36, pp. 5108-14.
- Li, T., B. Belda-Palazón, A. Ferrando and P. Alepuz. (2014), 'Fertility and Polarized Cell Growth Depends on Eif5a for Translation of Polyproline-Rich Formins in *Saccharomyces Cerevisiae*', *Genetics*.
- Magnuson, B., B. Ekim and D. C. Fingar. (2012), 'Regulation and Function of Ribosomal Protein S6 Kinase (S6k) within Mtor Signalling Networks', *Biochem J* Vol. 441, No. 1, pp. 1-21.

- Mahoney, N. M., P. A. Janmey and S. C. Almo. (1997), 'Structure of the Profilin-Poly-L-Proline Complex Involved in Morphogenesis and Cytoskeletal Regulation', *Nat Struct Biol* Vol. 4, No. 11, pp. 953-60.
- Mandal, A., S. Mandal and M. H. Park. (2014), 'Genome-Wide Analyses and Functional Classification of Proline Repeat-Rich Proteins: Potential Role of Eif5a in Eukaryotic Evolution', *PLoS One* Vol. 9, No. 11, pp. e111800.
- Mi, H., A. Muruganujan, J. T. Casagrande and P. D. Thomas. (2013), 'Large-Scale Gene Function Analysis with the Panther Classification System', *Nat Protoc* Vol. 8, No. 8, pp. 1551-66.
- Morgan, A. A. and E. Rubenstein. (2013), 'Proline: The Distribution, Frequency, Positioning, and Common Functional Roles of Proline and Polyproline Sequences in the Human Proteome', *PLoS One* Vol. 8, No. 1, pp. e53785.
- Noble, J. E. and M. J. Bailey. (2009), 'Quantitation of Protein', *Methods Enzymol* Vol. 463, pp. 73-95.
- Olsen, M. E. and J. H. Connor. (2017), 'Hypusination of Eif5a as a Target for Antiviral Therapy', *DNA Cell Biol*.
- Pardo, O. E. and M. J. Seckl. (2013), 'S6k2: The Neglected S6 Kinase Family Member', *Front Oncol* Vol. 3, pp. 191.
- Park, M. H. (1989), 'The Essential Role of Hypusine in Eukaryotic Translation Initiation Factor 4d (Eif-4d). Purification of Eif-4d and Its Precursors and Comparison of Their Activities', *J Biol Chem* Vol. 264, No. 31, pp. 18531-5.
- Park, M. H., Y. B. Lee and Y. A. Joe. (1997), 'Hypusine Is Essential for Eukaryotic Cell Proliferation', *Biol Signals* Vol. 6, No. 3, pp. 115-23.
- Park, M. H., E. C. Wolff and J. E. Folk. (1993), 'Hypusine: Its Post-Translational Formation in Eukaryotic Initiation Factor 5a and Its Potential Role in Cellular Regulation', *Biofactors* Vol. 4, No. 2, pp. 95-104.
- Pavan, I. C., S. Yokoo, D. C. Granato, L. Meneguello, C. M. Carnielli, M. R. Tavares, C. L. do Amaral, L. B. de Freitas, A. F. Paes Leme, A. D. Luchessi and F. M. Simabuco. (2016), 'Different Interactomes for P70-S6k1 and P54-S6k2 Revealed by Proteomic Analysis', *Proteomics*.
- Peil, L., A. L. Starosta, J. Lassak, G. C. Atkinson, K. Virumäe, M. Spitzer, T. Tenson, K. Jung, J. Remme and D. N. Wilson. (2013), 'Distinct Xppx Sequence Motifs Induce Ribosome Stalling, Which Is Rescued by the Translation Elongation Factor Ef-P', *Proc Natl Acad Sci U S A* Vol. 110, No. 38, pp. 15265-70.
- Pellicena, P. and W. T. Miller. (2001), 'Processive Phosphorylation of P130cas by Src Depends on Sh3-Polyproline Interactions', *J Biol Chem* Vol. 276, No. 30, pp. 28190-6.
- Pende, M., S. H. Um, V. Mieulet, M. Sticker, V. L. Goss, J. Mestan, M. Mueller, S. Fumagalli, S. C. Kozma and G. Thomas. (2004), 'S6k1(-)/S6k2(-) Mice Exhibit Perinatal Lethality and Rapamycin-Sensitive 5'-Terminal Oligopyrimidine Mrna Translation and Reveal a Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent S6 Kinase Pathway', *Mol Cell Biol* Vol. 24, No. 8, pp. 3112-24.
- Pereira, K. D., L. Tamborlin, L. Meneguello, A. R. de Proença, I. C. Almeida, R. F. Lourenço and A. D. Luchessi. (2016), 'Alternative Start Codon Connects Eif5a to Mitochondria', *J Cell Physiol* Vol. 231, No. 12, pp. 2682-9.
- Pestova, T. V., I. B. Lomakin, J. H. Lee, S. K. Choi, T. E. Dever and C. U. Hellen. (2000), 'The Joining of Ribosomal Subunits in Eukaryotes Requires Eif5b', *Nature* Vol. 403, No. 6767, pp. 332-5.

