

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 22/05/2019.

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

Programa de pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

LUIS CAMACHO IGLESIAS

**Estudo dos efeitos celulares do inibidor de
hipusinação GC7 utilizando coleções de mutantes de
*Saccharomyces cerevisiae***

Araraquara, SP

2018

LUIS CAMACHO IGLESIAS

**Estudo dos efeitos celulares do inibidor de
hipusinação GC7 utilizando coleções de mutantes de
*Saccharomyces cerevisiae***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli

Coorientador: Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini

Araraquara, SP

2018

Ficha Catalográfica

Elaborada por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

- C172e** Camacho Iglesias, Luis.
Estudo dos efeitos celulares do inibidor de hipusinação GC7 utilizando coleções de mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* / Luis Camacho Iglesias. – Araraquara, 2018.
124 f. : il.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós Graduação em Biociências e
Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de Concentração: Biologia Molecular.
- Orientador: Cleslei Fernando Zanelli.
Coorientador: Sandro Roberto Valentini.
1. *Saccharomyces cerevisiae*. 2. eIF5A. 3. Desoxi-hipusina sintase. 4. Rastreamento.
5. GC7. I. Zanelli, Cleslei Fernando, orient. II. Valentini, Sandro Roberto, coorient. III. Título.

CAPES: 40300005

LUIS CAMACHO IGLESIAS

Estudo dos efeitos celulares do inibidor de hipusinação GC7 utilizando coleções de mutantes de
Saccharomyces cerevisiae

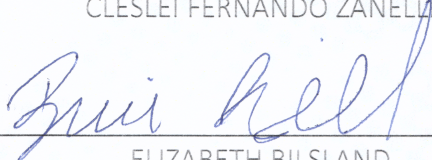
Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Araraquara como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia

Araraquara, 22 de maio de 2018.

BANCA EXAMINADORA



CLESLEI FERNANDO ZANELLI



ELIZABETH BILSLAND



MARIA CÉLIA BERTOLINI

Agradecimentos:

Ao meu Pai Luis, pelo traspasso da paixão e curiosidade no estudo dos mecanismos e processos que fazem possível a vida, assim como por ter me ensinado o realmente importante no percurso da mesma. Obrigado por ser um exemplo a seguir.

Ao meu amor e companheira de viagem Aura, pelo amor, apoio incondicional e paciência recebido durante o desenvolvimento deste trabalho.

À minha mãe Rosário e minha irmã Lucia, pelo carinho e apoio recebido durante a execução deste trabalho, ainda que na distância.

Aos meus amigos e irmãos da Espanha, especialmente, Ana, Pablo, Javi, Angel, Alberto, Gonzalo e Bonaque, por me mostrar que a distância não importa quando a amizade é verdadeira.

Ao Professor Cleslei, pela oportunidade, orientação, apoio, compreensão e aplicação na evolução e desenvolvimento deste trabalho, assim como pela amizade forjada no transcurso do mesmo.

À minha aluna de IC Leticia, pela indubitável e importante contribuição neste trabalho, assim como por ter potenciado minhas capacidades comunicativas e aprendizado.

Ao Professor Sandro, por ter possibilitado junto com meu amigo Pablo meu primeiro contato com a ciência, assim como pela coorientação e apoio no decorrer deste trabalho.

Ao Doutor Agustín, pela colaboração, que permitiu aumentar o impacto deste trabalho, assim como meu processo de aprendizado.

Às Professoras Elizabeth e Maria Celia, por terem formado parte das minhas bancas de qualificação e defesa, aportando sugestões e correções, que sem dúvida, foram chave no desenvolvimento deste trabalho.

A BIOMOL em sua totalidade, por ter me acolhido desde minha chegada ao Brasil, fomentando minha aprendizagem na língua portuguesa, assim como minhas habilidades técnicas e profissionais no laboratório e fora dele através da elaboração de café brasileiro de garrafa de alta qualidade. Especialmente, a Leticia, Mari e Keylla, pelo envolvimento direto com este trabalho, a Oliveira pela amizade e apoio pessoal diário e a Angélica pela ajuda e orientação com os WB.

Aos Professores e funcionários da pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, especialmente à Claudia pela compreensão, orientação e ajuda nos assuntos administrativos deste trabalho.

À agência de fomento CNPq, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento e realização deste trabalho.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pelo apoio institucional para o desenvolvimento deste trabalho.

“La sociedad es poco mas que el producto de unos genes”

Steve Jones

RESUMO

eIF5A é um fator de tradução envolvido com vários processos celulares, como o controle da proliferação celular e inflamação. Esse fator sofre uma modificação pós-traducional totalmente conservada e específica para sua ativação. Essa modificação é chamada de hipusinação e consiste na modificação de uma lisina específica em duas etapas: primeiro, a porção aminobutil da poliamina espermidina é transferida para o grupamento amino da cadeia lateral da lisina, pela ação da enzima desoxi-hipusina sintase; e, em seguida, o radical transferido sofre uma hidroxilação na posição beta, pela ação da desoxi-hipusina hidroxilase. Assim como eIF5A, desoxi-hipusina sintase é altamente conservada em arquea e eucariotos e é essencial em *Saccharomyces cerevisiae*. A desoxi-hipusina sintase é inibida por N1-Guanyl-1,7-diaminoheptane (GC7), um análogo estrutural da espermidina. No entanto, estudos mais recentes demonstraram que o composto GC7 apresenta efeitos celulares independentes de eIF5A, o que demonstra que este possui outros alvos. Além disso, não é conhecido como se dá o processo de transporte do GC7 para o meio intracelular ou se existem mecanismos de compartimentalização celular ou externalização do GC7. Por fim, também não são conhecidos mecanismos de metabolização celular do GC7. Desta forma, o presente projeto teve como objetivo a busca de novos alvos celulares para o composto GC7 utilizando rastreamento químico-genético utilizando a coleção haploide de genes nocautes de *S. cerevisiae* (genes não essenciais). A partir do rastreamento, foram obtidos resultados de sensibilidade ao GC7 para 96 linhagens nocautes e de resistência para 107. As principais vias afetadas por GC7 estão relacionadas ao transporte e biossíntese de aminoácidos e poliaminas, acidificação vacuolar e ribofagia. Além da identificação destes, foram testados outros nocautes relacionados e foram identificados prováveis transportadores de GC7 para fora do citoplasma. Também foi verificado que GC7 reduz os níveis de putrescina, assim como em cultura de células de mamífero, e outros resultados deste trabalho também estão de acordo com um efeito de GC7 de impacto relevante nesta via de poliaminas. Um dos resultados mais importantes deste trabalho foi a resistência de mutantes de ribofagia a GC7, efeito este que se mostrou independente de eIF5A. Por fim, demonstramos que *S. cerevisiae*, no *background* genético da coleção de nocautes, é altamente resistente a GC7 e que os efeitos de GC7 na célula não podem ser revertidos pela adição exógena de espermidina, seu análogo estrutural.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*. eIF5A. Desoxi-hipusina sintase. Rastreamento. GC7.

ABSTRACT

eIF5A is a translation factor involved in several cellular processes, as cellular proliferation control and inflammation. This factor undergoes a very conserved and specific posttranslational modification necessary to its activation named hypusination, which consists in the modification of a specific lysine in two steps. First, deoxyhypusine synthase enzyme, transfers 4-aminobutyl moiety from polyamine spermidine to a specific lysine residue in eIF5A precursor; immediately, deoxyhypusine hydroxylase adds a hydroxyl moiety in eIF5A intermediate to generate eIF5A hypusinated. Both, eIF5A and deoxyhypusine synthase are highly conserved from archaea to eukaryotes and are essential in *Saccharomyces cerevisiae*. Deoxyhypusine synthase is inhibited by N1-Guanyl-1,7-diaminoheptane (GC7), a structural analogue of spermidine. Nevertheless, recent findings have demonstrated that GC7 shows independent cellular effects of eIF5A, pointing out that GC7 has other targets. Besides, it is not known how GC7 is transported into the cell or if there are mechanisms of cellular compartmentalization or externalization of GC7. At last, mechanisms in order to metabolize the compound GC7 are not known. Therefore, the present project aimed to find new cellular targets for the GC7 compound using chemo-genetic screening and the haploid collection of knockouts in *S. cerevisiae* (nonessential genes). From the screening, GC7 sensitivity results were obtained for 96 knockout strains and 107 knockout strains showed resistance. The main pathways affected by GC7 are related to the transport and biosynthesis of amino acids and polyamines, vacuolar acidification and ribophagy. In addition to identifying these, other related knockout strains were tested and probable GC7 transporters to outside the cytoplasm were identified. It has also been found that GC7 reduces the levels of putrescine as well as in mammalian cell culture, and other results of this work also agree with a relevant impact of GC7 in this polyamine pathway. One of the most important results of this work was the resistance of ribophagy mutants to GC7, which was shown to be independent of eIF5A. Finally, we demonstrate that *S. cerevisiae*, in the genetic background of the knockout collection, is highly resistant to GC7 and that the effects of GC7 on the cell can not be reversed by the exogenous addition of spermidine, its structural analogue.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*. eIF5A. Deoxyhypusine synthase. Screening. GC7.

