

**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Campus de Araraquara**

NATÁLIA MOREIRA BARBOSA

**Estudo do impacto da função do Fator de Início de Tradução de Eucariotos
(eIF5A) no perfil proteômico celular utilizando o modelo de *Saccharomyces
cerevisiae***

Araraquara, SP

2019

NATÁLIA MOREIRA BARBOSA

Estudo do impacto da função do Fator de Início de Tradução de Eucariotos (eIF5A) no perfil proteômico celular utilizando o modelo de *Saccharomyces cerevisiae*

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor, área de pesquisa em Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli

Coorientador: Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini

Araraquara, SP

2019

B838e Barbosa, Natália Moreira.
Estudo do impacto da função do Fator de Início de Tradução de Eucariotos (eIF5A) no perfil proteômico celular utilizando o modelo de *Saccharomyces cerevisiae* / Natália Moreira Barbosa. – Araraquara: [s.n.], 2019.
99 + xxi f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de Pesquisa em Biologia Molecular.

Orientador: Cleslei Fernando Zanelli.
Coorientador: Sandro Roberto Valentini.

1. eIF5A. 2. Tradução de mRNA. 3. Ribossomos. 4. Mitocôndria. I. Zanelli, Cleslei Fernando, orient. II. Valentini, Sandro Roberto, coorient. III. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: ESTUDO DO IMPACTO DA FUNÇÃO DO FATOR DE INÍCIO DE TRADUÇÃO DE EUCARIOTOS (eIF5A) NO PERFIL PROTEÔMICO CELULAR UTILIZANDO O MODELO DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE

AUTORA: NATALIA MOREIRA BARBOSA

ORIENTADOR: CLESLEI FERNANDO ZANELLI

COORIENTADOR: SANDRO ROBERTO VALENTINI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA, área: Análises Clínicas pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. CLESLEI FERNANDO ZANELLI

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

Profa. Dra. CARLA COLUMBANO DE OLIVEIRA

Departamento de Bioquímica / Instituto de Química - USP - São Paulo

Prof. Dr. JORG KOBARG

Instituto de Biologia / Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

Pesquisadora GLAUCIA NOELI MAROSO HAJJ

Centro Internacional de Pesquisa / AC Camargo Cancer Center

Prof. Dr. MARIO HENRIQUE BENGTON

Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual da Universidade de Campinas - UNICAMP

Araraquara, 13 de setembro de 2019

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, João e Silvana, cujo amor e orientação estão comigo em tudo o que eu busco.

Agradecimentos

Especialmente aos meus pais, João e Silvana, por ensinarem os primeiros passos, oferecerem suporte para todas as minhas realizações e pelo amor conferido a mim.

Às minhas queridas irmãs, Rafaela e Carolina, verdadeiras companheiras da minha vida, exemplos de pura amizade.

Ao meu orientador, Professor Cleslei Zanelli, por todo o tempo dedicado a mim e a este trabalho, pela confiança depositada em mim desde o mestrado e pelas orientações e ensinamentos, que foram muito além do que essas páginas contam.

Um agradecimento especial ao Professor Sandro Valentini, pela oportunidade de crescimento e exemplo de professor.

À professora Judith Frydman pela oportunidade de executar parte deste trabalho em seu laboratório na Universidade de Stanford e pela brilhante participação nas discussões científicas. Sua criatividade, conhecimento e paixão pela ciência serão sempre um exemplo de inspiração para a minha vida. Obrigada pelo convite para juntar-me ao seu grupo. O melhor ainda está por vir.

Aos professores Dr. Mário Henrique de Barros, Dra. Valéria Valente e Dra. Carla Columbano pela participação e contribuição no exame geral de qualificação.

À UNESP, Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Universidade de Stanford pelo apoio institucional de infraestrutura, o PADC-FCFAR, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

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

Novamente, à FAPESP pelas bolsas concedidas para realização do projeto no país (Processo Fapesp 2015/23203-0) e no exterior (Processo Fapesp 2017/23993-6).

Aos funcionários da seção de pós-graduação sempre dispostos a ajudar no que for preciso e a bibliotecária Irani, pelo auxílio na revisão bibliográfica.

Indispensável agradecer aos amigos do lab BiomolVZ, aos atuais: Angel, Su, Marco, Anderson, Marô, Keylla, Luís, Ana e Fer, e à velha guarda, por terem calorosamente me acolhido para este grupo em 2013: Mari, Dan, Paulo, Tati Maria, Fábio, Boo, Kdu e Paulinha, cuja influência não se limitou às trocas de protocolos e reuniões científicas. Compartilhamos os momentos mais difíceis resolvendo os perrengues da vida real nos bastidores do lab e também os momentos prazerosos da vida, como os dias de glória com bons drinks, sol e piscina. Muito obrigada!

Aos meus estudantes Anderson e Vitor pela oportunidade de aprender a ensinar também.

Aos amigos do Frydman Lab pelo ótima receptividade em Stanford, pelo ambiente de trabalho proporcionado, por sempre contribuírem com discussões produtivas e também pelos “off-hours” bem vividos.

Igualmente aos amigos que Stanford me trouxe que foram muito importantes para o momento longe de casa. Lili, nunca esquecerei o resgate que me deu no momento mais difícil.

À Neuza, por todo o suporte no período de escrita da tese, pela cumplicidade e toda força positiva que me recarregou para seguir até o tão sonhado fim.

Por fim, um agradecimento especial aos queridos amigos Mariana e Patrick, pelo envolvimento diário, por estarem ao meu lado enfrentando os piores obstáculos na construção de novos conhecimentos ao longo dessa tese, sem vocês eu não chegaria até aqui. Admiro muito vocês!!!

O sonho

(Clarice Lispector)

Sonhe com aquilo que você quer ser,
porque você possui apenas uma vida
e nela só se tem uma chance
de fazer aquilo que quer.

Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.
Dificuldades para fazê-la forte.
Tristeza para fazê-la humana.
E esperança suficiente para fazê-la feliz.

As pessoas mais felizes não tem as melhores coisas.
Elas sabem fazer o melhor das oportunidades
que aparecem em seus caminhos.

A felicidade aparece para aqueles que choram.
Para aqueles que se machucam
Para aqueles que buscam e tentam sempre.
E para aqueles que reconhecem
a importância das pessoas que passaram por suas vidas.

Resumo

O fator de início de tradução 5A (eIF5A) é altamente conservado em arqueas e eucariotos e essencial para a viabilidade celular. eIF5A sofre uma modificação pós-traducional exclusiva e essencial para sua função, em que um resíduo específico de lisina é convertido em uma hipusina. Apesar eIF5A já ter sido relacionado com o início da tradução, uma quantidade crescente de estudos recentes têm estabelecido sua função na etapa de alongação da tradução, mais especificamente na alongação de sequências que são capazes de induzir um *stalling* (atraso ou parada) do ribossomo. Entretanto, existem ainda poucos trabalhos realizados com perfil proteômico na ausência de função de eIF5A, de maneira que atualmente pouco se sabe sobre as proteínas que têm sua tradução dependente de eIF5A. Desta forma, o presente projeto visa a busca de proteínas que têm sua tradução dependente de eIF5A através da comparação de perfil proteômico entre linhagens selvagens e mutantes de eIF5A em *Saccharomyces cerevisiae*. Para isto, utilizamos neste trabalho uma estratégia de perfil proteômico celular *in vivo* por fluorescência de GFP utilizando uma coleção de 4.156 linhagens, cada uma contendo uma ORF diferente em fusão com GFP no C-terminal, e uma proteína RFP (variante E2Crimson) constitutivamente produzida como normalizador, tanto no *background* selvagem (*HYP2*) como mutante para eIF5A (*hyp2-3*). Esta tese apresenta a análise dos dados de GFP/RFP e a validação desta análise utilizando-se *western blot*. Os resultados demonstram um grupo de proteínas diferencialmente menos produzidas, das quais a maioria se relaciona com processos mitocondriais. Para confirmar o envolvimento de eIF5A com função mitocondrial, caracterizou-se a fisiologia mitocondrial em mutantes de eIF5A. Revelou-se a incapacidade de crescimento do mutante de eIF5A em fontes de carbono não fermentáveis, ou seja, que dependem da mitocôndria para sua oxidação. O mutante de eIF5A também apresentou atividade respiratória reduzida, aumento no potencial de membrana e na quantidade de DNA mitocondrial, embora a morfologia não pareça estar afetada. Majoritariamente, as proteínas mitocondriais são codificadas no núcleo, traduzidas no citoplasma e importadas para mitocôndria como um polipeptídeo desnovelado ou então são translocadas de maneira cotraducional para mitocôndria, e, de alguma maneira, eIF5A pode estar regulando a tradução dessas proteínas especificamente. Interessantemente, a desaceleração das taxas de alongação da tradução por códons raros ou outras sequências causadoras de parada ou atraso na tradução podem facilitar a ligação de Partícula Reconhecedora de Sinal (SRP) ao ribossomo, o que pode interferir com o direcionamento ao RE. Assim, existem diferentes caminhos pelos quais eIF5A poderia interferir com a tradução de proteínas direcionadas à mitocôndria ou ao RE e trabalhos futuros são necessários para abordar os mecanismos subjacentes ao papel de eIF5A na célula.

Palavras-chave: eIF5A. Tradução de mRNA. Ribossomos. Mitocôndria.

Abstract

The translation factor 5A (eIF5A) is conserved and essential for cell viability. This is the only protein known to contain the amino acid residue hypusine, essential for eIF5A function, generated by a post-translational modification. Although it was initially suggested a function for eIF5A in the translation initiation, eIF5A has been demonstrated to have a role in translation elongation. More recent studies have established that eIF5A is necessary for the elongation of specific sequences, which are able to induce a ribosome stalling. Still, there are few studies with proteomic profile in the absence of eIF5A function and the proteins which syntheses are dependent on eIF5A are not well known. Thus, the present study aims to search for the proteins which syntheses are dependent on eIF5A by proteomic profile comparison between wild-type strains and eIF5A mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. We present a proteomic profile for GFP fluorescence using a 4156 collection of strains, each one containing a different ORF fused to the C-terminal GFP and a protein RFP constitutively produced as normalizing, both in the wild and eIF5A mutant background. This thesis presents GFP / RFP data analysis and data validation using western blot. Our data using an *in vivo* proteome profile of the ORFs-GFP collection in a *hyp2-3* mutant background demonstrating that yeast eIF5A shows several mitochondrial proteins downregulated in the eIF5A mutant. To confirm eIF5A involvement with mitochondrial function, we characterized mitochondrial physiology in eIF5A mutants. We revealed the inability of the eIF5A mutant to grow in non-fermentable carbon sources, where they depend on mitochondria for its oxidation. eIF5A mutant also showed reduced respiratory activity, increased membrane potential and mitochondrial DNA amount, although morphology does not appear to be affected. Mostly, mitochondrial proteins are either coded into the nucleus, translated into the cytoplasm and imported into mitochondria as an unfolded polypeptide, or are translocated in a conventional manner to mitochondria, and somehow eIF5A may be regulating the translation of these proteins specifically. Interestingly, the slowdown of translation elongation rates by rare codons or other translation stalling motifs can facilitate binding of the Signal Recognition Particle (SRP) to the ribosome, which may interfere with ER targeting. Thus, there are different ways by which eIF5A could interfere with translation of proteins targeted to the mitochondria or the ER and further work are necessary to address the mechanisms underlying this role of eIF5A in the cell.

Keywords: eIF5A. mRNA translation. Ribosomes. Mitochondria.