- Pestova, T. V., J. R. Lorsch and C. U. T. Hellen. (2007), 'The Mechanism of Translation Initiation in Eukaryotes', In S. N. Mathews M., Hershey JWB. (Ed.), *Translational Control in Biology and Medicine*, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Pfaffl, M. W., G. W. Horgan and L. Dempfle. (2002), 'Relative Expression Software Tool (Rest) for Group-Wise Comparison and Statistical Analysis of Relative Expression Results in Real-Time Pcr', *Nucleic Acids Res* Vol. 30, No. 9, pp. e36.
- Phin, S., D. Kupferwasser, J. Lam and K. K. Lee-Fruman. (2003), 'Mutational Analysis of Ribosomal S6 Kinase 2 Shows Differential Regulation of Its Kinase Activity from That of Ribosomal S6 Kinase 1', *Biochem J* Vol. 373, No. Pt 2, pp. 583-91.
- Price, D. J., N. K. Mukhopadhyay and J. Avruch. (1991), 'Insulin-Activated Protein Kinases Phosphorylate a Pseudosubstrate Synthetic Peptide Inhibitor of the P70 S6 Kinase', *J Biol Chem* Vol. 266, No. 25, pp. 16281-4.
- Qin, Z. H., Y. Wang, E. Sapp, B. Cuiffo, E. Wanker, M. R. Hayden, K. B. Kegel, N. Aronin and M. DiFiglia. (2004), 'Huntingtin Bodies Sequester Vesicle-Associated Proteins by a Polyproline-Dependent Interaction', *J Neurosci* Vol. 24, No. 1, pp. 269-81.
- Rodnina, M. V. and W. Wintermeyer. (2009), 'Recent Mechanistic Insights into Eukaryotic Ribosomes', *Curr Opin Cell Biol* Vol. 21, No. 3, pp. 435-43.
- Rosorius, O., B. Reichart, F. Krätzer, P. Heger, M. C. Dabauvalle and J. Hauber. (1999), 'Nuclear Pore Localization and Nucleocytoplasmic Transport of Eif-5a: Evidence for Direct Interaction with the Export Receptor Crm1', *J Cell Sci* Vol. 112 (Pt 14), pp. 2369-80.
- Rossi, D., R. Kuroshu, C. F. Zanelli and S. R. Valentini. (2014), 'Eif5a and Ef-P: Two Unique Translation Factors Are Now Traveling the Same Road', *Wiley Interdiscip Rev RNA* Vol. 5, No. 2, pp. 209-22.
- Ruhl, M., M. Himmelspach, G. M. Bahr, F. Hammerschmid, H. Jaksche, B. Wolff, H. Aschauer, G. K. Farrington, H. Probst and D. Bevec. (1993), 'Eukaryotic Initiation Factor 5a Is a Cellular Target of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Rev Activation Domain Mediating Trans-Activation', *J Cell Biol* Vol. 123, No. 6 Pt 1, pp. 1309-20.
- Ryazanov, A. G. (2002), 'Elongation Factor-2 Kinase and Its Newly Discovered Relatives', *FEBS Lett* Vol. 514, No. 1, pp. 26-9.
- Saha, I. and N. Shamala. (2012), 'Investigating Diproline Segments in Proteins: Occurrences, Conformation and Classification', *Biopolymers* Vol. 97, No. 1, pp. 54-64.
- Sasarman, F., C. Brunel-Guitton, H. Antonicka, T. Wai, E. A. Shoubridge and L. Consortium. (2010), 'Lrpprc and Slirp Interact in a Ribonucleoprotein Complex That Regulates Posttranscriptional Gene Expression in Mitochondria', *Mol Biol Cell* Vol. 21, No. 8, pp. 1315-23.
- Schnier, J., H. G. Schwelberger, Z. Smit-McBride, H. A. Kang and J. W. Hershey. (1991), 'Translation Initiation Factor 5a and Its Hypusine Modification Are Essential for Cell Viability in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*', *Mol Cell Biol* Vol. 11, No. 6, pp. 3105-14.
- Schrader, R., C. Young, D. Kozian, R. Hoffmann and F. Lottspeich. (2006), 'Temperature-Sensitive Eif5a Mutant Accumulates Transcripts Targeted to the Nonsense-Mediated Decay Pathway', *J Biol Chem* Vol. 281, No. 46, pp. 35336-46.
- Shaw, A. S. and E. L. Filbert. (2009), 'Scaffold Proteins and Immune-Cell Signalling', *Nat Rev Immunol* Vol. 9, No. 1, pp. 47-56.