Lista de Figuras

Figura 1. Via da biossíntese do resíduo de aminoácido hipusina no precursor de eIF5A.....	18
Figura 2. Via de biossíntese e degradação de poliaminas em <i>S. cerevisiae</i>	20
Figura 3. Possíveis processos a identificar mediante rastreamento quimio-genético em <i>S. cerevisiae</i>	22
Figura 4. Avaliação visual e quantitativa do crescimento diferencial de mutantes nocautes frente ao GC7.....	29
Figura 5. Curva de crescimento da linhagem WT (Δ <i>ura10</i>).....	34
Figura 6. Efeito do GC7 no crescimento celular do selvagem (WT) e de mutantes de eIF5A (<i>hyp2-3</i>), <i>Dys1</i> (<i>dys1-1</i>) e <i>Lia1</i> (Δ <i>lia1</i>) e sobre a hipusinação.....	42
Figura 7. Efeito do GC7 1 mM no crescimento celular do selvagem utilizado como borda das placas do rastreamento quimio-genético.....	43
Figura 8. Interações quimio-genéticas encontradas para o composto GC7 e interações genéticas descritas para a via de hipusinação em <i>S. cerevisiae</i>	44
Figura 9. Efeito do GC7 no crescimento celular de mutantes da via de síntese de poliaminas.....	47
Figura 10. Quantificação relativa de poliaminas intracelulares das linhagens selecionadas e efeito do GC7 nos níveis intracelulares de poliaminas no selvagem....	48
Figura 11. Efeito do GC7 no crescimento celular de nocautes de mutantes <i>downstream</i> e <i>upstream</i> da via de síntese de poliaminas.....	51
Figura 12. Efeito do GC7 no crescimento celular de nocautes de mutantes relacionados à biossíntese e transporte de pantotenato.....	52
Figura 13. Efeito do GC7 no crescimento celular das linhagens relacionadas a <i>Trk1</i>	53
Figura 14. Efeito do GC7 no crescimento celular de linhagens relacionadas a transporte transmembrana.....	58
Figura 15. Efeito do GC7 no crescimento celular das linhagens relacionadas a transportadores MDR (<i>multidrug resistance</i>) do tipo <i>Plasma membrane ATP- binding cassette</i> (ABC).....	59
Figura 16. Efeito do GC7 no crescimento celular das linhagens relacionadas a ribofagia.....	61

Figura 17. Efeito do GC7 1 mM na macroautofagia através da atividade enzimática fosfatase alcalina (ALP) de Pho8 Δ N60.....	63
Figura 18. Efeito do GC7 sobre a clivagem de GFP-Atg8.....	64
Figura 19. Interações genéticas de $\Delta bre5$ e $\Delta ubp3$ com <i>hyp2-3</i> e níveis de eIF5A em $\Delta bre5$ e $\Delta ubp3$	65
Figura 20. Ensaio de competição GC7-espermidina.....	69
Figura 21. Diagrama dos efeitos celulares identificados para o inibidor de hipusinação GC7 em relação à coleção de nocautes em <i>S. cerevisiae</i>	82

Lista de Tabelas

Tabela 1. Linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas neste trabalho..... **24**

Tabela 2. Linhagens encontradas sensíveis ou resistentes ao GC7 a traves do rastreamento quimio-genético e ensaios confirmatórios..... **70**

Lista de Abreviaturas

<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
eIF5A.....	eukaryotic initiation factor 5A
GC7.....	<i>N1-Guanyl-1,7-diaminoheptane</i>
μ M.....	micromolar
mM.....	milimolar
M.....	molar
μ L.....	microlitro
min.....	minutos
h.....	horas
mm.....	milímetros
GO.....	<i>genetic ontology</i>
$^{\circ}$ C.....	graus Celcius
SPD.....	espermidina
WT.....	<i>wild type</i>
UV.....	ultravioleta
xg.....	unidade de força centrifuga
SC.....	<i>synthetic complete</i>
DO _{600nm}	densidade ótica em 600 nanómetros
DNA.....	ácido desoxirribonucléico
RNA.....	ácido ribonucleico
RNAi.....	ácido ribonucleico de interferencia
DTT.....	ditiotreitól
EDTA.....	ácido etilenodiaminotetracético

g..... grama

mg..... miligrama

kb..... quilobase

kDa..... quilodalton

SC..... meio sintético completo para levedura

SDS..... dodecil sulfato de sódio

ssDNA..... DNA de esperma de salmão

S-SPO..... *super-sporulation* (meio para esporulação de levedura)

TCA..... ácido tricloroacético

Tris tris-hidroximetilaminometano

HCl..... cloreto de hidrogénio

Tween 20..... monolaurato de polioxietilenosorbitana

YPD..... *yeast extract, peptone, dextrose* (meio rico para levedura)

LiAC..... acetato de lítio

N-terminal..... amino-terminal

PAGE..... eletroforese em gel de poliacrilamida

PBS..... solução salina tamponada com fosfato

PBST..... PBS com Tween 20

PMSF..... phenilmetylsulfonyl fluoride

PCR..... *Polymerase Chain Reaction*

PEG..... polietilenoglicol

pH..... potencial hidrogeniônico

Sumário

1. Introdução	17
2. Objetivos	23
2.1 Objetivo geral	23
2.2. Objetivos específicos	23
3. Materiais e Métodos	24
3.1. Materiais	24
3.2. Métodos	28
3.2.1. Rastreamento quimio-genético com a coleção de nocautes de <i>S.cerevisiae</i>	28
3.2.2. Análise quantitativa do rastreamento e definição do <i>fitness</i> relativo	30
3.2.3. Teste de diluição seriada	31
3.2.4. Teste de curva de crescimento quantitativa	31
3.2.5. Análise das curvas de crescimento	32
3.2.6. Quantificação de poliaminas intracelulares	34
3.2.6.1. Extração de poliaminas	34
3.2.6.2. Derivatização de poliaminas	35
3.2.6.3. Quantificação de poliaminas	35
3.2.7. Ensaio enzimático Pho8 Δ 60 (ALP <i>assay</i>)	36
3.2.8. Transformação de Levedura	37
3.2.9. <i>Western blot</i>	37

3.2.10. Cruzamento, esporulação e dissecação de <i>S. cerevisiae</i>	38
3.2.10.1. Cruzamento	38
3.2.10.2. Esporulação	38
3.2.10.3. Dissecação	39
3.2.10.4. Caracterização de tétrades	39
4. Resultados e Discussão	40
4.1. Efeitos do GC7 em <i>S. cerevisiae</i> e rastreamento quimio-genético	40
4.2. Predição dos efeitos do GC7 independentes de eIF5A	44
4.3. Efeito do GC7 na via de síntese de poliaminas	45
4.4. Efeito do GC7 sobre mutantes de transporte transmembrana	52
4.5. Efeito do GC7 em autofagia	60
4.6. Efeito do GC7 sobre outras vias	66
4.7. Competição GC7-espermidina	67
5. Conclusões	81
6. Referências	84

1. INTRODUÇÃO

A proteína eIF5A é altamente conservada de arquea a eucariotos e é uma proteína essencial em todos os organismos estudados até o momento. Essa proteína está envolvida com vários processos celulares, como o controle da proliferação celular (PARK et al., 1997; PARK, 2006), processo tumorigênico (MANDAL et al., 2015; MELNIKOV et al., 2016) e inflamação (MAIER; OGIHARA et al., 2010; MAIER; TERSEY et al., 2010; ROBBINS et al., 2010).

eIF5A sofre uma modificação pós-traducional única e conservada ao longo da evolução, chamada de hipusinação, a qual é necessária para sua ativação. Essa ocorre em duas etapas consecutivas: primeiro, a enzima desoxi-hipusina sintase (Dys1 em *S. cerevisiae*) transfere uma porção 4-aminobutil da poliamina espermidina a um resíduo específico de lisina em eIF5A (51 em eIF5A de *S. cerevisiae*); em seguida, o resíduo desoxi-hipusina é hidroxilado pela enzima desoxi-hipusina hidroxilase (Lia1 em *S. cerevisiae*), para formar o resíduo hipusina (PARK et al., 2006; PARK et al., 2010; Figura 1).

A enzima desoxi-hipusina sintase é inibida pelo composto N1-guanil-1,7-diamino-heptano (GC7), o qual é um análogo estrutural da poliamina espermidina. Um estudo com a estrutura obtida por cristalografia de desoxi-hipusina sintase mostrou que há a ligação do inibidor GC7 no sítio ativo de desoxi-hipusina sintase (UMLAND et al., 2004).