Lista de Figuras

FIGURA 1. DIFERENÇAS NAS MODIFICAÇÕES DE A/eIF5A (ARQUEA/EUCARIOTO) E EF-P.....	20
FIGURA 2. COMPARAÇÃO DAS ESTRUTURAS TRIDIMENSIONAIS DE eIF5A E DE EF-P.....	21
FIGURA 3. ESQUEMA PROPOSTO PARA UNIFICAR AS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DETERMINANTES DA FORÇA DO <i>STALLING</i> RIBOSSOMAL DEPENDENTE DE EF-P.....	25
FIGURA 4. DETERMINANTES PARA DEPENDÊNCIA DE EF-P.	25
FIGURA 5. GERAÇÃO DE LINHAGENS PARA ANÁLISE POR FLUORESCÊNCIA.....	33
FIGURA 6. ESQUEMA DA ESTRATÉGIA DE SGA UTILIZADA NESTE TRABALHO.....	34
FIGURA 7. ILUSTRAÇÃO DO BLOCO DO <i>GENEPIX</i> PARA DELIMITAR A OBTENÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DE CADA COLÔNIA.....	38
FIGURA 8. PLACAS DAS COLEÇÕES GFP GERADAS PARA A LINHAGEM SELVAGEM (A) E MUTANTE <i>HYP2-3</i> (B).....	51
FIGURA 9. ILUSTRAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA DE UMA PLACA DA COLEÇÃO.....	52
FIGURA 10. DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DE COLÔNIA DAS LINHAGENS DO RASTREAMENTO. ..	54
FIGURA 11. CORRELAÇÃO DE PEARSON ENTRE AS REPLICATAS BIOLÓGICAS PARA O SELVAGEM E MUTANTE DE eIF5A.	55
FIGURA 12. GRÁFICOS DE A (<i>ADD</i>) X M (<i>MINUS</i>) DOS DAS CONDIÇÕES SELVAGEM (A) E MUTANTE (B) E SUAS RESPECTIVAS CORREÇÕES PELA NORMALIZAÇÃO DE LOESS.....	56
FIGURA 13 CORRELAÇÃO LINEAR ENTRE OS DADOS DE ABUNDÂNCIA PROTEICA UTILIZANDO DIFERENTES MÉTODOS QUANTITATIVOS.	57
FIGURA 14. DISTRIBUIÇÃO DAS RAZÕES DE GFP POR E2CRIMSON PARA IDENTIFICAR PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS NO MUTANTE DE eIF5A.	58
FIGURA 15. PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS REPRESENTADAS EM GRÁFICO VULCÃO.	59
FIGURA 16. GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS.	60
FIGURA 17. CLASSIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS COMO DIFERENCIALMENTE PRESENTES NO MUTANTE DE eIF5A EM RELAÇÃO AO SELVAGEM EM DIFERENTES COMPARTIMENTOS CELULARES BIOLÓGICOS.	61
FIGURA 18. COMPARAÇÃO DOS NÍVEIS DE PROTEÍNAS POLI-P NA ANÁLISE PROTEÔMICA POR GFP.	63
FIGURA 19. FENÓTIPOS DE CRESCIMENTO OBTIDOS EM FONTES DE CARBONO NÃO FERMENTÁVEIS.	65

FIGURA 20. FIGURA 20. CURVA DE CRESCIMENTO DA LINHAGEM SELVAGEM DE <i>S. CEREVISIAE</i> (VZL1363) EM YPD (GLICOSE) E YPGly (GLICEROL) COM E SEM A INIBIÇÃO DA HIPUSINAÇÃO POR GC7.	66
FIGURA 21. COMPLEMENTAÇÃO DA MUTAÇÃO COM UMA CÓPIA SELVAGEM DO GENE DE EIF5A.	66
FIGURA 22. PERFIL DE CRESCIMENTO CELULAR DE UM MUTANTE COM DEFEITO GERAL NA ELONGAÇÃO DA TRADUÇÃO EM MEIO NÃO FERMENTÁVEL.	67
FIGURA 23. FENÓTIPOS DE CRESCIMENTO CELULAR DOS NOCAUTES DE PROTEÍNAS RIBOSSOMAIAS EM MEIO CONTENDO FONTE DE CARBONO NÃO FERMENTÁVEL.	68
FIGURA 24. ANÁLISE DOS NÍVEIS DAS PROTEÍNAS NECESSÁRIAS PARA A CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL.	70
FIGURA 25. CARACTERIZAÇÃO DA FISIOLOGIA MITOCONDRIAL EM LINHAGEM COM EIF5A MUTANTE (<i>HYP2-3</i>).	72
FIGURA 26. ELETROFEROGRAMA DAS AMOSTRAS DE mRNA TOTAL UTILIZADAS PARA A CONSTRUÇÃO DAS BIBLIOTECAS.	77
FIGURA 27. GRÁFICO TIPO VULCÃO OBTIDO APÓS ANÁLISE DE TRANSCRITOS ATRAVÉS DO <i>SLEUTH</i>	79
FIGURA 28. TERMOS GO ENRIQUECIDOS NO GRUPO DE GENES SUPEREXPRESSOS.	81
FIGURA 29. TERMOS GO ENRIQUECIDOS NO GRUPO DE GENES SUBEXPRESSOS.	82

Lista de Tabelas

TABELA 1. LINHAGENS DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> UTILIZADAS NESTE TRABALHO.	30
TABELA 2. PLASMÍDEOS UTILIZADOS NO TRABALHO.....	31

Lista de Abreviaturas e Siglas

ng	Nanograma
µg	Micrograma
mg	Miligrama
g	gramas
µL	Microlitro
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
µM	Micromolar
mM	Milimolar
M	Molar
U	unidade de atividade enzimática
cDNA	DNA complementar ao mRNA
C-terminal	carboxi-terminal
N-terminal	amino-terminal
DNA	ácido desoxirribonucleico
RNA	ácido ribonucleico
mRNA	RNA mensageiro
tRNA	RNA transportador
rRNA	RNA ribossomal
D.O.600nm	densidade óptica a 600nm
DTT	Ditiotreitol
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonila
KCl	Cloreto de potássio
NaCl	Cloreto de sódio
NaOAc	Acetato de sódio
NaHPO ₄	Fosfato de sódio
HCl	Ácido clorídrico
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
kDa	Quilodalton
SC	meio sintético completo para levedura
YPD	“yeast extract, peptone, dextrose” (meio rico para levedura)
pH	potencial hidrogeniônico
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS

SDS	dodecil sulfato de sódio
TE	tampão Tris-EDTA
Tris	tris-hidroximetilaminometano (trizma base)
<i>xg</i>	aceleração gravitacional
kb	Kilobase
h	Hora
min	minuto
sec	segundos
PBS	“phosphate buffered saline” (solução salina tamponada com fosfato)
PBST	PBS com Tween 20
BSA	albumina do soro bovino
mA	miliampère
V	Volt
rpm	rotações por minuto
m/v	Relação massa/ volume
° C	Graus Celsius

Sumário

Dedicatória.....	3
Agradecimentos.....	4
Resumo	7
Abstract.....	8
Lista de Figuras.....	9
Lista de Tabelas.....	11
Lista de Abreviaturas e Siglas	12
Sumário.....	14
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVOS.....	29
3. MATERIAIS	30
3.1. Linhagens celulares utilizadas neste trabalho	30
3.2. Plasmídeos.....	31
4. MÉTODOS	32
4.1. <i>Synthetic Genetic Array</i> para geração das coleções contendo ORFs-GFP e E2Crimson com alelos selvagem e mutante <i>hyp2-3</i> de eIF5A	32
4.2. Condições de crescimento das coleções ORFs-GFP/E2Crimson selvagem e mutante <i>hyp2-3</i>	36
4.3. Obtenção das imagens de crescimento celular e fluorescência	36
4.4. Extração de dados de tamanho de colônia pelo <i>SGA Tools</i>	37
4.5. Extração de dados de fluorescência através do <i>GenePix</i>	37
4.6. Análise de dados do crescimento celular	38
4.7. Análise de dados de fluorescência.....	38
4.7.1. Filtragem e seleção das colônias de qualidade	39
4.7.2. Correção do <i>background</i>	39

4.7.3. Normalização	39
4.7.4. Gráficos “M” x “A”	40
4.7.5. Normalização pelo método de LOESS	40
4.7.6. Teste estatístico.....	40
4.8. Análise bioinformática das proteínas diferencialmente expressas	41
4.8.1. Classificação por Ontologia Genética	41
4.8.2. Identificação de proteínas contendo <i>motifs</i> específicos.....	41
4.9. Quantificação de proteínas em fusão com TAP (<i>Tandem Affinity Purification</i>) ou GFP por <i>western blot</i>	42
4.10. Teste de sensibilidade a temperatura para verificar perda de função mitocondrial	43
4.10.1. Teste de crescimento em meio sólido	43
4.10.2. Teste de crescimento quantitativo em fonte de carbono não fermentável durante inibição de hipusinação em meio líquido	44
4.11. Consumo de Oxigênio (O₂).....	44
4.12. Quantificação de potencial de membrana mitocondrial com TMRE (<i>Tetramethylrhodamine Ethyl Ester</i>) em citômetro de fluxo	45
4.13. Microscopia de fluorescência	45
4.14. Quantificação de DNA mitocondrial	46
4.15. Ensaios utilizando <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo para avaliar a dependência de eIF5A para tradução de proteínas com sequências de poli-prolinas de levedura Ldb17 e de mamíferos S6K.....	46
4.15.1. Anticorpos	46
4.15.2. Construções plasmidiais	46
4.15.3. Experimentos com leveduras	47
4.16. Perfil transcricional do mutante <i>hyp2-3</i>.....	47
4.16.1. Preparo da cultura de leveduras	47
4.16.2. Coleta de células	48
4.16.3. Lise celular	48
4.16.4. Extração de RNA total e análise da qualidade	48
4.16.5. Preparo das bibliotecas para sequenciamento	49

4.16.6. Análises de bioinformática	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1. Determinação de diferenças entre perfil proteômico de selvagem e mutante de eIF5A (<i>hyp2-3</i>) utilizando uma coleção de proteínas de fusão a GFP	51
5.2. Interações genéticas por análise de tamanho de colônias	52
5.3. Análise de dados de fluorescência obtidos no <i>GenePix</i>	54
5.4. Abundância proteica	57
5.5. Análise de genes diferencialmente expressos	58
5.6. Ontologia Genética	60
5.7. Análise de proteínas contendo poli-P	62
5.8. Análise de fenótipos de crescimento relacionados a função mitocondrial	64
5.9. Quantificação de proteínas em fusão com TAP (<i>Tandem Affinity Purification</i>) ou GFP por <i>western blot</i>	69
5.10. Caracterização da fisiologia mitocondrial em células com depleção de eIF5A ...	71
5.11. O <i>motif</i> de poliprolina da proteína S6K2: dependência translacional do eIF5A e importância para as interações proteína-proteína	74
5.12. Análise do perfil transcricional do mutantes <i>hyp2-3</i>	76
6. CONCLUSÕES	84
7. Lista de tabelas suplementares	86
8. Referências bibliográficas	87
Anexos	99

1. INTRODUÇÃO

O processo de tradução, assim como outros processos básicos celulares, a replicação e a transcrição, apresenta componentes altamente conservados ao longo da evolução (OLSEN; WOESE, 1997). O ribossomo é a estrutura onde ocorre a síntese proteica a partir da informação genética codificada em um RNA mensageiro (mRNA), regulada por fatores de tradução, e assistida por RNAs transportadores (tRNAs) (GUTIERREZ *et al.*, 2013). Para que o ribossomo seja capaz de catalisar a síntese de polipeptídios, diversos fatores são requeridos em quatro fases do processo: iniciação, alongação, término e reciclagem (RODNINA; WINTERMEYER, 2009).

Ao comparar-se o início da tradução entre células procarióticas e eucarióticas, diferenças importantes podem ser observadas. Em eucariotos, ao menos doze fatores de início de tradução (HINNEBUSCH; LORSCH, 2012) (eIFs, do inglês *Eukaryotic Initiation Translation Factors*) auxiliam a formação do ribossomo 43S, através da ligação do complexo ternário eIF2-GTP-Met-tRNA_i ao sítio P da subunidade 40S, e sua subsequente ligação ao mRNA, com localização fidedigna do *start codon* via mecanismo de varredura, bem como junção assistida à subunidade 60S e estabilização de um ribossomo 80S competente (Jackson, Hellen, e Pestova 2010). Por outro lado, bactérias requerem apenas três IFs (IF1, IF2 e IF3, do inglês *Initiation Translation Factors*) (SIMONETTI *et al.*, 2009), o que em partes pode ser explicado pelo reconhecimento direto da zona de início de tradução via ligação da subunidade 30S a *SD-sequence* presente no mRNA. Por outro lado, a fase de alongação da tradução possui fatores e acontece através de mecanismos que são muito bem conservados entre bactérias e eucariotos.

Em um primeiro momento, os análogos EF-Tu/eEF1A para procariotos e eucariotos, respectivamente, são responsáveis por transportar e acomodar o próximo aminoacil-tRNA, em um complexo ternário (EF-Tu/eEF1A)-GTP-aminoacil-tRNA, ao sítio A de maneira códon dependente. Após devidamente posicionado, a hidrólise do GTP via EF-Tu/eEF1A promove a dissociação do complexo e a formação da ligação peptídica entre os aminoacil-tRNAs localizados nos sítios P e A é favorecida. A formação da ligação peptídica é rápida e ocorre no centro peptidil-transferase (PTC, do inglês *Peptidyl Transferase Center*), localizado na subunidade maior e constituído primariamente por RNAs ribossomais (rRNAs) (DEVER; GREEN, 2012; RODNINA; WINTERMEYER, 2009). Imagens recentes em alta resolução de cristais de ribossomos têm elucidado a arquitetura estrutural do PTC, bem como ajudado a entender os mecanismos do processo de estabilização durante a formação da ligação peptídica,

e a comparação entre elas têm reforçado a teoria de que tal estrutura é universalmente conservada entre os três grandes domínios (BEN-SHEM *et al.*, 2010; DEVER; GREEN, 2012; JENNER *et al.*, 2012).