- Smit-McBride, Z., J. Schnier, R. J. Kaufman and J. W. Hershey. (1989), 'Protein Synthesis Initiation Factor Eif-4d. Functional Comparison of Native and Unhyphusinated Forms of the Protein', *J Biol Chem* Vol. 264, No. 31, pp. 18527-30.
- Sridharan, S. and A. Basu. (2011), 'S6 Kinase 2 Promotes Breast Cancer Cell Survival Via Akt', *Cancer Res* Vol. 71, No. 7, pp. 2590-9.
- Szklarczyk, D., A. Franceschini, S. Wyder, K. Forslund, D. Heller, J. Huerta-Cepas, M. Simonovic, A. Roth, A. Santos, K. P. Tsafou, M. Kuhn, P. Bork, L. J. Jensen and C. von Mering. (2015), 'String V10: Protein-Protein Interaction Networks, Integrated over the Tree of Life', *Nucleic Acids Res* Vol. 43, No. Database issue, pp. D447-52.
- Tarun, S. Z. and A. B. Sachs. (1996), 'Association of the Yeast Poly(a) Tail Binding Protein with Translation Initiation Factor Eif-4g', *EMBO J* Vol. 15, No. 24, pp. 7168-77.
- Ude, S., J. Lassak, A. L. Starosta, T. Kraxenberger, D. N. Wilson and K. Jung. (2013), 'Translation Elongation Factor Ef-P Alleviates Ribosome Stalling at Polyproline Stretches', *Science* Vol. 339, No. 6115, pp. 82-5.
- Wakiyama, M., H. Imataka and N. Sonenberg. (2000), 'Interaction of Eif4g with Poly(a)-Binding Protein Stimulates Translation and Is Critical for *Xenopus* Oocyte Maturation', *Curr Biol* Vol. 10, No. 18, pp. 1147-50.
- Wang, M. L., G. Panasyuk, J. Gwalter, I. Nemazanyy, T. Fenton, V. Filonenko and I. Gout. (2008), 'Regulation of Ribosomal Protein S6 Kinases by Ubiquitination', *Biochem Biophys Res Commun* Vol. 369, No. 2, pp. 382-7.
- Wang, X., W. Li, M. Williams, N. Terada, D. R. Alessi and C. G. Proud. (2001), 'Regulation of Elongation Factor 2 Kinase by P90(Rsk1) and P70 S6 Kinase', *EMBO J* Vol. 20, No. 16, pp. 4370-9.
- Williamson, M. P. (1994), 'The Structure and Function of Proline-Rich Regions in Proteins', *Biochem J* Vol. 297 (Pt 2), pp. 249-60.
- Woolstenhulme, C. J., S. Parajuli, D. W. Healey, D. P. Valverde, E. N. Petersen, A. L. Starosta, N. R. Guydosh, W. E. Johnson, D. N. Wilson and A. R. Buskirk. (2013), 'Nascent Peptides That Block Protein Synthesis in Bacteria', *Proc Natl Acad Sci U S A* Vol. 110, No. 10, pp. E878-87.
- Yu, H., J. K. Chen, S. Feng, D. C. Dalgarno, A. W. Brauer and S. L. Schreiber. (1994), 'Structural Basis for the Binding of Proline-Rich Peptides to Sh3 Domains', *Cell* Vol. 76, No. 5, pp. 933-45.
- Zanelli, C. F., A. L. Maragno, A. P. Gregio, S. Komili, J. R. Pandolfi, C. A. Mestriner, W. R. Lustri and S. R. Valentini. (2006), 'Eif5a Binds to Translational Machinery Components and Affects Translation in Yeast', *Biochem Biophys Res Commun* Vol. 348, No. 4, pp. 1358-66.