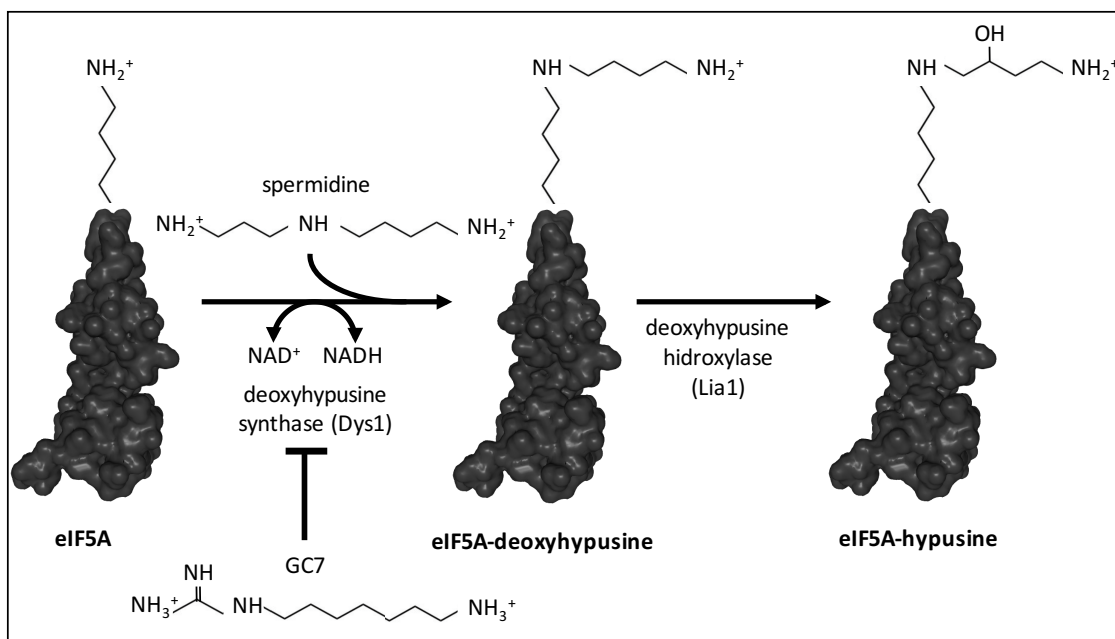


Figura 1. Via da biossíntese do resíduo de aminoácido hipusina no precursor de eIF5A. Esquema simplificado da modificação pós-traducional de eIF5A. A porção 4-aminobutil proveniente da poliamina espermidina é transferida para o resíduo de lisina do precursor inativo de eIF5A, por meio da ação da enzima desoxi-hipusina sintase (Dys1 em levedura). O intermediário resultante, agora contendo desoxi-hipusina, é posteriormente hidroxilado pela enzima desoxi-hipusina hidroxilase (Lia1 em levedura). Dys1 é inibida pelo composto N1-guanil-1,7-diamino-heptano (GC7).

As poliaminas putrescina, espermidina e espermina são moléculas ubíquas em células eucarióticas e estão envolvidas em uma série de processos relacionados com a proliferação celular e sobrevivência celular, atuando através de vários mecanismos diferentes, que podem envolver a ligação ao DNA, RNA, proteínas e fosfolipídios (WATANABE et al., 1991; MIYAMOTO et al., 1993). Recentemente foi demonstrado que a poliamina espermidina incrementa longevidade cronológica em *Saccharomyces cerevisiae* mediante aumento de macroautofagia (EISENBERG et al., 2009) e foram mostrados efeitos cardio protetores dessa poliamina através de aumento da longevidade em camundongos (EISENBERG et al., 2016).

As poliaminas podem ser importadas pelas células a partir do meio externo ou sintetizadas enzimaticamente através de vias metabólicas (PEREZ-LEAL; MERALI, 2012). A via de síntese de poliaminas em *S. cerevisiae* origina-se com a L-ornitina, que é convertida em putrescina pela ornitina descarboxilase (Spe1), uma enzima cuja produção é altamente regulada em

eucariotos. Por sua vez, a putrescina é convertida pela espermidina sintase (também chamada de putrescina-aminopropiltransferase - Spe3) em espermidina, que é subseqüentemente utilizada para sintetizar espermina, através da espermina sintase (Spe4). O cofator S-adenosilmetioninamina é obtido a partir da S-adenosilmetionina pela enzima S-adenosilmetionina descarboxilase (Spe2). Tanto espermina, quanto N-acetyl-espermidina mas não espermidina podem ser oxidadas pela ação da poliamina oxidase Fms1, enzima que gera como produto de ambas degradações 3-aminopropanal, usado como substrato na biossíntese de β -alanina e pantotenato (WHITE; GUNYUZLU; TOYN, 2001; LANDRY; STERNGLANZ, 2003) (Figura 2). A via de síntese de poliaminas na célula está submetida a alta regulação mediante a proteína antizima (Oaz1 em *S. cerevisiae*), que é dependente das concentrações intracelulares de poliaminas. Vários estudos recentes mostram um aumento de poliaminas em vários tipos de células tumorais diferentes, assim como, apontam a importância do circuito poliaminas-hipusinação de eIF5A na prevenção e no tratamento contra o câncer (NAKANISHI; CLEVELAND, 2016).

O papel do inibidor GC7 na inibição do crescimento de diferentes linhagens de células eucarióticas e de células tumorais já foi descrito e é bem estabelecido na literatura (PARK et al., 2010; UMLAND et al., 2004). Além disso, estudos recentes demonstram que o co-tratamento com GC7 e cetuximab diminui significativamente a viabilidade de células de câncer de pulmão em comparação com o tratamento apenas com cetuximab (WANG et al., 2016), assim como o co-tratamento com GC7 e gemcitabina diminui a viabilidade em células de adenocarcinoma pancreático (PDAC) e este efeito está relacionado com a inibição de eIF5A (YAO et al., 2017).

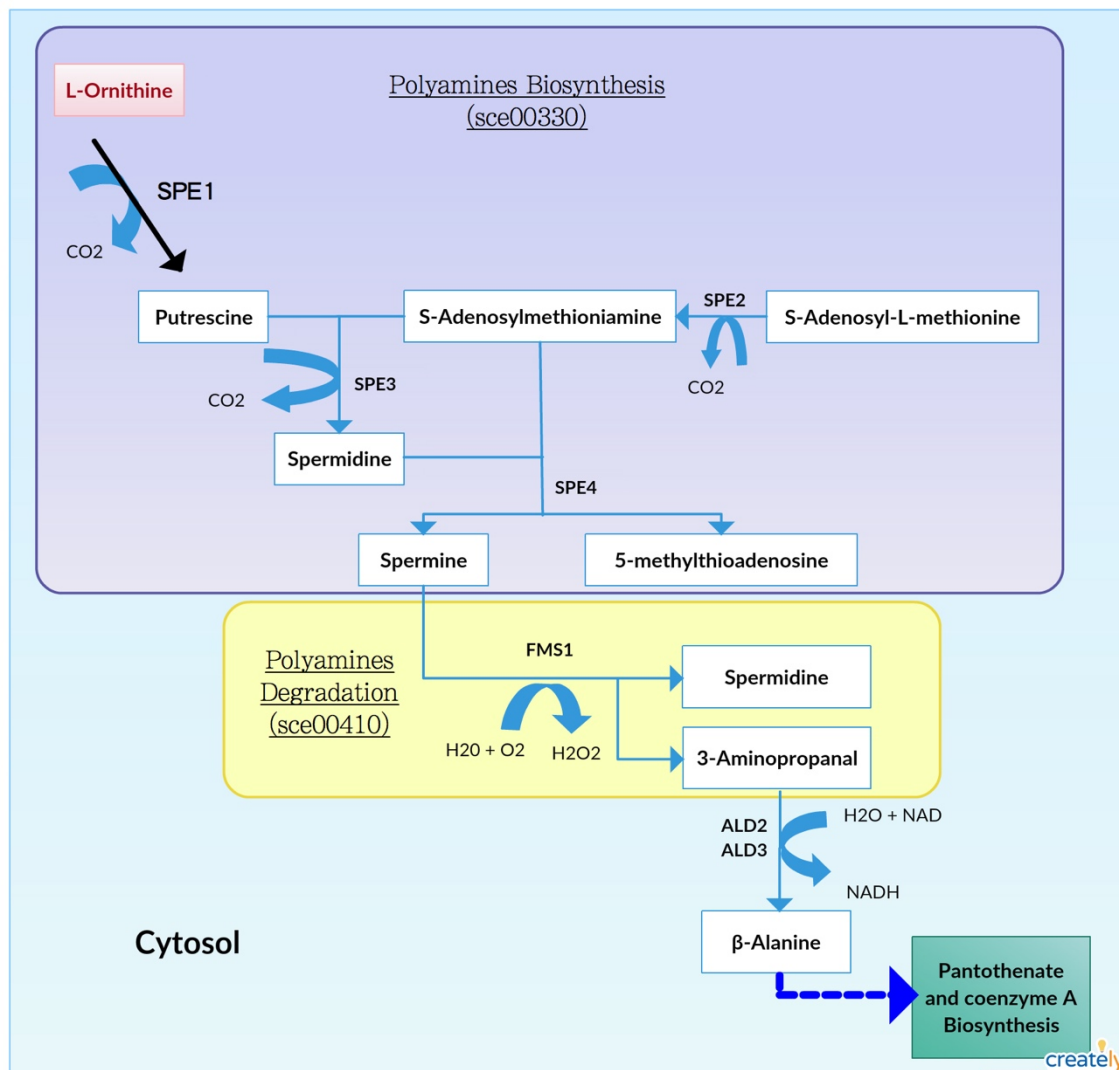


Figura 2. Via de biossíntese e degradação de poliaminas em *S. cerevisiae*. Os nomes dos genes correspondentes às enzimas estão mostrados em preto e maiúscula. As poliaminas aqui são: putrescina, espermidina e espermina. Figura construída a partir de *KEGG PATHWAY Database* (<http://www.kegg.jp>) usando a ferramenta *creately app* (<https://creately.com>). Os códigos dos mapas metabólicos sce00330 e sce00410 mostrados em parênteses correspondem a *arginine and proline metabolism* e *beta-alanine metabolism* respectivamente para o organismo *Saccharomyces cerevisiae*.