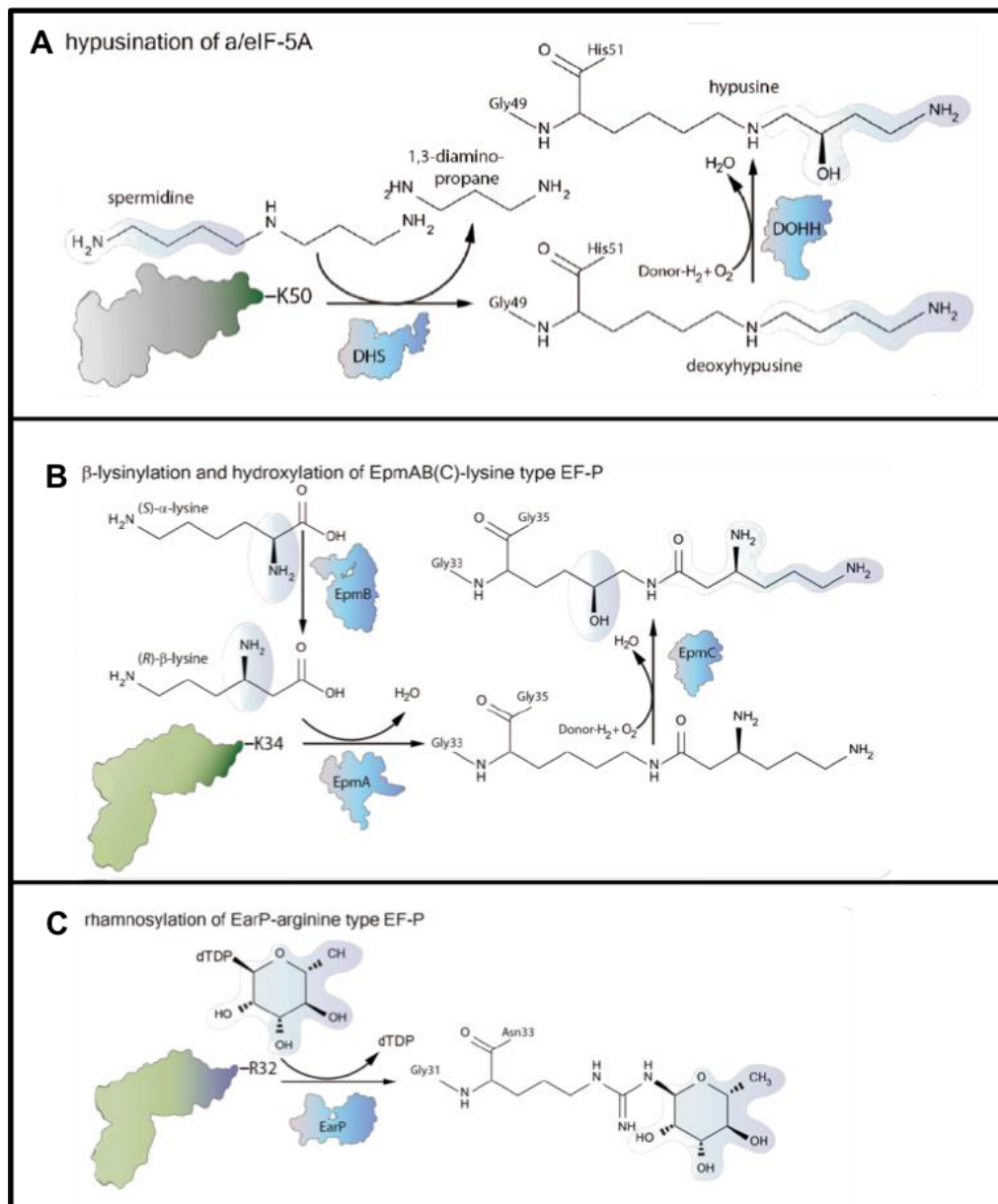
O fator tradução de eucariotos 5A (eIF5A – *eukaryotic translation initiation factor 5A*), além de conservado evolutivamente, é essencial em todos os organismos estudados até o momento (BENNE; BROWNLIEDI; HERSHEY, 1978). eIF5A é uma proteína pequena, de aproximadamente 17 kDa, presente tanto em eucariotos quanto em arqueas, mas não em bactérias (KLIER *et al.*, 1993; PARK; LEE; JOE, 1997). As proteínas eIF5A de *Saccharomyces cerevisiae* (codificada pelo gene *TIF51A/HYP2*) e as duas isoformas de humano (codificadas por *EIF5A1* e *EIF5A2*) compartilham mais de 60% de identidade (CHEN; LIU, 1997). Além disso, ambas isoformas de humanos são capazes de substituir a proteína de levedura, o que atesta sua conservação funcional (SCHNIER *et al.*, 1991).

eIF5A sofre uma modificação pós-traducional exclusiva correspondente à hipusinação de um resíduo específico de lisina (Figura 1A) (CHEN; LIU, 1997; PARK; LEE; JOE, 1997). A formação do aminoácido hipusina (do inglês *hypusine* – *hydroxyputrescine-lysine*) ocorre através da transferência de um grupo aminobutil da espermidina para o amino grupo livre de uma lisina específica, pela desoxi-hipusina sintase (Dys1 em *S. cerevisiae*, DHPS em humano), logo que a proteína é sintetizada. Em seguida, a hidroxilação deste grupo pela desoxi-hipusina hidroxilase (Lia1 em *S. cerevisiae*, DOHH em humano) termina a maturação de eIF5A (PARK; LEE; JOE, 1997). O aminoácido hipusina não é removido ou modificado até que a proteína seja degradada, revelando a irreversibilidade do processo (PARK; WOLFF; FOLK, 1993). A substituição do resíduo de lisina específico de eIF5A por arginina, K51R em *S. cerevisiae* e K50R em humano, leva à produção de eIF5A não hipusinado, o que resulta em inviabilidade celular (SCHNIER *et al.*, 1991) e incapacidade de estimular a síntese *in vitro* de metionil-puromicina (PARK, 1989; SMIT-MCBRIDE *et al.*, 1989). Todos os organismos eucarióticos estudados até o momento possuem genes homólogos para ambas enzimas modificadoras de eIF5A e a alça de hipusinação é altamente conservada, sendo que o resíduo de lisina do topo desta alça é completamente conservado (WOLFF *et al.*, 2007).

Apesar de bactérias não possuírem eIF5A, o fator de elongação da tradução de bactérias EF-P é um homólogo estrutural de eIF5A. Em diferentes espécies, EF-P também sofre modificação pós-traducional em um resíduo de lisina ou arginina em uma posição correspondente ao resíduo de lisina modificado de eIF5A (Figura 1B e C). Em *Escherichia coli*, EF-P sofre uma modificação chamada de lisil-lisilação, em que uma (S)- α -lisina é convertida pela enzima lisina aminomutase YjeK (EpmB) para (R)- β -lisina, a qual, em seguida, é

adicionada ao grupamento amino da cadeia lateral de uma lisina específica de EF-P (Lys34 em *E. coli*) por YjeA/PoxA (EpmA - enzima homóloga a uma lisil-tRNA sintetase) e, por fim, YfcM (EpmC) hidroxila o resíduo modificado. No entanto, além de *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia pestis* e *Xanthomonas campestris*, somente outras 200 espécies de bactérias possuem *yjeK* e *yjeA* em seus genomas, o que corresponde a 28% dos 725 genomas analisados (BAILLY; DE CRÉCY-LAGARD, 2010). Outra modificação identificada para espécies de bactérias que possuem uma arginina na posição de EF-P que corresponde à Lys34 de EF-P de *E. coli* é a raminosilação, que consiste na adição de uma L-raminose ao grupamento guanidínico da arginina em questão a partir de dTDP-L-ramnose e é catalisada pela enzima ramnosil-transferase EarP (LASSAK *et al.*, 2015). A coocorrência de uma arginina na posição de EF-P que corresponde à Lys34 de EF-P de *E. coli* e do gene *earP* ocorre em apenas 9% dos genomas conhecidos de bactérias (LASSAK *et al.*, 2015), o que leva ao questionamento se a maior parte restante das bactérias possuem ou não modificação pós-traducional em EF-P e como seria(m) esta(s) modificação(ões).

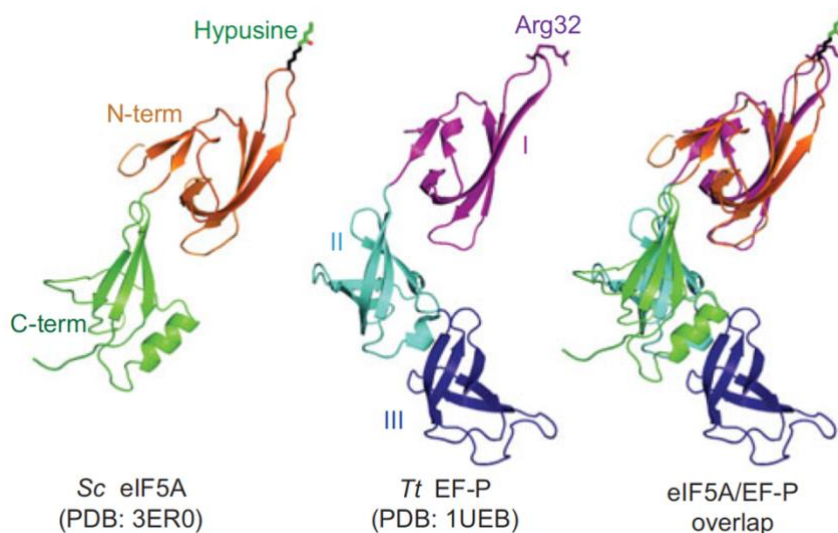
Figura 1. Diferenças nas modificações de a/eIF5A (arquea/eucarioto) e EF-P. Primeiramente, a enzima desoxi-hipusina sintase catalisa a reação entre a espermidina e um resíduo conservado de lisina em eucariotos e arqueas. A estrutura de eIF5A representa a estrutura de humanos. Em seguida, a DOOH hidroxila a desoxihipusina. B. Em EF-P, uma (S)- α -lisina é convertida pela YjeK (EpmB) em (R)- β -lisina, que, em seguida, é adicionada ao grupamento amino da cadeia lateral de uma lisina específica de EF-P por YjeA/PoxA e, por fim, YfcM (EpmC) hidroxila o resíduo modificado. C. Na raminosilação, ocorre a adição de uma L-raminose ao grupamento guanidínico da arginina a partir de dTDP-L-raminose através da ação de EarP.



Fonte: Figura adaptada de LASSAK; WILSON; JUNG, 2015

As estruturas tridimensionais de eIF5A e EF-P de diferentes organismos foram determinadas por cristalografia e apresentam características similares. Como mostrado na Figura 2, eIF5A possui somente 2 domínios, enquanto EF-P possui 3, sendo que os domínios II e III de EF-P são muito semelhantes e ambos alinham com o C-terminal de eIF5A, o que levou à hipótese de que domínio III adicional de EF-P surgiu devido a um evento de duplicação do domínio II. Outra característica muito interessante entre as estruturas de eIF5A e EF-P são as suas modificações pós-traducionais localizadas em um resíduo específico de lisina ou arginina, como apresentado acima, posicionada no topo da alça flexível no domínio N-terminal de eIF5A e no domínio I de EF-P (HANAWA-SUETSUGU *et al.*, 2004).

Figura 2. Comparação das estruturas tridimensionais de eIF5A e de EF-P. Estruturas de eIF5A de *S. cerevisiae* (esquerda, PDB: 3ER0) e de EF-P de *Thermus thermophilus* (meio, PDB: 1UEB) e sobreposição de ambas (direita). As cores usadas para destacar os domínios foram de eIF5A: domínio N-terminal (laranja) e domínio C-terminal (verde); e de EF-P: domínio I (magenta), domínio II (ciano), e domínio III (azul). O mesmo padrão de cores foi utilizado em todas as estruturas. O resíduo de hipusina, modelado em eIF5A (uma vez que a estrutura 3ER0 não possui esta parte da alça), e o resíduo correspondente Arg32 de EF-P são mostrados na forma de sticks.