ANEXO 1 - Proteínas identificadas pelo espectrômetro de massas e as quantidades de peptídeos identificados

Protein Name	Gene Symbol	GFP	S6K2	S6K2ΔPro
Nucleolin	NCL	0	16	11
Nucleophosmin isoform 2	NPM1	0	7	3
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	HNRPU	0	12	4
Ribosomal protein L4	RPL4	0	10	4
Zinc finger CCCH-type antiviral protein 1	ZC3HAV1	0	8	3
Ribosomal protein S6 kinase beta-2	RPS6K2B2	0	12	6
Ribosomal protein L7a	RPL7A	0	8	5
Ribosomal protein S6	RPS6	0	5	4
Heat shock 60kDa protein 1 (Chaperonin)	HSPD1	0	6	1
Ribosomal protein S8	RPS8	0	8	5
Splicing factor, arginine/serine-rich 2	SFRS2	0	4	2
Polyadenylate-binding protein	PABPC1	0	8	5
Annexin	ANXA2	0	5	5
Ribosomal protein L6	RPL6	0	5	4
Ribosomal protein S3a	RPS3A	0	8	2
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	HNRPK	0	8	4
Ribosomal protein L3	RPL3	0	4	2
Ribosomal protein L18	RPL18	0	5	4
Ribosomal protein L12	RPL12	0	7	3
Kinesin-like protein	KIF11	0	5	2
Ribosomal protein L9	RPL9	0	5	2
Ribosomal protein, large, P1	RPLP1	0	4	0
ATP-dependent RNA helicase DDX3Y	DDX3Y	0	6	6
Ribosomal protein L14	RPL14	0	10	6
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	DDX5	0	5	5

ATP-dependent RNA helicase A	DHX9	0	4	0
Ribosomal protein L10	RPL10	0	4	5
Ribosomal protein L13	RPL13	0	5	4
Ribosomal protein L27a	RPL27A	0	4	0
Ribosomal protein L21	RPL21	0	2	1
Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3	EIF2S3	0	4	2
Ribosomal protein L10a	RPL10A	0	6	1
Ribosomal protein P0	RPLP0	0	4	3
DNA replication licensing factor MCM5	MCM5	0	4	2
Ribosomal protein S23	RPS23	0	2	1
Ribosomal protein S24	RPS24	0	5	2
Ribosomal protein S27	RPS27L	0	4	0
RNA binding motif protein 10	RBM10	0	2	1
Ribosomal protein L30	RPL30	0	3	2
Aspartate beta-hydroxylase	ASPH	0	3	1
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	HNRPF	0	2	1
Ribosomal protein L19	RPL19	0	3	2
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	ATP5A1	0	2	0
Heat shock protein HSP 90-alpha	HSP90AA1	0	3	1
Ribosomal protein S27A	RPS27A	0	4	2
Ribosomal protein S3	RPS3	0	6	3
Ribosomal protein S14	RPS14	0	5	3
Protein phosphatase 2C isoform beta	PPM1B	0	4	0
Ribosomal protein S2	RPS2	0	5	1
Histone 1.4	HIST1H1E	0	4	1
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1-like	HNRNPA1L	0	2	0
Ribosomal protein L23	RPL23	0	2	4
Ribosomal protein L18a	RPL18A	0	2	2
Zinc finger protein 90	ZNF90	0	3	2