Compostos bioativos, tais como o GC7, são largamente utilizados para modular a função de proteínas e podem constituir importantes ferramentas para a compreensão da fisiologia celular, mais especificamente, na função de proteínas celulares específicas, como desoxi-hipusina sintase e eIF5A, assim como podem dar origem a novos fármacos. No entanto, apesar da comprovada atividade de inibição de desoxi-hipusina sintase e, conseqüentemente, da

maturação de eIF5A, *in vitro* e *in vivo* por GC7, trabalhos recentes demonstraram que desoxi-hipusina sintase não é o único alvo celular de GC7. Em um deles, utilizando cultura de células de mamífero, foi demonstrado que GC7 induz uma parada no início da tradução e que essa parada está relacionada à fosforilação de eIF2 e eIF4E-binding proteins 1 (4E-BP1), assim como o tratamento com GC7 apresentou uma diminuição nos níveis de poliaminas, sugerindo um aumento da antizima, proteína inibidora da via (LANDAU et al., 2010). Por outro lado, *knockdown* de eIF5A por RNAi, nesse mesmo trabalho, induziu parada da elongação da tradução. Dessa forma, apesar de inibir a função de eIF5A, GC7 interfere também com outros processos celulares, isto é, não possui especificidade (LANDAU et al., 2010). Em outro estudo, ficou demonstrado que o tratamento com GC7 causa uma indução de autofagia basal, que é independente da presença de eIF5A, e alterações nos níveis de eIF5A também não influenciam autofagia basal na ausência de GC7 (OLIVERIO et al., 2014). Além disso, apesar de GC7 inibir muito menos o crescimento de *Escherichia coli* em comparação com arqueas, diminuição de 1,3 vezes no tempo de geração em comparação com inibição total do crescimento com GC7 a 1 mM, houve diferença significativa, sugerindo uma ação do GC7 sobre bactéria (MATTIAS JANSSON; MALANDRIN; JOHANSSON, 2000).

A determinação de alvos para drogas e pequenas moléculas bioativas pode ser realizada através do crescimento celular comparativo; a taxa de crescimento é um dos fenótipos mais fáceis de se medir em levedura e, portanto, é a medida mais amplamente utilizada de aptidão celular. Assim, a coleção de nocautes de *S. cerevisiae*, um conjunto de mutantes que abrange todos os genes não essenciais desse organismo, tem permitido a realização de experimentos de larga escala mediante crescimento comparativo (com e sem droga) de cada um dos mutantes da coleção nocaute, como medida fenotípica da sensibilidade ou resistência para a referida droga (KUZMIN et al., 2014). O crescimento relativo de cada linhagem da coleção nas condições com e sem droga gera uma lista de categorização dos genes em função da resposta de crescimento da linhagem mutante para esse gene. Essa lista categorizada de genes cujos mutantes são sensíveis ou resistentes a uma droga fornece um perfil ou "assinatura", que caracteriza o efeito que essa droga tem sobre a

célula (PARSONS et al., 2006). Rastreamentos de quimio-genética em *S. cerevisiae* já foram utilizados em diversos trabalhos para entender o mecanismo de ação de uma série de moléculas biologicamente ativas, assim como para entender sua metabolização e transporte celular (LANTHALER et al., 2011; LEE et al., 2014; BILSLAND et al., 2016;). Desta forma, determinar novos alvos de interação celular de GC7 permitirá avaliar seu grau de especificidade à enzima desoxi-hipusina sintase, assim como poderia elucidar novas vias de metabolização, transporte e extrusão celular do inibidor GC7 (Figura 3).

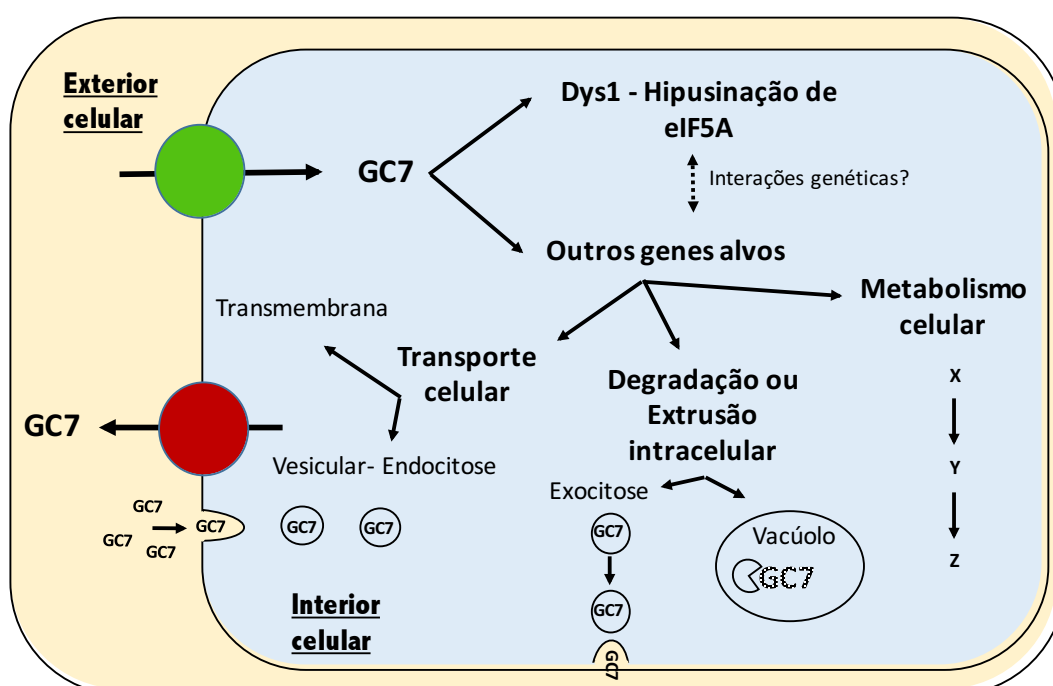


Figura 3. Possíveis processos a identificar mediante rastreamento quimio-genético em *S. cerevisiae*. Círculos verde e vermelho representam proteínas responsáveis pelo transporte transmembrana para o interior e exterior celular, respectivamente, assim como x, y e z proteínas ou enzimas relacionadas ao metabolismo celular. Círculos desenhados em preto representam diferentes compartimentos celulares como endossomo, exossomo e vacúolo.

5. CONCLUSÕES

Em conjunto, os resultados obtidos neste trabalho sugerem ou evidenciam o efeito do inibidor de hipusinação GC7 no crescimento celular de diferentes linhagens mutantes, abarcando alguns processos celulares como: transporte transmembrana, tráfego intracelular e metabolismo, além de diversos complexos celulares (Figura 21).

O fenótipo de sensibilidade ao composto GC7 apresentado pelos diferentes mutantes da via de síntese de poliaminas, assim como, a diminuição dos níveis de poliaminas intracelulares mostrados na linhagem selvagem na presença de GC7 evidenciam, em conjunto, o efeito *off target* apresentado pelo composto GC7 na via de síntese de poliaminas (Figura 21).

O atraso no crescimento celular, mostrado pela ausência de Trk1 na presença do inibidor GC7, sugere que GC7 poderia estar sendo transportado mais eficientemente quando há hiperpolarização da membrana plasmática (Figura 21).

Os resultados de sensibilidade ao GC7 exibidos por mutantes pertencentes a família de proteínas transportadoras multidrogas *DHA1 family*, assim como o resultado de resistência mostrado pela linhagem mutante do transportador Tna1, sugerem que o composto GC7 é um substrato para estes transportadores (Figura 21).

A resistência/supressão ao GC7 mostrada pelas linhagens nocautes do complexo desubiquitinasse Ubp3-Bre5, assim como em Pro1, sugerem que o tratamento com GC7 melhora o crescimento celular de mutantes envolvidos com ribofagia (Figura 21).

Os resultados de baixa toxicidade mostrados pelo inibidor GC7 e comparados com a espermidina, somado ao fato de que estas moléculas apresentaram efeitos contrários em autofagia, sugerem que apesar da semelhança estrutural de ambas moléculas, a qual leva uma potente inibição de eIF5A na presença do GC7, os efeitos celulares do inibidor devem ir além do mimetismo com a poliamina espermidina no panorama celular eucariótico de *S. cerevisiae*.