Fonte: DEVER; GUTIERREZ; SHIN, 2014

Apesar de eIF5A já ter sido envolvido em uma série de outros processos celulares, está bem estabelecido atualmente que este fator tem um papel essencial na tradução (ROSSI *et al.*, 2014). Ensaio de interação física demonstraram que eIF5A co-purifica com o ribossomo 80S e polissomos e que esta interação é dependente de complexos ribossomais ativos na tradução (ZANELLI *et al.*, 2006). Além disso, mutantes de eIF5A de *S. cerevisiae* são sensíveis a

inibidores do processo de tradução e apresentam defeito de incorporação de aminoácidos radioativos, o que demonstra um comprometimento da síntese proteica celular (DIAS *et al.*, 2008). Ainda, foi verificado que mutantes de eIF5A apresentam um perfil polissomal semelhante ao de um mutante de eEF2, com um aumento nas frações polissomais em relação à fração de 80S, e um atraso significativo no tempo de trânsito ribossomal, demonstrando que o retardo na tradução e o aumento de polissomos são efeitos diretos da parada dos ribossomos na fase de elongação da tradução (GREGIO *et al.*, 2009; SAINI *et al.*, 2009). Por fim, um mutante condicional de eIF5A tem seus defeitos de crescimento, síntese proteica e perfil polissomal suprimidos pelo aumento da expressão de eEF2, revelando uma relação funcional próxima entre eIF5A e eEF2 (DIAS *et al.*, 2012). É importante ressaltar que a análise de perfil polissomal em cultura de células de *Drosophila melanogaster* e de mamíferos também sugerem um papel para eIF5A na etapa de elongação da tradução (LANDAU *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2010; PATEL *et al.*, 2009). Apesar disso, um estudo relatou diminuição de frações polissomais e acúmulo de monossomos com a depleção de eIF5A em *S. cerevisiae*, o que seria um indicativo de um defeito de iniciação da tradução (HENDERSON; HERSHEY, 2011), este resultado não foi reproduzido em outros estudos, como descrito acima.

De maneira bastante interessante, a ausência de EF-P ou bloqueio de sua modificação pós-traducional em *E. coli* também leva a aumento de polissomos em relação a monossomos, um defeito claro de elongação da tradução (BULLWINKLE *et al.*, 2013; NAGANATHAN; WOOD; MOORE, 2015). Este dado, na verdade, é mais recente que a determinação da estrutura tridimensional, definida por cristalografia, de EF-P ligado ao ribossomo 70S de *T. thermophilus*, a qual utilizou um complexo de iniciação de tradução com tRNA iniciador carregado com N-formil-metionina, acreditando-se que EF-P possa atuar na formação da primeira ligação peptídica. EF-P se liga com os domínios I e II no 50S e III no 30S, ocupando um local entre os sítios de tRNA-peptidil (sítio P) e tRNA desacilado prestes a sair do ribossomo (sítio E), com importante sobreposição com o sítio E, o que deve impedir a ligação simultânea de EF-P e tRNA desacilado no 70S. Além disso, a estrutura EF-P+70S+tRNAⁱ-fMet mostra a alça de modificação de EF-P posicionada em direção ao centro de peptidil-transferase do ribossomo em proximidade à extremidade CCA-3' do tRNA-peptidil (BLAHA; STANLEY; STEITZ, 2009). No entanto, apesar de o trabalho de Blaha *et al.* (2009) sugerir que a função de EF-P seja na formação da primeira ligação peptídica, estes dados estruturais não excluem a possibilidade de uma função para EF-P durante a elongação da tradução.

Utilizando-se ensaios de clivagem de rRNA e tRNA por radical hidroxil, foi modelado o local de interação de eIF5A no ribossomo de *S. cerevisiae*, o qual seria coincidente com a

localização de EF-P no 70S (BLAHA; STANLEY; STEITZ, 2009), entre os sítios P e E, com o resíduo de hipusina próximo ao centro de peptidil-transferase (PTC) (GUTIERREZ *et al.*, 2013). Mais tarde, a estrutura de eIF5A hipusinada de *Saccharomyces cerevisiae* complexada com o ribossomo e um tRNA no sítio P (P-tRNA) foi determinada por *cryo-electron microscopy* (SCHMIDT *et al.*, 2015) e cristalografia (MELNIKOV *et al.*, 2016). Além desse complexo eucariótico exibir aspectos similares ao complexo EF-P+ribosome+P-tRNA, em procarioto, a hipusina diretamente interage com o *CCA-end* do P-tRNA. Esses dados sugeriram que o papel essencial de eIF5A hipusinada seria para estabilizar o correto posicionamento do *CCA-end* do P-tRNA para auxiliar a formação de ligações peptídicas pelo PTC.

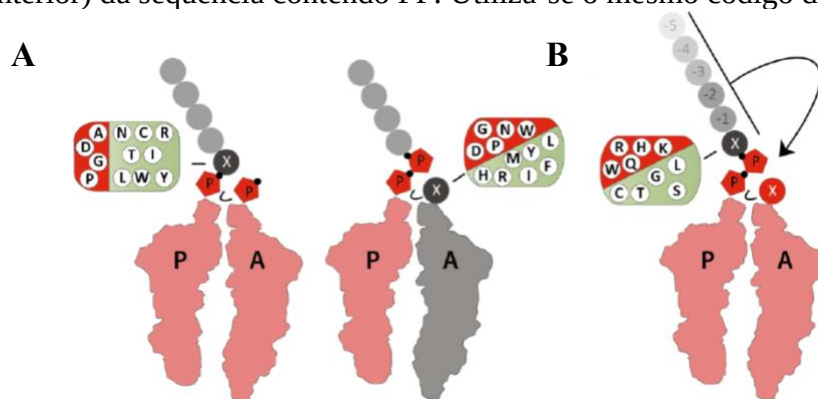
Mais recentemente, a função de EF-P na elongação da tradução foi correlacionada à elongação de sequências peptídicas ricas em prolina (LASSAK; WILSON; JUNG, 2015). Foi descrito que a formação de ligação peptídica entre puromicina, um antibiótico análogo à extremidade CCA-3' de um tRNA aminoacilado, e prolina (P) é de 10 à 1000 vezes mais lenta que para outros aminoácidos e que EF-P acelera esta reação cerca de 90 vezes. Além disso, EF-P aumenta a incorporação de glicina (G) e P em peptídeos cerca de 8 vezes e 15 vezes, respectivamente, e estabiliza a ligação do tRNA no sítio Peptidil, impedindo sua saída dos ribossomos (DOERFEL; RODNINA, 2013). Foi demonstrado que três resíduos de prolina subsequentes são suficientes para causar *stalling* (atraso ou parada) dos ribossomos, devido ao atraso na formação de ligação peptídica prolina-prolina, e este efeito acontece de maneira independente do anticódon para prolina (DOERFEL; RODNINA, 2013; UDE *et al.*, 2013).

Resultados semelhantes foram obtidos para mutantes de eIF5A em *S. cerevisiae*, mostrando que repórteres contendo PPP e proteínas contendo sequências mais extensas de prolina (poli-P) e múltiplas sequências em uma mesma proteína, como as proteínas Bni1, Eap1, Ldb17 e Vrp1, têm sua tradução dependentes de eIF5A e de hipusinação (GUTIERREZ *et al.*, 2013; MÉMIN *et al.*, 2014). Também para *Trypanosoma brucei* foi demonstrado que as proteínas CAP/Srv2p e formina, as quais contêm mais de 9 prolinas subsequentes em sua estrutura, são afetadas pelo bloqueio da função de eIF5A (NGUYEN *et al.*, 2015).

Embora o *stalling* de ribossomos em sequências poli-P e o resgate de EF-P sobre este efeito esteja demonstrado para um número convincente de proteínas em diferentes bactérias, aparentemente nem todas as proteínas contendo sequências poli-P têm sua tradução dependente de EF-P (LASSAK; WILSON; JUNG, 2015). Devido ao fato de as análises de perfil proteômico celular serem feitas em níveis de *steady-state* das proteínas, pode ser "mascarado" o impacto do papel de EF-P sobre a tradução de determinadas proteínas. Por exemplo, na síntese *in vitro* das proteínas TonB (contém apenas um PPP) e YafD (contém dois PPG) de *E. coli*, apesar de

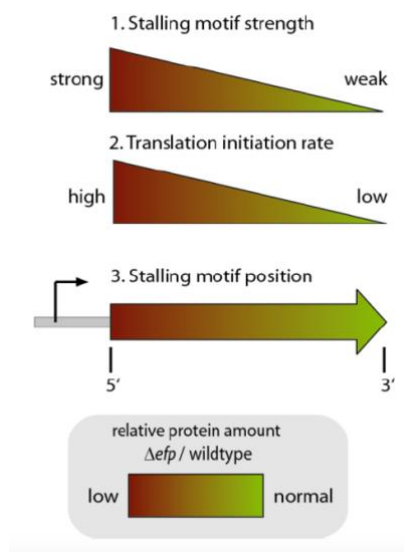
a tradução ocorrer de maneira mais lenta na ausência de EF-P, a proteína completa foi obtida (DOERFEL; RODNINA, 2013). Além disso, análise de perfil proteômico de uma linhagem *efpΔ* de *Salmonella enterica* revelou que apenas 80 de 320 proteínas que contêm sequências PPP, PPG ou A(alanina)PP neste organismo estavam diminuídas e que 20 delas estavam aumentadas em comparação com a linhagem selvagem. Por outro lado, o restante da análise de todas as outras proteínas que se apresentaram diminuídas neste ensaio levou à conclusão de que outras sequências peptídicas podem levar à dependência de EF-P, como Y(tirosina)I(isoleucina)R(arginina)YIR e GS(serina)C(cisteína)GPG, além daquelas proteínas em que nenhuma sequência característica pôde ser detectada (HERSCH *et al.*, 2013). Resultados semelhantes foram obtidos em análises de perfil proteômico de *efpΔ* em *E. coli*, sendo que a maior parte das proteínas contendo poli-P estavam diminuídas em comparação com a linhagem selvagem, mas para algumas outras o nível de expressão não estava alterado ou estava aumentado (PEIL *et al.*, 2013; STAROSTA *et al.*, 2014). A combinação dos dados obtidos nestes trabalhos em *E. coli*, juntamente com análises *in vitro* e *in vivo* gerou uma hipótese considerando diferentes graus de dependência de EF-P causada por sequências de peptídeos de 3 resíduos, variando de uma maior capacidade de causar *stalling* dos ribossomos por PPP, D(aspartato)/PP/D, PPW(triptofano), APP, G/PP/G e PPN(asparagina) para uma menor capacidade por L(leucina)/PPL, CPP e H(histidina)PP (LASSAK; WILSON; JUNG, 2015) (Figura 3). Estes resultados também estão de acordo com uma análise de perfil ribossomal em *E. coli* realizada com uma linhagem *efpΔ* (WOOLSTENHULME *et al.*, 2015). Este perfil ribossomal, juntamente com análises detalhadas dos determinantes da eficiência de tradução dos genes *atpA* e *atpD*, que são expressos a partir do mesmo mRNA para codificar subunidades da ATP sintase de *S. enterica* (HERSCH *et al.*, 2014) levou à proposta dos seguintes determinantes da dependência de EF-P na tradução: 1- A identidade da sequência indutora de *stalling* ribossomal, como mostrado na Figura 3; 2- A taxa de início da tradução, de forma que um aumento do início da tradução causa maior dependência de EF-P, provavelmente por causar um acúmulo de ribossomos bloqueados acima (*upstream*) da sequência de *stalling*; e 3- A posição da sequência de *stalling* em relação à janela aberta de leitura do gene (*Open Reading Frame* - ORF), uma vez que a pausa causada na tradução gera um acúmulo de ribossomos bloqueados (como descrito logo acima), gerando maior dependência de EF-P quanto mais próximo estiver a sequência de *stalling* do códon iniciador (Figura 4).

Figura 3. Esquema proposto para unificar as sequências de aminoácidos determinantes da força do *stalling* ribossomal dependente de EF-P. A. Diferentes sequências contendo prolina-prolina (X/PP/X) podem causar *stalling* ribossomal: o *stalling* da tradução pode ser devido à sequência XPP, com o tRNA-prolina-X-peptidil no sítio P e o tRNA-prolina no sítio A (esquerda); ou à sequência PPX, com o tRNA-prolina-prolina-peptidil no sítio P e o tRNA aminoacilado carregando o aminoácido X (tRNA-X) no sítio A (direita). Dentro das caixas estão agrupados os aminoácidos representados na figura como "X". Vermelho indica uma maior capacidade de causar *stalling* do ribossomo e verde indica menor capacidade. B. Modulação do *stalling* de ribossomos causado por PPX realizada por resíduos de aminoácidos anteriores a esta sequência. Nesta situação considera-se o tRNA-prolina-prolina-peptidil no sítio P e o tRNA-X no sítio A com grande capacidade de causar *stalling*. A escala de cinza correlaciona diretamente a capacidade de causar *stalling* e a distância acima (anterior) da sequência contendo PP. Utiliza-se o mesmo código de cores que em A.