Non-POU domain containing octamer-binding isoform1	NONO	0	3	2
Ribosomal protein L24	RPL24	0	3	3
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	HNRPR	0	2	0
Putative RNA-binding protein Luc7-like 2	LUC7L2	0	1	0
Ribosomal protein L8	RPL8	0	3	1
Ribosome-binding protein 1	RRBP1	0	4	0
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D	HNRNPD	0	4	1
Nucleolar protein 16	NOP16	0	2	0
Leucine-rich PPR motif-containing protein	LRPPRC	0	1	0
Ribosomal protein S11	RPS11	0	3	1
Protein arginine N-methyltransferase 5	PRMT5	0	3	4
Ribosomal protein S5	RPS5	0	1	1
Filamin-A	FLNA	0	3	0
Heat shock protein 90kDa alpha	HSP90AB1	0	3	1
Synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein	SYNCRIP	0	3	0
Plasminogen activator inhibitor 1	PAI-1	0	3	0
SCY1-like protein 2	SCYL2	0	2	0
Ribosomal protein L11	RPL11	0	3	3
RNA-binding protein 39	RBM39	0	2	0
Ribosomal protein S19	RPS19	0	2	1
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	HNRNPL	0	2	0
WD repeat domain 77	WDR77	0	2	4
Ribosomal protein L22	RPL22	0	2	1
Ribosomal protein S17	RPS17	0	2	0
Stress-70 protein, mitochondrial	HSPA9	0	3	0
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	HNRNPH1	0	2	1
Signal recognition particle 14 kDa protein	SRP14	0	1	1
Ribosomal protein L35	RPL35	0	2	0
Ribosomal protein L7	RPL7	0	2	2

Caprin-1	CAPRIN1	0	2	0
Enhancer of rudimentary homolog	ERH	0	1	0
Ribosomal protein L37a	RPL37A	0	1	0
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	HNRNPM	0	2	0
tRNA (cytosine(34)-C(5))-methyltransferase	NSUN2	0	1	1
MRPS9 protein	MRPS9	0	1	0
Ribosomal protein S15	RPS15	0	1	1
Nucleolar RNA helicase 2	DDX21	0	3	3
Ras GTPase-activating protein-binding protein 1	G3BP	0	2	1
Nuclease-sensitive element-binding protein 1	YBX1	0	2	2
Eukaryotic translation initiation factor 4B	EIF4B	0	2	0
Ribosomal protein S29	RPS29	0	2	0
G patch domain-containing protein 4	GPATCH4	0	1	0
Ribosomal protein S12	RPS12	0	1	2
Ribosomal protein L27	RPL27	0	3	1
Ribosomal protein L31	RPL31	0	1	2
Interleukin enhancer-binding factor 2	ILF2	0	2	0
Ribosomal protein S7	RPS7	0	2	0
THO complex subunit 4	ALYREF	0	1	1
Calmodulin-like protein 5	CALML5	0	1	1
Methionine adenosyltransferase II, alpha	MAT2A	0	1	0
Serine/arginine-rich splicing factor 11	SFRS11	0	1	0
2'-5'-oligoadenylate synthase-like protein	OASL	0	1	1
Ribosomal protein S4	RPS4X	0	2	3
ADP-ribosylation factor-like 6 interacting protein 1	ARL6IP1	0	2	0
Fatty acid synthase	FASN	0	1	0
Ribosomal protein L32	RPL32	0	2	1
Elongation factor Tu, mitochondrial	TUFM	0	1	0
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 10	USP10	0	1	0