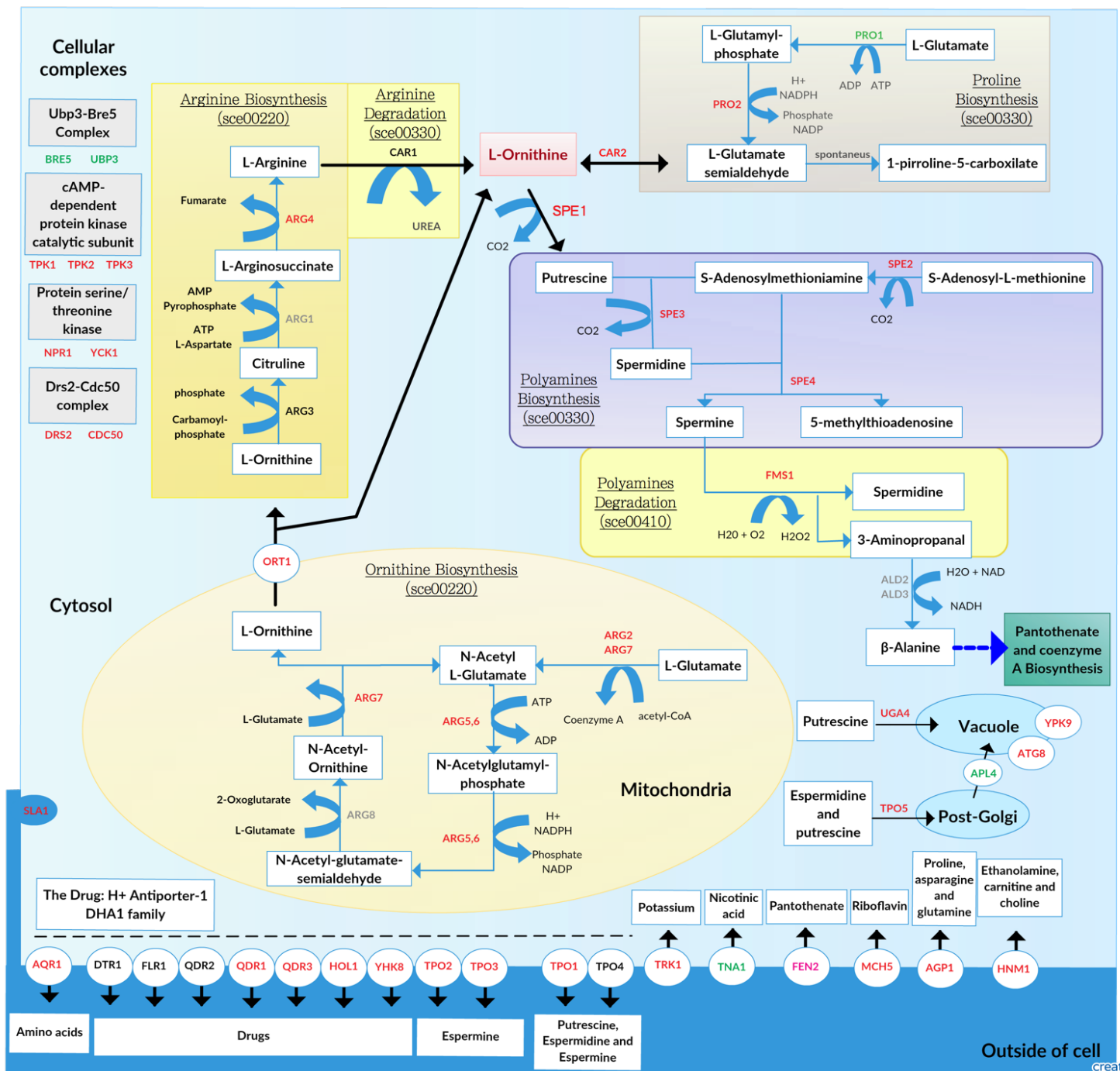


Figura 21. Diagrama dos efeitos celulares identificados para o inibidor de hipusinação GC7 em relação à coleção de nocautes em *S. cerevisiae*. Os nomes dos genes em maiúscula representam genes cujos nocautes: não foram testados (cinza), apresentaram letalidade (roxa), não apresentaram diferença no crescimento na presença de GC7 (preto), apresentaram sensibilidade (vermelho) ou resistência (verde) ao composto GC7 (1-2 mM). A sensibilidade ou resistência foi definida mediante o cálculo dos parâmetros usados neste trabalho (*K* e *tempo de geração*) e sua significância confirmada por *teste-T*, aceitando no mínimo 95% de confiança para *n*= 3. Círculos com fundo branco representam genes relacionados aos diferentes tipos de transporte (transmembrana, vacuolar, endocitose ,etc.). Flechas pretas indicam o sentido do: transporte, vias metabólicas, metabólitos, substâncias ou drogas e compartimentos celulares. Diagrama feito a partir de *creately app* (<https://creately.com>), utilizando a informação registrada em *KEGG PATHWAY Database* (<http://www.kegg.jp>), *SGD* (<https://www.yeastgenome.org>) ou literatura citada nesse trabalho. Os códigos dos mapas metabólicos sce00220, sce00330 e sce00410 mostrados

em parênteses correspondem para *arginine biosynthesis*, *arginine and proline metabolism* e *beta-alanine metabolism* respetivamente para o organismo *Saccharomyces cerevisiae*.

6. REFERENCIAS

ABDEL-SATER, F.; IRAQUI, I.; URRESTARAZU, A.; ANDRÉ, B. The External Amino Acid Signaling Pathway Promotes Activation of Stp1 and Uga35/Dal81 Transcription Factors for Induction of the AGP1 Gene in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, 2004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15126393> >.

AMBERG, D. C.; BURKE, D. J.; STRATHERN, J. N. **Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual**, 2005 Edition. ISBN-13: 978-0879697280 and ISBN-10: 0879697288

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K.; WILEY, C. J.; ALLISON, R. D.; BITTNER, M.; BLACKSHAW, S. **Current Protocols in Molecular Biology**, 2003. ISBN: 047150338X.

BARRETO, L.; CANADELL, D.; PETREZSÉLYOVÁ, S.; NAVARRETE, C.; MAREŠOVÁ, L.; PERÉZ-VALLE, J.; HERRERA, R.; OLIER, I.; GIRALDO, J.; SYCHROVÁ, H.; YENUSH, L.; RAMOS, J.; ARIÑO, J. A genome wide screen for tolerance to cationic drugs reveals genes important for potassium homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryotic Cell**, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21724935> >.

BILSLAND, E.; BEAN, D. M.; DEVANEY, E.; OLIVER, S. G. Yeast-Based High-Throughput Screens to Identify Novel Compounds Active against *Brugia malayi*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26812604> >.

BILSLAND, E.; HULT, M.; BELL, S. D.; SUNNERHAGEN, P.; DOWNS, J. A. The Bre5/Ubp3 ubiquitin protease complex from budding yeast contributes to the cellular response to DNA damage. **DNA Repair**, 2007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17556048> >.

BOK LEE, Y.; AE JOE, Y.; WOLFF, E. C.; DIMITRIADIS, E. K.; HEE PARK, M. Complex formation between deoxyhypusine synthase and its protein substrate, the eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) precursor. **Biochem. J**, v. 340, p. 273-281, 1999. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1220246/> >.

CELIK, A.; BAKER, R.; HE, F.; JACOBSON, A. High-resolution profiling of NMD targets in yeast reveals translational fidelity as a basis for substrate selection. **RNA**, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28209632> >.

CHATTOPADHYAY, M. K.; PARK, M. H.; TABOR, H. Hypusine modification for growth is the major function of spermidine in *Saccharomyces cerevisiae* polyamine auxotrophs grown in limiting spermidine. **Proc Natl Acad Sci USA**. 2007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18451031> >.

COSTANZO, M.; BARYSHNIKOVA, A.; BELLAY, J.; KIM, Y.; SPEAR, E. D.; SEVIER, C. S.; DING, H.; KOH, J. L. Y.; TOUFIGHI, K.; MOSTAFAVI, S.; PRINZ, J.; ST. ONGE, R. P.; VANDERSLUIS, B.; MAKHNEVYCH, T.; VIZEACOMAR, F. J.; ALIZADEH, S.; BAHR, S.; BROST, R. L.; CHEN, Y.; COKOL, M.; DESHPANDE, R.; LI, Z.; LIN, Z.-Y.; LIANG, W.; MARBACK, M.; PAW, J.; SAN LUIS, B.-J.; SHUTERIQUI, E.; TONG, A. H. Y.; VAN DYK, N.; WALLACE, I. M.; WHITNEY, J. A.; WEIRAUCH, M. T.; ZHONG, G.; ZHU, H.; HOURS, W. A.; BRUDNO, M.; RAGIBIZADEH, S.; PAPP, B.; PAL, C.; ROTH, F. P.; GIAEVER, G.; NISLOW, C.; TROYANSKAYA, O. G.; BUSSEY, H.; BADER, G. D.; GINGRAS, A.-C.; MORRIS, Q. D.; KIM, P. M.; KAISER, C. A.; MYERS, C. L.; ANDREWS, B. J.; BOONE, C. The Genetic Landscape of a Cell. **Science**, v. 327, n. 5964, p. 425-431, 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20093466> >.

COSTANZO, M.; VANDERSLUIJ, B.; KOCH, E. N.; BARYSHNIKOVA, A.; PONS, C.; TAN, G.; WANG, W.; USAJ, M.; HANCHARD, J.; LEE, S. D.; PELECHANO, V.; STYLES, E. B.; BILLMANN, M.; VAN LEEUWEN, J.; VAN DYK, N.; LIN, Z.-Y.; KUZMIN, E.; NELSON, J.; PIOTROWSKI, J. S.; SRIKUMAR, T.; BAHR, S.; CHEN, Y.; DESHPANDE, R.; KURAT, C. F.; LI, S. C.; LI, Z.; USAJ, M. M.; OKADA, H.; PASCOE, N.; SAN LUIS, B.-J.; SHARIFPOOR, S.; SHUTERIQUI, E.; SIMPKINS, S. W.; SNIDER, J.; SURESH, H. G.; TAN, Y.; ZHU, H.; MALOD-DOGNIN, N.; JANJIC, V.; PRZULJ, N.; TROYANSKAYA, O. G.; STAGLJAR, I.; XIA, T.; OHYA, Y.; GINGRAS, A.-C.; RAUGHT, B.; BOUTROS, M.; STEINMETZ, L. M.; MOORE, C. L.; ROSEBROCK, A. P.; CAUDY, A. A.; MYERS, C. L.; ANDREWS, B.; BOONE, C. A global genetic interaction network maps a wiring diagram of cellular function. **Science**, v. 353, n. 6306, p. aaf1420-aaf1420, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27708008> >.

DE CRAENE, J. O.; SOETENS, O.; ANDRÉ, B. The Npr1 Kinase Controls Biosynthetic and Endocytic Sorting of the Yeast Gap1 Permease. **Journal of Biological Chemistry**, 2001. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11500493> >.

DELORME-AXFORD, E.; GUIMARAES, R. S.; REGGIORI, F.; KLIONSKY, D. J. The yeast *Saccharomyces cerevisiae*: An overview of methods to study autophagy progression. **Methods**, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25526918> >.

DIAS, P. J.; SERET, M.-L.; GOFFEAU, A.; CORREIA, I. S.; BARET, P. V. Evolution of the 12-spanner drug:H⁺ antiporter DHA1 family in hemiascomycetous yeasts. **Omic: a journal of integrative biology**, v. 14, n. 6, p. 701-710, 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21114408> >.