Fonte: LASSAK; WILSON; JUNG, 2015

Figura 4. Determinantes para dependência de EF-P. As proteínas que dependem de EF-P para sua tradução são moduladas pela capacidade da sequência *stalling* (como representado na Figura 3), assim como é dependente também da taxa de início da tradução e do posicionamento da sequência *stalling* em relação à janela aberta de leitura (ORF).



Fonte: LASSAK; WILSON; JUNG, 2015

Por outro lado, apesar de eIF5A também ter sido relacionado à função de alívio de *stalling* causado por sequências de prolinas consecutivas, não existem estudos ainda envolvendo eIF5A que tenham sistematizado o impacto de sua função no perfil proteômico celular, como tem sido feito para EF-P. Muitos trabalhos buscaram genes expressos de maneira dependente de eIF5A nos níveis transcricional e traducional (MATHEWS; HERSHEY, 2015), no entanto, apenas dois trabalhos mais recentes buscaram alterações gerais no perfil proteômico de células depletadas de eIF5A e usando inibidores da hipusinação (FUJIMURA *et al.*, 2015; MÉMIN *et al.*, 2014). Uma vez que eIF5A está relacionado com proliferação celular em diferentes organismos estudados, mais especificamente na transição G1/S, e de diferentes tipos de tumores humanos (MATHEWS; HERSHEY, 2015; ROSSI *et al.*, 2014), os dois trabalhos citados a seguir foram realizados com linhagens tumorais. Em um deles, foi utilizada a linhagem de câncer cervical HeLa e os resultados obtidos identificaram que as proteínas Hsp27, NM23 e DJ-1 têm sua tradução dependente da função de eIF5A, sendo que Hsp27 possui as sequências LPPA e LPPG, NM23 possui uma sequência GPPI, e DJ-1 não possui nenhuma sequência de *stalling* previamente identificada para EF-P ou eIF5A. No entanto, não foi definido neste estudo se estas sequências de Hsp27 e NM23 são importantes para a dependência de sua tradução por eIF5A (MÉMIN *et al.*, 2014). Por outro lado, o segundo trabalho utilizou uma linhagem de adenocarcinoma pancreático ductal (PDAC) e identificou, com a inibição da função de eIF5A, 147 proteínas diminuídas, das quais 37% possuem uma ou mais sequências ricas em prolina. Apesar de também ter encontrado proteínas com sequências ricas em prolina nas proteínas aumentadas com a inibição da função de eIF5A, estas constituem 21% e a análise estatística verificou uma relação de enriquecimento de proteínas com poli-P apenas no grupo de proteínas diminuídas. Além disso, um número significativo destas proteínas diminuídas e que possuem poli-P estão funcionalmente relacionadas à remodelagem de citoesqueleto envolvida em migração celular e invasão tumoral (FUJIMURA *et al.*, 2015). Embora estes resultados concordem com os estudos que sugerem a importância de eIF5A para facilitar a síntese de poli-P, ele também demonstra que eIF5A não está regulando exclusivamente a expressão de proteínas com poli-P, assim como demonstrado para EF-P (HERSCH *et al.*, 2013).

Dois estudos recentes investigaram os efeitos da depleção de eIF5A na tradução global em *S. cerevisiae* e ambos concluíram que eIF5A tem um papel na tradução mais amplo do que apenas facilitar a tradução de sequências ricas em prolinas, como previamente foi sugerido (PELECHANO; ALEPUZ, 2017; SCHULLER *et al.*, 2017). Apesar de eIF5A ser essencial para a elongação da tradução, é proposto que atue durante a elongação de determinadas sequências de 3 ou mais resíduos que tendem a induzir um tipo de parada (*stalling*) do ribossomo, como,

por exemplo, sequências consecutivas de prolina e outros que não contêm ligação prolina-prolina, como DNP e DDP, ou que não contêm prolina, como KYK e DVG (PELECHANO; ALEPUZ, 2017; SCHULLER *et al.*, 2017). No entanto, a quantidade de *motifs* descritos como dependentes de eIF5A para sua tradução foram tantos que estão presentes em praticamente todos os genes de *S. cerevisiae*. No entanto, estes trabalhos tiveram como foco determinar os *motifs* que mais requerem eIF5A, mas não exatamente quais níveis de proteínas celulares são mais afetados na ausência de função desta. Além disso, apenas a presença destes *motifs* não é determinante e preditiva da dependência que um polipeptídeo tem com relação à eIF5A, como exemplificado em seguida. Por exemplo, um trabalho recente realizado em cultura de célula de mamífero demonstrou que uma proteína (ATG3), contendo os *motifs* DDG e PPPP, tem sua tradução dependente de eIF5A apenas por conta de DDG (LUBAS *et al.*, 2018).

Os autores do trabalho Meneguello *et al.* (2019) exploraram também a função de eIF5A na tradução de S6K2 em células HeLa. Os autores deste trabalho estavam primariamente interessados na função das proteínas ribossomais S6 quinase (S6Ks), serina/treonina quinases que pertencem à família AGC quinases. São descritos dois genes S6K que codificam proteínas com 83% de homologia. Em humanos existem duas S6Ks, p70-S6K1 (70 kDa) e p54-S6K2 (54 kDa), com 83% de homologia e que compartilham a maioria das suas sequencias alvo de regulação, sugerindo um mecanismo de ativação semelhante (LEE-FRUMAN *et al.*, 1999). Ambas proteínas são ativadas pela fosforilação controlada pela via de sinalização mTOR, essencial em muitos processos metabólicos, como crescimento celular, transcrição, síntese de proteínas, biogênese do ribossomo, transporte de nutrientes e controle celular espacial pelo citoesqueleto. Ambos os S6Ks são responsáveis pela fosforilação da proteína ribossomal S6, principalmente S6K2 (PENDE *et al.*, 2004), e essa ativação é essencial para a síntese de proteínas e a progressão do ciclo celular (CHAUVIN *et al.*, 2014; KOH, 2013). Além disso, outros fatores de tradução, como o fator de iniciação da tradução eucariótica 4B (eIF4B), a proteína 4 de morte celular programada (PDCD4) e o fator de alongamento eucariótico-2 quinase (eEF2K) são fosforilados pelos S6Ks, resultando em estimulação da síntese proteica (MAGNUSON; EKIM; FINGAR, 2012; WANG *et al.*, 2001).

Apesar da grande conservação observada entre as duas proteínas S6Ks, apenas o S6K2 contém em seu C-terminal um sinal de localização nuclear, assim como uma região rica em poliprolinas, com cinco prolina consecutivas (PPPPP). Essa região de poliprolina é conservada entre eucariotos, sugerindo uma importância evolutiva e funcional de tal motivo na proteína S6K2. Meneguello *et al.*, 2019 investigaram a importância das sequencias consecutivas de prolina da proteína S6K2, no que diz respeito à sua função de quinase, de promover interação

proteína-proteína, e de conferir dependência a eIF5A para sua tradução. Dois organismos modelos foram escolhidos para este estudo, células humanas HeLa e células de leveduras *S. cerevisiae*. Nesta abordagem, os autores mostraram que a sequência de poliprolinas não é necessária para a função quinase de S6K2. Ensaio de co-imunoprecipitação, mostraram que este motivo é importante para definir o interactoma de S6K2, especificamente a interação com RPS6, um regulador da atividade ribossomal em eucariotos superiores, mas que há uma dependência direta de eIF5A no sistema de tradução em leveduras. Nesta condição em leveduras, a redução da proteína eIF5A faz com que as células sejam incapazes de produzir S6K2 tão rápido quanto quando o eIF5A. Essa hipótese poderia explicar o motivo pelo qual Mandal; Mandal; Park, 2016 não observaram uma correlação óbvia entre as proteínas eIF5A e poliprolina após o silenciamento da eIF5A (MENEGUELLO *et al.*, 2019).

Estudos recentes de perfil proteômico em *S. cerevisiae* dos mutantes *tif51A-3 (hyp2-3)* e *dys1-1*, realizados em nosso laboratório, revelaram um grupo heterogêneo de proteínas diferencialmente presentes em células com defeito na função de eIF5A. Essas proteínas foram analisadas quanto ao processo celular ao qual pertencem e houve predominância nos processos envolvendo metabolismo geral, tradução, conformação de proteínas e ciclo celular (Ana Letícia Maragno e Danuza Rossi, dados não publicados). Uma vez que eIF5A atua diretamente na tradução, e já tendo sido relacionado com ciclo celular e via secretória (FRIGIERI *et al.*, 2008; ROSSI *et al.*, 2014), é possível que eIF5A atue diretamente e especificamente na regulação da tradução dessas proteínas.

Essa hipótese, no entanto, não exclui uma função para eIF5A na tradução de uma maneira mais geral. Mesmo fatores que atuam no processo geral da tradução podem afetar diferencialmente a tradução de determinados mRNAs que possuem elementos regulatórios em cis. Por exemplo, existe o caso do controle traducional do mRNA de Cln3 (ciclina G1/S) por eIF4E (ANTHONY; ZONG; DE BENEDETTI, 2001; DANAIE *et al.*, 1999). Inclusive, o gene para o fator eIF4E em *S. cerevisiae* (*CDC33*) foi originalmente identificado em um rastreamento de mutantes de ciclo celular justamente por defeitos nesse fator geral de início da tradução gerar um acúmulo de células paradas em G1 (DANAIE *et al.*, 1999). Entretanto, os mecanismos moleculares que expliquem a maioria dos fenótipos celulares correlacionados à função de eIF5A permanecem poucos descritos. Mais recentemente, foi encontrado que eIF5A modula a respiração mitocondrial (MELIS *et al.*, 2017; PULESTON *et al.*, 2019), porém, estes trabalhos não correlacionam o papel de eIF5A na tradução de *stalling motifs* com a redução de proteínas específicas mitocondriais.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho avaliou a atuação de eIF5A na expressão gênica diferencial em nível traducional por análise proteômica através de quantificação da fluorescência *in vivo* utilizando a coleção de ORFs-GFP de *S. cerevisiae* para identificar proteínas que possuem sua tradução dependente de eIF5A e integrar resultados proteômicos com fenotípicos para melhorar o entendimento de como eIF5A atua nos mecanismos de síntese proteica específica.

3. MATERIAIS

3.1. Linhagens celulares utilizadas neste trabalho

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

Linhagem	Genótipo ¹	Origem
VZL1363 ₂ (query)	<i>MATa can1pr::TDH3pr-E2Crimson::hphMX::can1Δ::STE2pr-LEU2 lyp1Δ his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 TIF51A::natMX4</i>	coleção do laboratório
VZL1364 ₂ (query)	<i>MATa can1pr::TDH3pr-E2Crimson::hphMX::can1Δ::STE2pr-LEU2 lyp1Δ his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 hyp2-3::natMX4</i>	coleção do laboratório
Coleção leveduras GFP	<i>MATa ORF-GFP::HIS3 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0</i>	Brenda Andrews's Lab
Coleção leveduras GFP selvagem	<i>MATa ORF-GFP::HIS3 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 lyp1Δ can1pr::TDH3pr-E2Crimson::hphMX::can1Δ::STE2pr-LEU2 HYP2::natMX4</i>	Este estudo
Coleção leveduras GFP mutante <i>hyp2-3</i>	<i>MATa ORF-GFP::HIS3 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 lyp1Δ can1pr::TDH3pr-E2Crimson::hphMX::can1Δ::STE2pr-LEU2 hyp2-3::natMX4</i>	Este estudo

¹*STE2pr-LEU2* corresponde ao gene selvagem *LEU2* de *S. cerevisiae*, controlado pelo promotor do gene *STE2* de *S. cerevisiae*, que é ativo apenas em linhagens do tipo *MATa*. *hphMX* corresponde ao cassete contendo o gene *hph* de *Klebsiella pneumonia*, que confere resistência para o antibiótico higromicina B em *S. cerevisiae*; *natMX4* corresponde ao cassete contendo o gene *nat1* de *Streptomyces noursei*, que confere resistência para o antibiótico nourseotricina (COSTANZO; BOONE, 2009; GOLDSTEIN; MCCUSKER, 1999; KAINTH *et al.*, 2009).

²Linhagem gerada durante o doutorado de Fábio C. Galvão e descrita em sua tese (<https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/132162/000854092.pdf;jsessionid=8E773752E4B894D26C4B267CF46B4738?sequence=1>).

³Coleção obtida por (HUH *et al.*, 2003) e comercializada por ThermoFisher (<https://www.thermofisher.com/us/en/home/references/protocols/proteins-expression-isolation-and-analysis/gfp-protocol/yeast-gfp-clone-collection.html#intro>).