Ribosomal protein S25	RPS25	0	1	1
Prohibitin protein	PHB	0	1	0
Ribosomal protein L36	RPL36	0	2	1
Beta-actin	ACTB	0	1	1
Calmodulin	CALM1	0	1	0
Double-stranded RNA-activated protein kinase protein	PKR	0	1	0
Brain acid soluble protein 1	BASP1	0	1	0
Ribosomal protein S9	RPS9	0	2	3
GTP-binding nuclear protein Ran	RAN	0	2	0
Similar to signal recognition particle 9kD	SRP9	0	1	1
Treacle protein 1	TCOF1	0	1	0
Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein N	SNRPN	0	1	0
Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3	IGF2BP3	0	1	0
Ribosomal protein S13	RPS13	0	2	2
Ribosomal protein S26	RPS26	0	2	1
Interleukin enhancer binding factor 3	ILF3	0	1	1
Spindlin	SPIN	0	1	0
Probable rRNA-processing protein EBP2	EBNA1BP2	0	1	1
Ribosomal protein L38	RPL38	0	1	0
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	HNRPA2B1	0	1	0
ATP-dependent RNA helicase DDX1	DDX1	0	1	0
Ribosomal protein S18	RPS18	0	2	1
Ribosomal protein SA	RPSA	0	1	1
Ribosomal protein L13a	RPL13A	0	1	2
Probable peptidyl-tRNA hydrolase	PTRH1	0	1	0
Pentatricopeptide repeat domain-containing protein 3	PTCD3	0	1	0
tRNA methyltransferase 11-2 homolog	TRMT112	0	1	0

Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	ATP2A2	0	1	0
ELAV-like protein 1	ELAVL1	0	1	0
Elongation factor 2	EEF2	0	1	0
Elongation factor 1-delta	EEF1D	0	1	0
G-rich RNA sequence binding factor 1	GRSF1	0	1	0
Microtubule-associated protein	MAP4	0	1	0
Splicing factor, arginine/serine-rich 5	SFRS5	0	1	0
Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1	FXR1	0	1	0
Developmentally-regulated GTP-binding protein 1	DRG1	0	1	1
Immunoglobulin kappa variable 2D-28	IGKV2D-28	0	1	0
Ribosomal protein L15	RPL15	0	1	1
Nascent polypeptide-associated complex alpha subunit 2	NACA	0	1	0
Serine/arginine-rich-splicing factor 3	SRSF3	0	1	0
Receptor of-activated protein C kinase 1	RACK1/GNB2L1	0	1	0
Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1	RPN1	0	1	0
Replication factor C 2 isoform 1	RFC2	0	1	0
Histone H1.5	HIST1H1B	0	1	0
Complement C2	C2	0	1	0
2'-5'-oligoadenylate synthetase 3	OAS3	0	1	0
ATP synthase gamma chain, mitochondrial	ATP5C1	0	1	0
Leucine-rich repeat-containing protein 59	LRRC59	0	1	1
Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase	DHX15	0	1	0
Heat shock 105kDa/110kDa protein 1	HSPH1	0	1	1
Eukaryotic initiation factor 4A-I	EIF4A	0	1	1
ATP synthase subunit O, mitochondrial	ATP5O	0	1	0
Mitochondrial ribosomal protein S27	MRPS27	0	1	0