DODGSON, S. E.; SANTAGUIDA, S.; KIM, S.; SHELTER, J.; AMON, A. The pleiotropic deubiquitinase ubp3 confers aneuploidy tolerance. **Genes and Development**, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27807036> >.

DOS SANTOS, S. C.; TEIXEIRA, M. C.; DIAS, P. J.; SÁ-CORREIA, I. MFS transporters required for multidrug/multixenobiotic (MD/MX) resistance in the model yeast: Understanding their physiological function through post-genomic approaches. **Frontiers in Physiology**, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4021133/> >.

EISENBERG, T.; ABDELLATIF, M.; SCHROEDER, S.; PRIMESSNIG, U.; STEKOVIC, S.; PENDEL, T.; HARGER, A.; SCHIPKE, J.; ZIMMERMANN, A.; SCHMIDT, A.; TONG, M.; RUCKENSTUHL, C.; DAMMBRUECK, C.; GROSS, A. S.; HERBST, V.; MAGNES, C.; TRAUSINGER, G.; NARATH, S.; MEINITZER, A.; HU, Z.; KIRSCH, A.; ELLER, K.; CARMONA-GUTIERREZ, D.; BÜTTNER, S.; PIETROCOLA, F.; KNITTELFELDER, O.; SCHREPFER, E.; ROCKENFELLER, P.; SIMONINI, C.; RAHN, A.; HORSCH, M.; MORETH, K.; BECKERS, J.; FUCHS, H.; GAILUS-DURNER, V.; NEFF, F.; JANIK, D.; RATHKOLB, B.; ROZMAN, J.; DE ANGELIS, M. H.; MOUSTAFA, T.; HAEMMERLE, G.; MAYR, M.; WILLEIT, P.; VON FRIELING-SALEWSKY, M.; PIESKE, B.; SCORRANO, L.; PIEBER, T.; PECHLANER, R.; WILLEIT, J.; SIGRIST, S. J.; LINKE, W. A.; MÜHLFELD, C.; SADOSHIMA, J.; DENGJEL, J.; KIECHL, S.; KROEMER, G.; SEDEJ, S.; MADEO, F. Cardioprotection and lifespan extension by the natural polyamine spermidine. **Nature Medicine**, v. 22, n. 12, p. 1428-1438, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27841876> >.

EISENBERG, T.; KNAUER, H.; SCHAUER, A.; BÜTTNER, S.; RUCKENSTUHL, C.; CARMONA-GUTIERREZ, D.; RING, J.; SCHROEDER, S.; MAGNES, C.; ANTONACCI, L.; FUSSI, H.; DESZCZ, L.; HARTL, R.; SCHRAML, E.; CRIOLLO, A.; MEGALOU, E.; WEISKOPF, D.; LAUN, P.; HEEREN, G.; BREITENBACH, M.; GRUBECK-LOEBENSTEIN, B.; HERKER, E.; FAHRENKROG, B.; FRÖHLICH, K.-U.; SINNER, F.; TAVERNARAKIS, N.; MINOIS, N.; KROEMER, G.; MADEO, F. Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. **Nature Cell Biology**, 2009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19801973> >.

GALVÃO, F. C.; ROSSI, D.; SILVEIRA, W. da S.; VALENTINI, S. R.; ZANELLI, C. F. The Deoxyhypusine Synthase Mutant dys1-1 Reveals the Association of eIF5A and Asc1 with Cell Wall Integrity. **PLoS ONE**, 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3613415/> >.

GENTZ, P. M.; BLATCH, G. L.; DORRINGTON, R. A. Dimerization of the yeast eukaryotic translation initiation factor 5A requires hypusine and is RNA dependent. **FEBS Journal**, 2009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19120453> >.

GITLER, A. D.; CHESI, A.; GEDDIE, M. L.; STRATHEARN, K. E.; HAMAMICHI, S.; HILL, K. J.; CALDWELL, K. A.; CALDWELL, G. A.; COOPER, A. A.; ROCHET, J. C.; LINDQUIST, S. α -Synuclein is part of a diverse and highly conserved interaction network that includes PARK9 and manganese toxicity. **Nature Genetics**, 2009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19182805> >.

GUTHRIE, C.; FINK, G. R. Guide to yeast genetics and molecular biology. In: **Methods in Enzymology**, Vol. 169. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2005781> >.

HARRISON, R.; PAPP, B.; PAL, C.; OLIVER, S. G.; DELNERI, D. Plasticity of genetic interactions in metabolic networks of yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1892960/> >.

HASENBRINK, G.; SCHWARZER, S.; KOLACNA, L.; LUDWIG, J.; SYCHROVA, H.; LICHTENBERG-FRATÉ, H. Analysis of the mKir2.1 channel activity in potassium influx defective *Saccharomyces cerevisiae* strains determined as changes in growth characteristics. **FEBS Letters**, 2005. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15757667> >.

HOON LEE, C.; HEE PARK, M. Human deoxyhypusine synthase: interrelationship between binding of NAD and substrates. **Biochem. J**, v. 352, p. 851-857, 2000. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1221526/> >.

HOON LEE, C.; UM, P. Y.; HEE PARK, M. Structure–function studies of human deoxyhypusine synthase: identification of amino acid residues critical for the binding of spermidine and NAD. **Biochem. J**, v. 355, p. 841-849, 2001. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11311149> >.

HOWARD J. P., HUTTON J. L., OLSON J. M. AND PAYNE G. S. Sla1p Serves as the Targeting Signal Recognition Factor for NPF_(1,2) D-Mediated. **JCB**. 2002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11940605> >.

IGARASHI, K.; KASHIWAGI, K. Characteristics of cellular polyamine transport in prokaryotes and eukaryotes **Plant Physiology and Biochemistry**, 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20159658> >.

JANKE, C.; MAGIERA, M. M.; RATHFELDER, N.; TAXIS, C.; REBER, S.; MAEKAWA, H.; MORENO-BORCHART, A.; DOENGES, G.; SCHWOB, E.; SCHIEBEL, E.; KNOP, M. A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: New fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. **Yeast**, 2004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15334558> >.

KAINZ, K.; TADIC, J.; ZIMMERMANN, A.; PENDL, T.; CARMONA-GUTIERREZ, D.; RUCKENSTUHL, C.; EISENBERG, T.; MADEO, F. Methods to Assess Autophagy and Chronological Aging in Yeast. In: **Methods in Enzymology**, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28237110> >.

KRAFT, C.; DEPLAZES, A.; SOHRMANN, M.; PETER, M. Mature ribosomes are selectively degraded upon starvation by an autophagy pathway requiring the Ubp3p/Bre5p ubiquitin protease. **Nature Cell Biology**, 2008. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18391941> >.

KURIAN, L.; PALANIMURUGAN, R.; GÖDDERZ, D.; DOHMEN, R. J. Polyamine sensing by nascent ornithine decarboxylase antizyme stimulates decoding of its mRNA. **Nature**, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21900894> >.

KUZMIN, ELENA; SHARIFPOOR, SARA; BARYSHNIKOVA, ANASTASIA; COSTANZO, MICHAEL; MYERS, CHAD L.; ANDREWS, BRENDA J.; BOONE, C. Synthetic Genetic Array Analysis for Global Mapping of Genetic Networks in Yeast. In: **Yeast Genetics. Methods and Protocols**. 1205p. 303-328. 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25213244> >.

LANDAU, G.; BERCOVICH, Z.; PARK, M. H.; KAHANA, C. The role of polyamines in supporting growth of mammalian cells is mediated through their requirement for translation initiation and elongation. **Journal of Biological Chemistry**, 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20181941> >.

LANDRY, J.; STERNGLANZ, R. Yeast Fms1 is a FAD-utilizing polyamine oxidase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2003. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12670477> >.

LANTHALER, K.; BILSLAND, E.; DOBSON, P. D.; MOSS, H. J.; PIR, P.; KELL, D. B.; OLIVER, S. G. Genome-wide assessment of the carriers involved in the cellular uptake of drugs: a model system in yeast. **BMC biology**, v. 9, p. 70, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22023736> >.

LEE, A. Y.; ST.ONGE, R. P.; PROCTOR, M. J.; WALLACE, I. M.; NILE, A. H.; SPAGNUOLO, P. A.; JITKOVA, Y.; GRONDA, M.; WU, Y.; KIM, M. K.; CHEUNG-ONG, K.; TORRES, N. P.; SPEAR, E. D.; HAN, M. K. L.; SCHLECHT, U.; SURESH, S.; DUBY, G.; HEISLER, L. E.; SURENDRA, A.; FUNG, E.; URBANUS, M. L.; GEBBIA, M.; LISSINA, E.; MIRANDA, M.; CHIANG, J. H.; APARICIO, A. M.; ZEGHOUF, M.; DAVIS, R. W.; CHERFILS, J.; BOUTRY, M.; KAISER, C. A.; CUMMINS, C. L.; TRIMBLE, W. S.; BROWN, G. W.; SCHIMMER, A. D.; BANKAITIS, V. A.; NISLOW, C.; BADER, G. D.; GIAEVER, G. Mapping the Cellular Response to Small Molecules Using Chemogenomic Fitness Signatures. **Science**, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24723613> >.

MA, Y.; TAKEUCHI, M.; SUGIURA, R.; SIO, S. O.; KUNO, T. Deletion mutants of AP-1 adaptin subunits display distinct phenotypes in fission yeast. **Genes to Cells**, 2009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19624755> >.