3.2. Plasmídeos

Tabela 2. Plasmídeos utilizados no trabalho

Plasmídeo	Característica	Origem
pSV60 (pRS316)	<i>CEN6, URA3</i>	Coleção do Laboratório
pSV62 (pRS423)	<i>2μ, HIS3</i>	Coleção do Laboratório
pSV64 (pRS425)	<i>2μ, LEU2</i>	Coleção do Laboratório
pSV65 (pRS426)	<i>2μ, URA3</i>	Coleção do Laboratório
pSV138	<i>HYP2, CEN6, URA3</i>	Coleção do Laboratório
pSV374 (YEp351)	<i>2μ, LEU2</i>	Coleção do Laboratório
pSV464	<i>LIA1, 2μ, LEU2</i>	Coleção do Laboratório
pSV467	<i>HYP2, 2μ, HIS3</i>	Coleção do Laboratório
pSV508	<i>DYS1, 2μ, URA3</i>	Coleção do Laboratório
pSV1104	<i>eft2H669K, 2μ, LEU2</i>	Coleção do Laboratório

4. MÉTODOS

4.1. *Synthetic Genetic Array* para geração das coleções contendo ORFs-GFP e E2Crimson com alelos selvagem e mutante *hyp2-3* de eIF5A

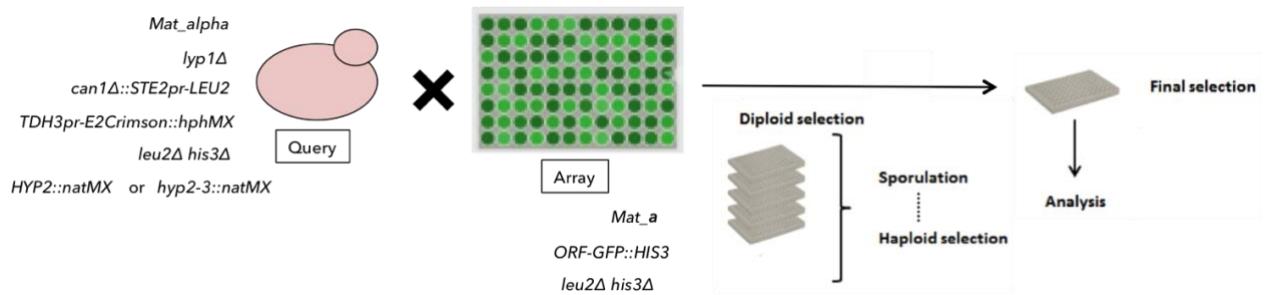
Para a geração das coleções haploides de *S. cerevisiae* contendo fusão de GFP no C-terminal das ORFs, e E2Crimson como controle de expressão constitutiva, foi utilizado o método de *Synthetic Genetic Array* (SGA) (TONG *et al.*, 2001), seguindo protocolo estabelecido (GÖTTERT *et al.*, 2018).

Este método utilizou a fluorescência de GFP (*Green Fluorescent Protein*) para determinar os níveis de uma determinada proteína com uma fusão C-terminal de GFP (ORF-GFP). Desta forma, as mudanças nos níveis totais de uma proteína em uma dada condição ou *background* genético podem ser determinados pela medida de fluorescência de GFP. Como linhagens de partida, foi utilizada a coleção de linhagens ORFs-GFP (HUH *et al.*, 2003), que é constituída de 12 placas de 384 colônias cada (24 x 16), resultando em 4.148 ORFs fusionadas a GFP, correspondendo a 75% do proteoma de levedura e as linhagens *query* VZL1363 (*HYP2*) e VZL1364 (*hyp2-3*) (Tabela 1), geradas anteriormente em nosso laboratório (Fábio Galvão, dados não publicados).

Para utilizar esta estratégia em um *background* com mutação em eIF5A, foi utilizada a metodologia de *Synthetic Genetic Array* (SGA) (TONG *et al.*, 2001) para geração de linhagens haploides contendo ao mesmo tempo ORFs-GFP e mutante de eIF5A (*hyp2-3*) (VALENTINI *et al.*, 2002). Além disso, foi utilizada uma proteína fluorescente diferente de GFP, produzida a partir de um promotor constitutivo para servir como um normalizador interno do experimento. Para isto, geralmente é utilizada uma RFP (*Red Fluorescent Protein*) e em nosso experimento foi utilizada a variante *E2Crimson* da RFP de *Discosoma striata* (STRACK *et al.*, 2009) (Figura 5).

Após geração das linhagens haploides de interesse, um conjunto da coleção ORFs-GFP com *background* selvagem e outro com mutante de eIF5A foram obtidas em meio de cultura sólido e as medidas de fluorescência da coleção completa foram obtidas em escâner *Typhoon* (GE Healthcare). As análises posteriores indicaram as linhagens contendo proteínas em fusão com GFP como diferencialmente presentes entre selvagem (*HYP2*) e mutante (*hyp2-3*).

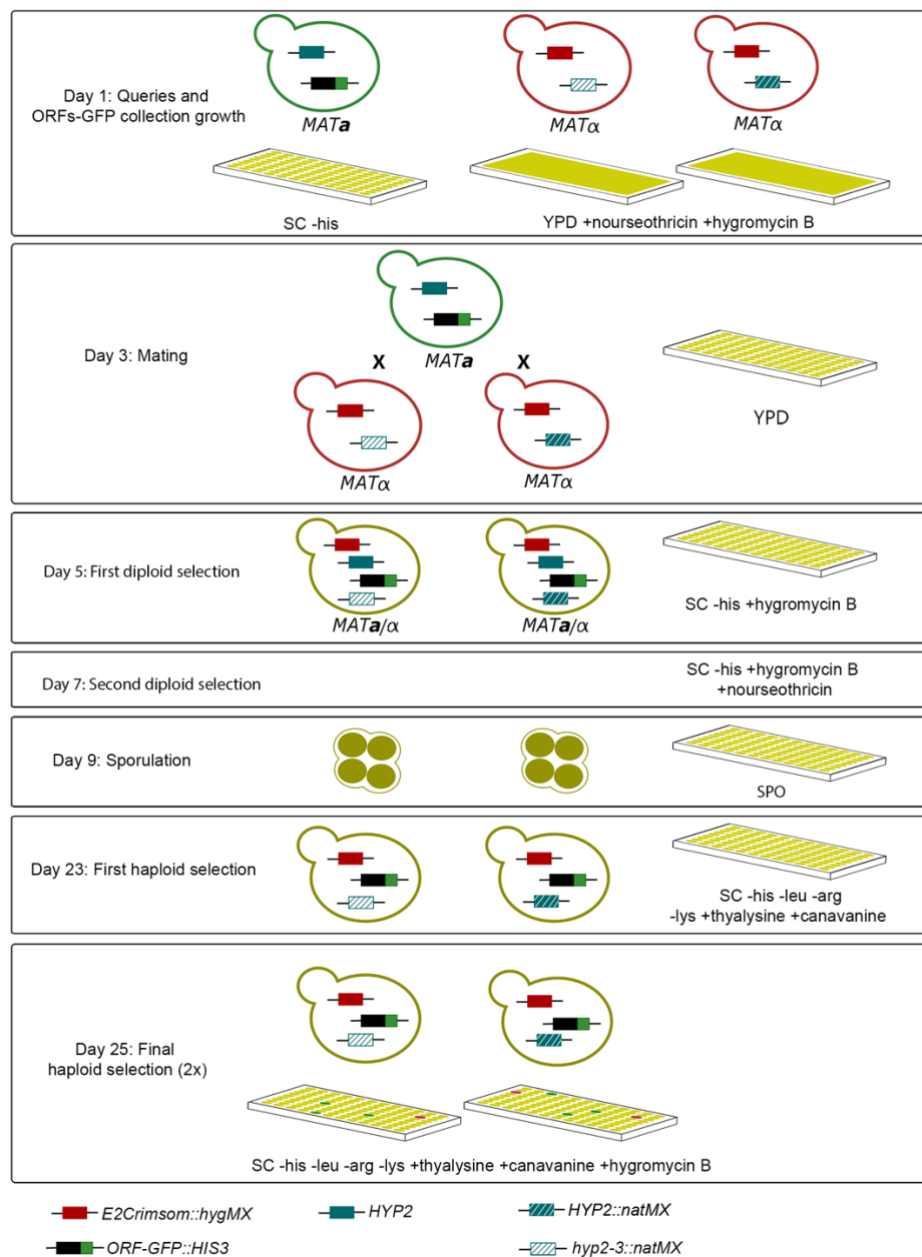
Figura 5. Geração de linhagens para análise por fluorescência. Uma linhagem contendo a proteína RFP e a mutação de interesse (*query*) é cruzada com a coleção ordenada de ORFs-GFP (*GFP array*). O método SGA é usado para criar, de maneira automatizada, um novo conjunto ordenado contendo os haploides expressando as proteínas fusionadas a GFP (proteína alvo) e a proteína RFP normalizadora, em linhagem selvagem ou com a mutação de interesse.



Fonte: adaptado da Tese de doutorado de Fábio Galvão (não publicado).

Estas linhagens *query* possuem os marcadores recessivos *can1Δ* (resistência ao agente citotóxico canavanina), *lyp1Δ* (resistência ao agente citotóxico tialisina) e o marcador dominante *STE2pr-LEU2* (prototrofia para leucina, expresso apenas em haploides *MATa*), necessários para seleção apenas de haploides ao final do processo de SGA. Além disso, estas linhagens possuem a construção *TDH3pr-E2Crimson::hphMX*, para expressão constitutiva da variante E2Crimson de RFP, utilizando o promotor constitutivo de *TDH3* (gene para gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase – *GAPDH* – isoenzima 3; (CANKORUR-CETINKAYA *et al.*, 2012). Os marcadores *can1Δ*, *TDH3pr-E2Crimson::hphMX* e *STE2pr-LEU2* estão todos no mesmo locus, para aumentar a eficiência da seleção final de haploides. Por fim, estas linhagens também possuem os alelos marcados do gene de eIF5A, *HYP2* (*TIF51A*), selvagem (*HYP2::natMX4*) e mutante (*hyp2-3::natMX4*). A Figura 6 apresenta um resumo da estratégia utilizada para gerar a coleção de linhagens ORFs-GFP mutantes de eIF5A (*hyp2-3*).

Figura 6. Esquema da estratégia de SGA utilizada neste trabalho. A linhagem *query* MAT α foi cruzada com a coleção de leveduras ORF-GFP MAT α em meio de cultura YPD (*Yeast Peptone Dextrose*), resultando em linhagens diploides (MAT α/α), que foram transferidas para meio de seleção dupla e tripla em meio sintético completo (SC). Em seguida, os diploides foram transferidos para meio de esporulação sólido. Por fim, os .seleção apropriadas para permitir somente o crescimento das células desejadas, do tipo MAT α . Estão representados os genes para eIF5A selvagem, *HYP2* (*TIF51A* - azul), e os genes para eIF5A nas *queries*, fusionados com *natMX* (marca de resistência a nourseotricina), selvagem *HYP2* (azul com listras brancas) e mutante *hyp2-3* (branco com listras azuis), o gene para *E2crimson* (vermelho) e a fusão ORF (preto) da coleção com GFP (verde).



Fonte: autora deste trabalho

No primeiro dia foram feitos inóculos das linhagens *query* (MAT α) em meio YPD (Yeast Peptone Dextrose - 1% Extrato de levedura, 2% Dextrose (D-glicose), 2% Peptona) sólido para obter crescimento tipo “tapete” e então as linhagens da coleção ORF-GFP foram plaqueadas em meio sintético completo (SC) sem histidina (SC-his), uma vez que a marca de seleção da coleção GFP é *HIS3*.

Após o crescimento em estufa 25 °C por 2 dias nos meios adequados, as linhagens da coleção GFP foram cruzadas com as linhagens *query* (selvagem ou mutante) em placas de meio YPD, utilizando-se o equipamento *Rotor HDA* (Singer Instruments), gerando então 24 placas (12 placas para coleção selvagem e 12 placas para coleção mutante), as quais foram incubadas em estufa a 25 °C por 2 dias (chegando ao Dia 3).

Após o crescimento das colônias plaqueadas, foi iniciada a etapa de seleção de diploides (MAT α /a), repassando as colônias em meio de cultura SC sem histidina contendo 300 µg/mL de higromicina B e incubadas por 2 dias a 25 °C (chegando ao Dia 5).

Foi repetida a seleção de diploides, incluindo a marca de seleção para o gene *HYP2*, que confere resistência à nourseotricina. Desta maneira, as colônias foram repassadas em meio de cultura SC sem histidina contendo 300 µg/mL de higromicina (*Gold Bio – Gold Biotechnologies Inc.* EUA) e 100 µg/mL de nourseotricina (*Gold Bio – Gold Biotechnologies Inc.* EUA) e incubadas por 2 dias a 25 °C (chegando ao Dia 7).