Ribosomal protein L17	RPL17	0	1	0
Probable ATP-dependent RNA helicase	DDX17	0	0	4
Polymerase I and transcript release factor	PTRF	0	0	1
Heat shock 70kDa protein 1-like	HSPA1L	0	0	2
59 kDa 2'-5'-oligoadenylate synthetase-like protein	THYRO	0	0	1
DNA replication licensing factor MCM3	MCM3	0	0	1
Chromosome 11 open reading frame 48	C11orf98	0	0	1
Putative eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3-like protein	EIF2S3L	0	0	1
Ribosomal protein L28	RPL28	0	0	1
Ras GTPase-activating protein-binding protein 1	G3BP1	0	0	1
Uncharacterized protein C7orf50	C7orf50	0	0	1
Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5	NUDT21	0	0	1
Mitochondrial ribosomal protein S28 isoform 1	MRPS28	0	0	1
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	PPIB	0	0	1
Ribose-phosphate pyrophosphokinase 3	PRPS1L1	0	0	1
Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1	IGF2BP1	0	0	1
Chromosome 1 open reading frame 33	C1orf33	0	0	1
Epididymis secretory protein Li 85	PCBP1	0	1	1

ANEXO 2 - Produções bibliográficas

Artigos publicados

- Pavan I.C, Yokoo S, Granato D.C, **Meneguello L**, Carnielli C.M, Tavares M.R, do Amaral C.L, de Freitas L.B, Leme A.F, Luchessi A.D., Simabuco F.M. **Different interactomes for p70-S6K1 and p54-S6K2 revealed by proteomic analysis.** Proteomics. 2016. DOI: 10.1002/pmic.201500249
- Pereira, K.D.; Tamborlin, L.; **Meneguello, L.**; De Proença, A.R.G.; Almeida, I. C. de P.A.; Lourenço, R.F.; Luchessi, A.D. **Alternative Start Codon Connects eIF5A to Mitochondria.** Journal of Cellular Physiology (Print), 2016.DOI:10.1002/jcp.25370
- Tavares, M.R.; Pavan, I.C.B.; Amaral, C.L.; **Meneguello, L.**; Luchessi, A.D.; Simabuco, F.M. **The S6Kprotein family in health and disease.** Life Sciences , 2015. DOI: 10.1016/j.lfs.2015.03.001

Resumos publicados em anais de congressos

- Pereira, K.D.; Cambiaghi, T.D.; Tamborlin, L.; **Meneguello, L.**; de Proença, A.R.G.; Luchessi, A.D. **The compound FCA/X-PEI enhances DNA transfer into mammalian cells using polyethyleneimine (PEI).** 2017. NANOMAT 2017, Brotas-SP.
- Pereira, K.D; Tamborlin, L.; **Meneguello, L.**; de Proença, A.R.G.; Almeida, I.C.P.A; Lourenço, R. F.; Luchessi, A.D. **Alternative start codon connects eIF5A to mitochondria.** In: 12th International Congress of Cell Biology, 2016, Prague. 12th International Congress of Cell Biology, 2016.
- **Meneguello, L.**; Pereira, K. D.; Tamborlin, L.; de Proença, A. R.G.; Simabuco, F.M.; LUCHESSI, A.D. **Evaluation of Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A (EIF5A) in the translation of S6Ks proteins.** 2016. 45° SBBQ, Natal-RN.
- Freitas, R.C.C.; Bortolin, R.H.; Tamborlin, L.; **Meneguello, L.**; Pereira, K.D.; Silbiger, V.N.; Luchessi, A.D.; LUCHESSI, A.D. **Clopidogrel Toxicity Measuring by Flow cytometry: A pilot study in HepG2 cell line.** 2016. 45° SBBQ, Natal-RN.
- de Proença, A.R.G.; Pereira, K.D.; **Meneguello, L.**; Tamborlin, L.; Luchessi, A.D. **Insulin action on protein synthesis and its association to eIF5A expression and hypusination.** 2016. ASCB 2016 Meeting - American Society for Cell Biology. San Francisco-USA

Prêmios

- Prêmio *SBBq Award* para melhor apresentação de pôster durante a 45^o Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular para o pôster:

MENEGUELLO, L.; PEREIRA, K.D.; TAMBORLIN, L.; de PROENÇA, A.R.G.; SIMABUCO, F.M.; LUCHESSI, A.D. **Evaluation of Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A (EIF5A) in the translation of S6Ks proteins.** 2016.

Figura 23 - Certificado da premiação *SBBQ Award* 2016.