MACGURN, J. A.; HSU, P. C.; SMOLKA, M. B.; EMR, S. D. TORC1 regulates endocytosis via npr1-mediated phosphoinhibition of a ubiquitin ligase adaptor. **Cell**, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22118465> >.

MAIER, B.; OGIHARA, T.; TRACE, A. P.; TERSEY, S. A.; ROBBINS, R. D.; CHAKRABARTI, S. K.; NUNEMAKER, C. S.; STULL, N. D.; TAYLOR, C. A.; THOMPSON, J. E.; DONDERO, R. S.; LEWIS, E. C.; DINARELLO, C. A.; NADLER, J. L.; MIRMIRA, R. G. The unique hypusine modification of eIF5A promotes islet cell inflammation and dysfunction in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 6, p. 2156-2170, 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20501948> >.

MAIER, B.; TERSEY, S. A.; MIRMIRA, R. G. Hypusine: a new target for therapeutic intervention in diabetic inflammation. **Discovery medicine**, v. 10, n. 50, p. 18-23, 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20670594> >.

MANDAL S, MANDAL A, PARK MH Depletion of the polyamines spermidine and spermine by overexpression of spermidine/spermine N -acetyltransferase 1 (SAT1) leads to mitochondria-mediated apoptosis in mammalian **CELLS BIOCHEM J** (2015) 468:435-447 DOI:10.1042/BJ20150168. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25849284> >.

MANNHAUPT, G.; POHLENZ, H. -D; SEEFLUTH, A. K.; PILZ, U.; FELDMANN, H. Yeast homoserine kinase: Characteristics of the corresponding gene, THR1, and the purified enzyme, and evolutionary relationships with other enzymes of threonine metabolism. **European Journal of Biochemistry**, 1990. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2165904> >.

MARULLO, P.; MANSOUR, C.; DUFOUR, M.; ALBERTIN, W.; SICARD, D.; BELY, M.;

DUBOURDIEU, D. Genetic improvement of thermo-tolerance in wine *Saccharomyces cerevisiae* strains by a backcross approach. **FEMS Yeast Research**, 2009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19758333> >.

MELNIKOV, S.; MAILLIOT, J.; SHIN, B. S.; RIGGER, L.; YUSUPOVA, G.; MICURA, R.; DEVER, T. E.; YUSUPOV, M. Crystal Structure of Hypusine-Containing Translation Factor eIF5A Bound to a Rotated Eukaryotic Ribosome. **Journal of Molecular Biology**, v. 428, n. 18, p. 3570-3576, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27196944> >.

MISU, K.; FUJIMURA-KAMADA, K.; UEDA, T.; NAKANO, A.; KATOH, H.; TANAKA, K. Cdc50p, a Conserved Endosomal Membrane Protein, Controls Polarized Growth in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Biology of the Cell**, v. 14, p. 730-747, 2003. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC150004/> >.

MIYAMOTO, S.; KASHIWAGI, K.; ITO, K.; WATANABE, S.; IGARASHI, K. Estimation of polyamine distribution and polyamine stimulation of protein synthesis in *Escherichia coli*. **Archives of biochemistry and biophysics**, 1993. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7678729> >.

MORSELLI, E.; MARIÑO, G.; BENNETZEN, M. V.; EISENBERG, T.; MEGALOU, E.; SCHROEDER, S.; CABRERA, S.; BÉNIT, P.; RUSTIN, P.; CRIOLLO, A.; KEPP, O.; GALLUZZI, L.; SHEN, S.; MALIK, S. A.; MAIURI, M. C.; HORIO, Y.; LÓPEZ-OTÍN, C.; ANDERSEN, J. S.; TAVERNARAKIS, N.; MADEO, F.; KROEMER, G. Spermidine and resveratrol induce autophagy by distinct pathways converging on the acetylproteome. **Journal of Cell Biology**, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21339330> >.

MOUNCE, B. C.; OLSEN, M. E.; VIGNUZZI, M.; CONNOR, J. H. Polyamines and Their Role in Virus Infection. v. 81, n. 4, p. 1-12, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28904024> >.

MÜLLER, M.; KÖTTER, P.; BEHRENDT, C.; WALTER, E.; SCHECKHUBER, C. Q.; ENTIAN, K. D.; REICHERT, A. S. Synthetic Quantitative Array Technology Identifies the Ubp3-Bre5 Deubiquitinase Complex as a Negative Regulator of Mitophagy. **Cell Reports**, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25704822> >.

NAKANISHI, S.; CLEVELAND, J. L. Targeting the polyamine-hypusine circuit for the prevention and treatment of cancer **Amino Acids**, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27357307> >.

NISHIDA-AOKI, N.; MORI, H.; KURODA, K.; UEDA, M. Activation of the mitochondrial signaling pathway in response to organic solvent stress in yeast. **Current Genetics**, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25487302> >.

NODA, T.; KLIONSKY, D. J. Chapter 3 The Quantitative Pho8 Δ 60 Assay of Nonspecific Autophagy. **Methods in Enzymology**, 2008. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19185711> >.

O'DONNELL A. F., APFFEL A., GARDNER R. G. AND CYERT M. S. α -Arrestins Aly1 and Aly2 Regulate Intracellular Trafficking in Response to Nutrient Signaling. **Molecular Biology of the Cell** (2010). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20739461> >.

OLIVERIO, S.; CORAZZARI, M.; SESTITO, C.; PIREDDA, L.; IPPOLITO, G.; PIACENTINI, M. The spermidine analogue GC7 (N1-guanyl-1,7-diaminoheptane) induces autophagy through a mechanism not involving the hypusination of eIF5A. **Amino Acids**, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25218134> >.

OLZHAUSEN, J.; SCHÜBBE, S.; SCHÜLLER, H. J. Genetic analysis of coenzyme A biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Identification of a conditional mutation in the pantothenate kinase gene CAB1. **Current Genetics**, 2009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19266201> >.

OSSAREH-NAZARI, B.; BONIZEC, M.; COHEN, M.; DOKUDOVSKAYA, S.; DELALANDE, F.; SCHAEFFER, C.; DORSSELAER, A. Van; DARGEMONT, C. Cdc48 and Ufd3, new partners of the ubiquitin protease Ubp3, are required for ribophagy. **EMBO reports**, v. 11, p. 548-55474, 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2897114/> >.

OSSAREH-NAZARI, B.; NIÑO, C. A.; BENGTSON, M. H.; LEE, J. W.; JOAZEIRO, C. A. P.; DARGEMONT, C. Ubiquitylation by the Ltn1 E3 ligase protects 60S ribosomes from starvation-induced selective autophagy. **Journal of Cell Biology**, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24616224> >.

MATTIAS JANSSON, B; MALANDRIN, L.; JOHANSSON, H. E. Cell Cycle Arrest in Archaea by the Hypusination Inhibitor N1-guanyl-1,7-diamine-heptane. **JOURNAL OF BACTERIOLOGY**, v. 182, n. 4, p. 1158-1161, 2000. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10648545> >.

PANEK, H. R.; STEPP, J. D.; ENGLE, H. M.; MARKS, K. M.; TAN, P. K.; LEMMON, S. K.; ROBINSON, L. C. Suppressors of YCK-encoded yeast casein kinase 1 deficiency define the four subunits of a novel clathrin AP-like complex. **EMBO Journal**, 1997. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9250663> >.

PARK, M. H. The post-translational synthesis of a polyamine-derived amino acid, hypusine, in the eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A). **Journal of Biochemistry**, 2006. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16452303> >.

PARK, M. H.; LEE, Y. B.; JOE, Y. A. Hypusine is essential for eukaryotic cell proliferation. **NeuroSignals**, v. 6, n. 3, p. 115-123, 1997. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9285094> >.

PARK, M. H.; NISHIMURA, K.; ZANELLI, C. F.; VALENTINI, S. R. Functional significance of eIF5A and its hypusine modification in eukaryotes. In: **Amino Acids**, 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19997760> >.

PARSONS, A. B.; LOPEZ, A.; GIVONI, I. E.; WILLIAMS, D. E.; GRAY, C. A.; PORTER, J.; CHUA, G.; SOPKO, R.; BROST, R. L.; HO, C. H.; WANG, J.; KETELA, T.; BRENNER, C.; BRILL, J. A.; FERNANDEZ, G. E.; LORENZ, T. C.; PAYNE, G. S.; ISHIHARA, S.; OHYA, Y.; ANDREWS, B.; HUGHES, T. R.; FREY, B. J.; GRAHAM, T. R.; ANDERSEN, R. J.; BOONE, C. Exploring the Mode-of-Action of Bioactive Compounds by Chemical-Genetic Profiling in Yeast. **Cell**, v. 126, n. 3, p. 611-625, 2006. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16901791> >.

PATEL, P. H.; COSTA-MATTIOLI, M.; SCHULZE, K. L.; BELLEN, H. J. The Drosophila deoxyhypusine hydroxylase homologue nero and its target eIF5A are required for cell growth and the regulation of autophagy. **Journal of Cell Biology**, 2009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19546244/> >.

ALMEIDA JUNIOR, O.P; TOLEDO, T. R.; ROSSI, D.; DE BARROS ROSSETTO, D.; WATANABE, T. F.; GALVÃO, F. C.; MEDEIROS, A. I.; ZANELLI, C. F.; VALENTINI, S. R. Hypusine Modification of the Ribosome-binding Protein eIF5A, a Target for New Anti-Inflammatory Drugs: Understanding the Action of the Inhibitor GC7 on a Murine Macrophage Cell Line. **Current Pharmaceutical Design**. 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23701550> >.