Após o crescimento das linhagens diploides, as coleções foram repicadas em meio de esporulação enriquecido com ¼ da concentração usual de nourseotricina (SPO enriquecido - 10 g de acetato de potássio; 1 g de extrato de levedura; 0,5 g de glicose; 20 g de ágar; 990 mL de água destilada; 10 mL da mistura contendo 0,714 g de uracila, 0,714 g de histidina 3,571 g de leucina em 500 mL com 25 µg/mL de nourseotricina para 1 L), e incubadas por 14 dias a 25 °C, acompanhando-se a esporulação em microscópio a cada 3 dias (chegando aos Dias 10-21).

Após a esporulação, foi feita a pré-seleção dos haploides MAT α em meio de cultura SC sem histidina, sem leucina, sem lisina, sem arginina, com 50 µg/mL de canavanina (Santa Cruz Biotecnologia, Inc) e 50 µg/mL de tialisina (Sigma Aldrich) e incubadas por 2 dias a 25 °C (chegando ao Dia 23).

Na seleção final de haploides as linhagens foram crescidas em meio de cultura SC sem histidina, sem leucina, sem lisina, sem arginina, com 50 µg/mL de canavanina, 50 µg/mL de tialisina mais 100 µg/mL de nourseotricina e 300 µg/mL de higromicina e incubadas por 2 dias a 25 °C (chegando ao Dia 25).

Esta última etapa de seleção foi feita duas vezes para garantir a seleção das células desejadas (chegando ao Dia 27).

A coleção gerada foi fragmentada para placas de 96 poços e armazenada em ultrafreezer -80 °C em meio de cultura líquido seletivo com glicerol 30%.

4.2. Condições de crescimento das coleções ORFs-GFP/E2Crimson selvagem e mutante *hyp2-3*

As novas coleções ORFs-GFP/E2Crimson selvagem e mutante *hyp2-3* obtidas foram novamente repassadas em meio para seleção final e incubadas por 2 dias a 30 °C, temperatura semipermissiva, em que o mutante *hyp2-3* já apresenta alguns sinais crescimento anormal, sem comprometer, por outro lado, a análise de fluorescência a ser realizada.

O experimento foi realizado em triplicada biológica, tanto para selvagem quanto para mutante e cada replicata é definida como um *array*. Portanto, o experimento é composto por 6 diferentes *arrays*: selvagem 1, selvagem 2, selvagem 3, mutante 1, mutante 2 e mutante 3.

4.3. Obtenção das imagens de crescimento celular e fluorescência

Após crescimento das linhagens na temperatura semipermissiva (30 °C), as 24 placas foram individualmente fotografadas com uma câmera digital através do equipamento spImager (S&P Robotics Inc.) para posterior análise de tamanho das colônias.

A intensidade de fluorescência foi medida diretamente a partir das colônias obtidas em placas de meio sólido utilizando o equipamento *Typhoon Trio Variable Mode Imager* (GE Healthcare), um fotodocumentador de fluorescência que produz imagens digitais de alta resolução. Os parâmetros de aquisição de fluorescência utilizados foram:

Laser 1: 488 nm, filtro de emissão: 520 BP40 – Filtro para GFP.

Laser 2: 532 nm, filtro de emissão: 580 BP30 – Filtro para E2Crimson.

Além disso, para cada laser, foram utilizados 3 ajustes de voltagem do *Photomultiplier Tube* (PMT), sendo 400, 500 e 600 para o filtro de GFP e 500, 550 e 600, para o filtro de E2Crimson. Esta variação no PMT foi feita para evitar que as intensidades de fluorescência detectadas para GFP e E2Crimson de algumas colônias ficassem abaixo ou acima dos limites de detecção linear do *Typhoon*.

4.4. Extração de dados de tamanho de colônia pelo *SGA Tools*

O tamanho das colônias, em número de *pixels*, foi estimado pelo software de análise *SGA Tools* (WAGIH *et al.*, 2013), utilizando as imagens obtidas pela fotografia das placas (descrita no item 2.3). Neste programa, cada arquivo com extensão “.jpg” das placas individuais é carregado e o formato da placa é selecionado. Como resultado, foi obtido a conversão da imagem de cada colônia da placa em seu respectivo número de pixels (*row colony size*).

4.5. Extração de dados de fluorescência através do *GenePix*

As imagens resultantes da fotodocumentação em *Typhoon* foram quantificadas utilizando-se o software *GenePix Pro version 3.0*. Para isso, ambos os arquivos do *Typhoon*, GFP e *E2Crimson* (com extensão “.gel”), foram abertos simultaneamente no software *GenePix*, e se atribuiu para cada uma das imagens o comprimento de onda adequado, ou seja, 488 nm para as imagens “GFP.gel” e 532 nm para “E2Crimson.gel”.

Foi necessário desenhar um gabarito de círculos para individualizar as 384 colônias de uma placa, criando-se, assim, um bloco com as seguintes características:

Number of columns: 24

Column spacing (µm): 461,5

Number of rows: 32

Row spacing (µm): 225,2

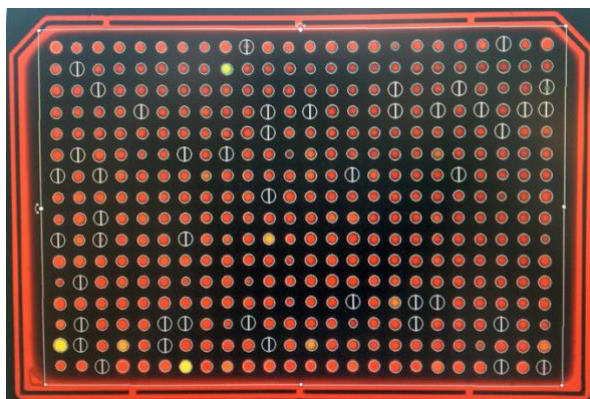
Feature diameter (µm): 250

Feature Layout: Orange Packing #4

A grade desenhada foi posicionada, arrastando-a sobre colônias na imagem e alinhando os círculos próximo às colônias (Figura 7). Este bloco foi replicado por toda a imagem de placas.

É necessário se certificar de que todas as colônias existentes foram detectadas. Os pontos vazios ou não detectados são indicados por Ø, como exemplificado na Figura 7. Ao clicar em “*Analyse*” uma planilha de dados contendo os valores de mediana da intensidade de fluorescência *foreground* e *background* da colônia, tanto de GFP quanto de E2Crimson, é gerada.

Figura 7. Ilustração do bloco do *GenePix* para delimitar a obtenção de fluorescência de cada colônia. Imagem de sobreposição de verde e vermelho gerada a partir das intensidades de fluorescência de GFP e de *E2Crimson* de uma placa da coleção, ilustrando o gabarito desenhado para extração das respectivas fluorescências da imagem.



Fonte: autora deste trabalho

Ao final desta análise, foi gerada uma planilha na qual, para cada colônia, foi atribuído o nome do gene correspondente à ORF fusionada a GFP e as informações de mediana da intensidade de fluorescência de cada *array* foram pareadas. Nesta tabela, totalizou-se 4.148 genes (entradas).

4.6. Análise de dados do crescimento celular

A partir da distribuição observada dos valores de “*raw colony size*” para cada condição experimental, selvagem e mutante, determinou-se o limite mínimo para o tamanho de colônia, baseado na análise da distribuição *z*. Desta forma, foram calculados os valores de *z* para cada tamanho de colônia, ou seja, o número de desvios padrões que o tamanho daquela colônia encontra-se acima ou abaixo da média da condição, considerando $p < 0.01$.

4.7. Análise de dados de fluorescência

Para cada gene é calculada a razão das intensidades de fluorescência de GFP por *E2Crimson*. Estes valores foram, então, normalizados pela mediana das razões do *array*, convertidos para o logaritmo na base dois ($\log_2$) e aplicada a normalização entre *arrays* pelo algoritmo de LOESS (*locally estimated scatterplot smoothing* - (CLEVELAND; CLEVELAND, 2007)), o qual elimina as possíveis variações dependentes da metodologia, ao invés de variações biológicas das amostras. Os detalhes da análise estão descritos a seguir.

4.7.1. Filtragem e seleção das colônias de qualidade

A partir dos dados da análise de crescimento celular, 149 colônias com tamanho significativamente abaixo da média, considerando $p < 0.01$ para uma distribuição normal, foram removidas da tabela de análise de fluorescência. Além disso, foram também retiradas 22 entradas que apresentavam valor de fluorescência acima de 65.535, que é o limite máximo de detecção do equipamento *GenePix*. Outros 310 genes foram perdidos no processo de cruzamento da coleção ORFs-GFP, pois não tiveram colônias representativas para nenhuma das condições selvagem ou mutante. Assim, 3.667 genes foram para as próximas análises.

4.7.2. Correção do *background*

A correção do *background* de cada gene consiste na subtração dos valores de intensidades do *background* dos valores de *foreground*, para as medidas de GFP e E2Crimson (ESTEVES, 2007). Este cálculo pode gerar valores negativos ou nulos para GFP quando a expressão da proteína fusionada a GFP possuir baixos níveis celulares. A ocorrência destes valores prejudica análises posteriores, pois é um falso indicativo de fluorescência negativa, o que não ocorre. Para corrigir tais valores, é inferido um número inteiro positivo arbitrário (*F*) tal que seu produto com o valor de E2Crimson somado ao valor de GFP, torne todos os valores negativos ou nulos em positivos, não afetando, assim, os valores finais da razão GFPcorrigido:E2Crimson.

$$GFP_{corrigido} = GFP + (E2Crimson \times F)$$

Esta transformação matemática é feita para todos os genes avaliados, mesmo aqueles com valores positivos de GFP após a subtração do *background*, para, assim, não afetar a análise estatística final, pois todos os valores passam pela mesma modificação (SMYTH; SPEED, 2003).

4.7.3. Normalização

A partir dos dados corrigidos de fluorescência, calculou-se a razão das intensidades de GFPcorrigido por E2Crimson e, em seguida, foi feita uma normalização desta razão pela centralização com a mediana. Esta normalização consiste no cálculo da mediana de cada um dos seis *arrays* e, posteriormente, cada valor de razão é dividido pela mediana de seu respectivo

array. Estes valores foram transformados em logaritmo na base dois e denominados como $\log_2$ (selvagem) e $\log_2$ (mutante).

A correlação de Pearson (r) foi utilizada para verificar a associação entre as replicatas de cada condição.

4.7.4. Gráficos “M” x “A”

Os dados de intensidade de fluorescência são tradicionalmente visualizados utilizando gráficos de dispersão do tipo “MA”, onde, neste estudo, “M” (*minus*) representou a subtração e “A” (*add*) representa média dos valores de $\log_2$ (mutante) e $\log_2$ (selvagem), fixando os valores para “selvagem 1” como referência.

$$M = \log_2(\text{mutante}) - \log_2(\text{selvagem 1})$$

$$A = \frac{\log_2(\text{mutante}) + \log_2(\text{selvagem 1})}{2}$$

Este tipo de gráfico centraliza a dispersão na abscissa, sendo necessário para a visualização dos dados, auxiliando na escolha de normalizações posteriores.

4.7.5. Normalização pelo método de LOESS

O método de normalização de LOESS é utilizado para corrigir dados de “M” para cada *array* separadamente, sendo uma normalização dentro do *array*.

Para a realização deste passo, primeiramente, os dados de cada *array* foram classificados por ordem crescente de valores de “A” e, então, calculou-se a média móvel de cada gene, que corresponde à média dos valores “M” dos 40 genes consecutivos a este. Obtida a média móvel, calculou-se o valor “M’”, obtido pela subtração da média móvel do valor “M”. Igualmente, é calculado a média móvel de “M’”, que corresponde à média dos valores “M’” dos 40 genes consecutivos a este.

4.7.6. Teste estatístico

A diferença de expressão entre as duas condições, selvagem e mutante, utilizando os valores de “M’” foi testada por *t* de Student bicaudal, para cada gene.

Foram considerados diferencialmente expressos os genes que apresentaram valores de “p” menor ou igual ao FDR (*False Discovery Rate*), considerando um α de 0,35. A sua

importância deve-se ao fato de excluir falsos positivos na obtenção dos genes diferencialmente expressos.

Para o cálculo do FDR, os valores “p” obtidos no teste t foram organizados em ordem crescente. Criou-se, então, um índice “i” para estes valores (de 1 a 3667), que foi dividido pelo tamanho amostral (k) e multiplicado por α de 0,35.

$$FDR = \frac{i}{k} \times \alpha$$

4.8. Análise bioinformática das proteínas diferencialmente expressas

4.8.1. Classificação por Ontologia Genética

Foram analisados os resultados em nível biológico, utilizando a abordagem de testes estatística do enriquecimento de ontologias, neste caso, as identificações de GO (Ontologia genética ou *Gene Ontology*), que permitem classificar e catalogar os genes segundo vários domínios, nomeados em relação ao componente celular, processo biológico e função molecular de um determinado organismo (ASHBURNER *et al.*, 2000).