PENNACCHIETTI, E.; LAMMENS, T. M.; CAPITANI, G.; FRANSSSEN, M. C. R.; JOHN, R. A.; BOSSA, F.; DE BIASE, D. Mutation of His465 alters the pH-dependent spectroscopic properties of Escherichia coli glutamate decarboxylase and broadens the range of its activity toward more alkaline pH. **Journal of Biological Chemistry**, 2009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2797229/> >.

PEREZ-LEAL, O.; MERALI, S. Regulation of polyamine metabolism by translational control.

Amino Acids, 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21811825> >.

PIOTROWSKI, J. S.; LI, S. C.; DESHPANDE, R.; SIMPKINS, S. W.; NELSON, J.; YASHIRODA, Y.; BARBER, J. M.; SAFIZADEH, H.; WILSON, E.; OKADA, H.; GEBRE, A. A.; KUBO, K.; TORRES, N. P.; LEBLANC, M. A.; ANDRUSIAK, K.; OKAMOTO, R.; YOSHIMURA, M.; DERANGO-ADEM, E.; VAN LEEUWEN, J.; SHIRAHIGE, K.; BARYSHNIKOVA, A.; BROWN, G. W.; HIRANO, H.; COSTANZO, M.; ANDREWS, B.; OHYA, Y.; OSADA, H.; YOSHIDA, M.; MYERS, C. L.; BOONE, C. Functional annotation of chemical libraries across diverse biological processes. **Nature Chemical Biology**, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28759014> >.

RAMOS, C.; CALDERÓN, I. L. Biochemical evidence that the *Saccharomyces cerevisiae* THR4 gene encodes threonine synthetase. **FEBS Letters**, 1994. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8082795> >.

ROBBINS, R. D.; TERSEY, S. A.; OGIHARA, T.; GUPTA, D.; FARB, T. B.; FICORILLI, J.; BOKVIST, K.; MAIER, B.; MIRMIRA, R. G. Inhibition of deoxyhypusine synthase enhances islet β cell function and survival in the setting of endoplasmic reticulum stress and type 2 diabetes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 51, p. 39943-39952, 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20956533> >.

ROGERS, B.; DECOTTIGNIES, A.; KOLACZKOWSKI, M.; CARVAJAL, E.; BALZI, E.; GOFFEAU, A. The Pleiotropic Drug ABC Transporters from *Saccharomyces cerevisiae* JMMB Symposium. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.**, v. 3, n. 2, p. 207-214, 2001. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11321575> >.

RSTUDIO TEAM, -. RStudio: Integrated Development for R. **[Online] RStudio, Inc., Boston, MA URL <http://www.rstudio.com>**, p. RStudio, Inc., Boston, MA, 2016. Disponível em: < <https://www.rstudio.com/products/rstudio/download/> >.

RUIZ, A.; DEL CARMEN RUIZ, M.; SÁNCHEZ-GARRIDO, M. A.; ARIÑO, J.; RAMOS, J. The Ppz protein phosphatases regulate Trk-independent potassium influx in yeast. **FEBS Letters**, 2004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15581616> >.

SAITO, K. Cdc50p, a Protein Required for Polarized Growth, Associates with the Drs2p P-Type ATPase Implicated in Phospholipid Translocation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Biology of the Cell**, 2004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15090616> >.

SAKANE, H.; YAMAMOTO, T.; TANAKA, K. The Functional Relationship between the Cdc50p-Drs2p Putative Aminophospholipid Translocase and the Arf GAP Gcs1p in Vesicle Formation in the Retrieval Pathway from Yeast Early Endosomes to the TGN. **CELL STRUCTURE AND FUNCTION**, v. 31, p. 87-108, 2006. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17062999> >.

SCHMIDT, A.; BECK, T.; KOLLER, A.; KUNZ, J.; HALL, M. N. The TOR nutrient signalling pathway phosphorylates NPR1 and inhibits turnover of the tryptophan permease. **EMBO Journal**, 1998. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1171040/> >.

SCHMIDT, K.; WOLFE, D. M.; STILLER, B.; PEARCE, D. A. Cd²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺ and Se²⁺ toxicity to *Saccharomyces cerevisiae* lacking YPK9p the orthologue of human ATP13A2. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19345671> >.

SPROUFFSKE, K.; WAGNER, A. Growthcurver: an R package for obtaining interpretable metrics from microbial growth curves. **BMC Bioinformatics**, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27094401> >.

STAGE-ZIMMERMANN, T.; SCHMIDT, U.; SILVER, P. A.; YAMAMOTO, K. R. Factors Affecting Nuclear Export of the 60S Ribosomal Subunit In Vivo. **Molecular Biology of the Cell**, v. 11, p. 3777-3789, 2000. Disponível em: <

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC15036/> >.

SZAPPANOS, B.; KOVÁCS, K.; SZAMECZ, B.; HONTI, F.; COSTANZO, M.; BARYSHNIKOVA, A.; GELIUS-DIETRICH, G.; LERCHER, M. J.; JELASITY, M.; MYERS, C. L.; ANDREWS, B. J.; BOONE, C.; OLIVER, S. G.; PÁL, C.; PAPP, B. An integrated approach to characterize genetic interaction networks in yeast metabolism. In: **Nature Genetics**, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21623372> >.

TANAKA, N.; MUKAI, Y. Yeast Cyc8p and Tup1p proteins function as coactivators for transcription of Stp1/2p-dependent amino acid transporter genes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26546823> >.

TATEHASHI, Y.; WATANABE, D.; TAKAGI, H. gamma-Glutamyl kinase is involved in selective autophagy of ribosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, v. 590, p. 2906-2914, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27442630> >.

TEIXEIRA, M. C.; CABRITO, T. R.; HANIF, Z. M.; VARGAS, R. C.; TENREIRO, S.; SÁ-CORREIA, I. Yeast response and tolerance to polyamine toxicity involving the drug: H⁺ antiporter Qdr3 and the transcription factors Yap1 and Gcn4. **Microbiology**, 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21148207> >.

TORGGLER, R.; PAPINSKI, D.; KRAFT, C. Assays to Monitor Autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. **Cells**, v. 6, n. 3, p. 23, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28703742> >.

TUMUSIIME, S.; ZHANG, C.; OVERSTREET, M. S.; LIU, Z. Differential regulation of transcription factors Stp1 and Stp2 in the Ssy1-Ptr3-Ssy5 amino acid sensing pathway. **Journal of Biological Chemistry**, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21127045> >.

TYLER, J. K.; JOHNSON, J. E. The role of autophagy in the regulation of yeast life span. **Ann. N.Y. Acad. Sci**, 2018. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29363766> >.

UMLAND, T. C.; WOLFF, E. C.; PARK, M. H.; DAVIES, D. R. A new crystal structure of deoxyhypusine synthase reveals the configuration of the active enzyme and of an enzyme·NAD·inhibitor ternary complex. **Journal of Biological Chemistry**, 2004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15100216> >.

USAJ, M.; TAN, Y.; WANG, W.; VANDERSLUIJ, B.; ZOU, A.; MYERS, C. L.; COSTANZO, M.; ANDREWS, B.; BOONE, C. TheCellMap.org: A Web-Accessible Database for Visualizing and Mining the Global Yeast Genetic Interaction Network. **G3:Genes|Genomes|Genetics**, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28325812> >.

WANG, X.; JIANG, R.; CUI, E. H.; FENG, W. M.; GUO, H. H.; GU, D. H.; TANG, C. W.; XUE, T.; BAO, Y. N1-guanyl-1,7-diaminoheptane enhances the chemosensitivity of NSCLC cells to cetuximab through inhibition of eukaryotic translation initiation factor 5A2 activation. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27097942> >.

WARREN D. T., ANDREWS P. D., GOURLAY C. W. AND AYSCOUGH K. R. Sla1p couples the yeast endocytic machinery to proteins regulating actin dynamics. **Journal of Cell Science**. (2002). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11950888> >.

WATANABE, S. I.; KUSAMA-EGUCHI, K.; KOBAYASHI, H.; IGARASHI, K. Estimation of polyamine binding to macromolecules and ATP in bovine lymphocytes and rat liver. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 31, p. 20803-20809, 1991. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1718969> >.

WHITE, W. H.; GUNYUZLU, P. L.; TOYN, J. H. *Saccharomyces cerevisiae* Is Capable of de

Novo Pantothenic Acid Biosynthesis Involving a Novel Pathway of beta-Alanine Production from Spermine. **Journal of Biological Chemistry**, 2001. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11154694> >.

WICKHAM, H.; KALICINSKI, M.; VALERY, K.; LEITIENNE, C.; COLBERT, B.; HOERL, D. Read Excel Files. **Packages R CRAN**, p. 1-4, 2016. Disponível em: < <https://cran.r-project.org/web/packages/readxl/index.html> >.

WINSTON, F.; DOLLARD, C.; RICUPERO; HOVASSE, S. L. Construction of a set of convenient *saccharomyces cerevisiae* strains that are isogenic to S288C. **Yeast**, 1995. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7762301> >.

ZHANG, W.; DU, G.; ZHOU, J.; CHEN, J. Regulation of Sensing, Transportation, and Catabolism of Nitrogen Sources in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Environ. Microbiol.** 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3910993/> >.

YAO M, YUN H, LIU Y, CHEN2 W, WANG W. N1-guanyl-1, 7-diaminoheptane enhances the sensitivity of pancreatic ductal adenocarcinoma cells to gemcitabine via the inhibition of eukaryotic translation initiation factor 5A2. **EXPERIMENTAL AND THERAPEUTIC MEDICINE.** (2017). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5609100/> >.