Para tanto, foi utilizado o software *Gene Ontology Enrichment* do site *Yeastmine* (<https://yeastmine.yeastgenome.org/yeastmine/begin.do>) para determinar as classificações de GO. Após obter as listas, utilizou-se o *REVIGO* (<http://revigo.irb.hr/>), um servidor da web que resume listas longas e ininteligíveis de termos GO, encontrando um subconjunto representativo dos termos usando um algoritmo de *cluster* simples que se baseia em medidas de similaridade semântica (SUPEK *et al.*, 2011).

4.8.2. Identificação de proteínas contendo *motifs* específicos

Usou-se a função “*Analyze Pattern Matching*” do banco de dados *Saccharomyces Genome Database* (SGD), que permite a identificação de padrões e *motifs* através da busca por pequenas sequências de peptídeos ou nucleotídeos dentro do genoma de *S. cerevisiae* (<http://www.yeastgenome.org/help/analyze/pattern-matching>).

4.9. Quantificação de proteínas em fusão com TAP (*Tandem Affinity Purification*) ou GFP por *western blot*

As linhagens de interesse para validação do rastreamento realizado foram obtidas na coleção ORFs-TAP ou ORFs-GFP selvagem *HYP2* e mutante *hyp2-3*, para quantificação dos níveis proteicos pela técnica de *western blot*.

As linhagens foram crescidas em 2 mL de meio de cultura líquido seletivo (SC sem histidina, sem leucina, sem lisina, sem arginina, com 50 µg/mL de canavanina, 50 µg/mL de tialisina mais 100 µg/mL de nourseotricina e 300 µg/mL de higromicina), em temperatura permissiva (25 °C), sob agitação constante até a saturação do número de células. Em seguida, as células foram diluídas em 3 mL do mesmo meio seletivo para DO de aproximadamente 0,070 para os mutantes e 0,035 para os selvagens, e novamente crescidas em temperatura permissiva (25 °C), sob agitação constante por um período de cerca de 12 a 18 horas, até a fase exponencial (0,4 a 0,8), e então submetidas a mudança para temperatura semipermissiva de 33° C sob agitação em banho-maria por 5 horas. Após esse período, foi centrifugado 1,7 mL de uma cultura celular de D.O. 0,8, dessa maneira, os inóculos foram normalizados por número de células e o precipitado celular foi lisado em 50 µL de tampão de lise (Tris-HCl 50mM, pH 7,5, SDS 5%, glicerol 5%, DTT 50mM, 5mM EDTA, e PLAC 2x – Pespstatina 10 µg/mL, Leupepina 10 µg/mL, Aprotinina 10 µg/mL, Antipaina 10 µg/mL e Quimostatina µg/mL) e 15 minutos de fervura em bloco de aquecimento 96 °C. O lisado celular foi clarificado por centrifugação a 14.000 xg por 15 min e o extrato proteico (sobrenadante) foi estocado a -20 °C.

A quantificação do extrato total proteico foi feita utilizando o *kit DC Protein Assay* (Bio-Rad). Amostras do lisado celular contendo de 7 a 10 µg de proteínas totais foram desnaturadas em tampão contendo à 95 °C por 5 min logo antes da separação por eletroforese em gel de poliacrilamida 12%. Aplicou-se em cada gel o *ladder* de proteínas *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific) para estimar o peso molecular nas proteínas em estudo. Os géis correram a 120 V por 80 minutos e foram transferidos pelo equipamento *Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell* (BioRad) a uma membrana de nitrocelulose 0,2 µm (Bio-Rad) a 20 V por 30 minutos. Antes da transferência, as membranas e papéis de filtro foram embebidas no tampão de transferência (glicina 192 mM, Tris-HCl 25 mM, metanol 20%, pH 8.3). A eficiência da transferência foi monitorada por coloração com solução de *Ponceau S* (*Ponceau S* 1 mg/mL, ácido acético 5%). As membranas foram bloqueadas em tampão PBST (*phosphate buffered saline* - PBS 1X, Tween-20 0,25% - NaCl 137 mM, NaHPO₄ 10 mM, KCl 2.7 mM, e um pH de 7.4) contendo 10% de leite desnatado sob agitação por 30 minutos. Em seguida, a membrana foi incubada com uma diluição adequada de anticorpo primário em PBST,

por 16 horas a 4 °C sob agitação constante. Após esse período, a membrana foi lavada três vezes com PBST e incubada novamente com uma diluição adequada de anticorpo secundário (anti-IgG conjugado com peroxidase) em PBST, por uma hora a temperatura ambiente. Após três novas lavagens com PBST, a membrana foi submetida a tratamento com reagentes quimioluminescentes (*Amershan ECL* – GE Healthcare) para aumentar o sinal na detecção pelo sistema *C-DiGit Blot Scanner* (LI-COR).

As análises foram feitas utilizando o anticorpo primário contra GFP (1/1,000; Sigma catalogue number G1544), o anticorpo Peroxidase Anti-Peroxidase *Soluble Complex*, na diluição 1:4.000 (Sigma P1291) para detecção de TAP, o anticorpo primário policlonal de coelho anti-eIF5A, de levedura, na diluição 1:10.000 (VALENTINI *et al.*, 2002), o anticorpo primário policlonal de coelho anti-Rpl5, de levedura, na diluição 1:15.000 (BARBOSA *et al.*, 2016; GHAEMMAGHAMI *et al.*, 2003), anticorpo anti-GFP (Millipore, Cat. No. G1544), o anticorpo primário policlonal de coelho anti-eEF2, de levedura, na diluição 1:20.000 (Rossi *et al.* 2016) e anticorpo primário policlonal de coelho anti-Pub1, de levedura, na diluição 1:10.000 (APPONI *et al.*, 2007).

O anticorpo secundário de coelho anti-IgG conjugado com peroxidase, na diluição de 1:20.000 (Sigma catálogo no.A9169) foi usado para amplificar o sinal luminescente, o qual foi detectado usando o reagente *ECL Prime Western Blotting Detection* (GE Healthcare) e exposto no detector C-Digit System (LICOR). As intensidades das bandas foram determinadas utilizando o *software* ImageJ. Os *imunoblots* apresentados são representativos de três experimentos independentes e os anticorpos específicos utilizados estão indicados próximo às imagens.

4.10. Teste de sensibilidade a temperatura para verificar perda de função mitocondrial

4.10.1. Teste de crescimento em meio sólido

As linhagens selvagem (VZL1363) e mutante (VZL1364) foram inoculadas em meio YPD seletivo, contendo 300 µg/mL de higromicina B e 100 µg/mL de nourseotricina, e incubadas de 12 a 16 horas em temperatura permissível de 25 °C.

Após crescimento até fase exponencial, foi determinada a D.O. 600 nm para cada um dos inóculos em uma diluição de 1:10, e uma alíquota de 500 µL de cada foi centrifugada por 7 minutos à 2.500 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em volumes de glicerol 50% (m/v) correspondentes às D.O.s determinadas previamente, a fim de se obter uma concentração de $2,5 \times 10^8$ células/mL.

Em sequência, uma microplaca de 96 poços foi preparada transferindo-se 200 μL de cada suspensão de células para o primeiro poço e 180 μL de glicerol 50% para os 5 poços subsequentes. Uma diluição seriada de passagem 1:10 foi então conduzida transferindo-se 20 μL do primeiro poço para o segundo, seguida de homogeneização, e o processo repetido para os poços seguintes. Com um micropipetador multicanal, 2,5 μL de cada diluição foram aplicados nos meios escolhidos para o estudo, e as placas incubadas nas temperaturas de 25 °C (controle), 30 °C e 33 °C. Os tempos de crescimento variaram de 3 a 6 dias, de acordo com meio utilizado.

Todos os experimentos foram realizados em duplicata experimental e triplicata biológica.

4.10.2. Teste de crescimento quantitativo em fonte de carbono não fermentável durante inibição de hipusinação em meio líquido

As células de levedura selvagem e mutante foram crescidas a 30 °C em 10 mL de meio YPD até aproximadamente $1\text{-}2 \times 10^7$ células/mL. Em seguida, as células foram diluídas para uma concentração de partida de aproximadamente $1\text{-}2 \times 10^6$ células/mL (D.O. 600 nm = 0,1-0,2). 150 μL destas diluições foram transferidos em triplicata para poços de microplaca em formato de 96 poços de fundo chato SPL (código 004393) contendo ou não 1 mM de aminoguanidina junto com 100 μM de GC7 em meio de cultura YPD ou YP glicerol. Os valores da D.O. 600 nm foram registrados periodicamente a cada 30 minutos, por um período total de 16 horas pelo equipamento *Infinite 200 Pro* (TECAN).

4.11. Consumo de Oxigênio (O₂)

As células selvagem *HYP2* (SVL1363) e mutante *hyp2-3* (SVL1364) foram crescidas até a fase exponencial a 25 °C e então transferidas para a temperatura semi-permissiva (33 °C) durante 8 horas em meio YP com glicerol 2%. Subsequentemente, estas células foram centrifugadas e o *pellet* foi resuspendido em meio YP com glicerol 2% a uma concentração celular de aproximadamente 20 D.O. 600 nm/mL (KNUPP *et al.*, 2017). O fluxo de O₂ foi determinado através da medida de queda da concentração de O₂ na câmara do oxígrafo contendo 2,1 mL do mesmo meio de cultura na concentração de D.O. 600 nm/mL. O fluxo de O₂ foi monitorado através do respirômetro de alta resolução *Oxygraph-2k Respirometer* (Oroboros Instruments), equipado com o pacote *DatLab Software* (Oroboros Instruments) para a aquisição

dos dados (intervalos de tempo de 2 segundos) e análises, sob temperatura controlada (33 °C) e agitação (300 rpm).

4.12. Quantificação de potencial de membrana mitocondrial com TMRE (*Tetramethylrhodamine Ethyl Ester*) em citômetro de fluxo

As linhagens foram crescidas em 2 mL de meio de cultura líquido, em temperatura permissiva (25 °C), sob agitação constante até a saturação do número de células. Em seguida, as células foram diluídas em 3 mL do mesmo meio de cultura para D.O. 600 nm de aproximadamente 0,070 para os mutantes e 0,035 para os selvagens, e novamente crescidas em temperatura permissiva (25 °C), sob agitação constante por um período de cerca de 12 a 18 horas, até a fase exponencial (0,4 a 0,8 D.O. 600 nm), e então submetidas à temperatura de 37° C sob agitação por 4 horas, seguidos de 30 minutos de incubação com TMRE (Biotium) em uma concentração final de 200 nM. Após este período, foram centrifugados 1 mL cultura celular e as células lavadas com PBST suplementado com 10 nM de glicose. A análise quantitativa dos sinais de fluorescência foi realizada com o equipamento *DxP FacScan* (BD Biosciences, San Jose, CA).

4.13. Microscopia de fluorescência

As linhagens foram crescidas em 2 mL de meio de cultura líquido, em temperatura permissiva (25 °C), sob agitação constante até a saturação do número de células. Em seguida, as células foram diluídas em 3 mL do mesmo meio de cultura para D.O. 600 nm de aproximadamente 0,070 para os mutantes e 0,035 para os selvagens, e novamente crescidas em temperatura permissiva (25 °C), sob agitação constante por um período de cerca de 12 a 18 horas, até a fase exponencial (0,4 a 0,8 D.O. 600 nm), e então submetidas à temperatura de 37 °C por 4 horas. Após esse período, foi centrifugado 1 mL de uma cultura celular, as células foram lavadas em HEPES suplementado com 10 mM de glicose. Após centrifugação, as células foram ressuspensas em 100 µL de HEPES suplementado com 10 mM de glicose, aderidas em lamínulas cobertas com concanavalina A (Sigma Aldrich) e submetidas a microscopia. A fluorescência foi visualizada usando o microscópio confocal *Zeiss LSM700* com objetiva x100, abertura numérica de 1.5, e lentes com óleo de imersão. Os dados brutos foram coletados como *z-stacks* e representados em imagem única como *maximum-intensity projections* (ImageJ).

4.14. Quantificação de DNA mitocondrial

As linhagens de levedura selvagem e mutante *hyp2-3* foram preparadas como descritos anteriormente no item 2.15 e o DNA foi extraído usando o *kit Yeast DNA Extraction Y-PER Reagent* (Thermo Scientific, Cat. No. 78870) de acordo com as instruções do fabricante. As reações de PCR foram realizadas em 20 µL em placa de 96 poços utilizando *iTaq™ Universal SYBR Green Supermix* (Bio-Rad Laboratories, Cat. No. 172-5124) de acordo com as instruções do fabricante no instrumento *CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System* (Bio-Rad). Os seguintes *primers* foram utilizados: GAL4 *forward*, 5' TTT CTC CTG GCT CAG TAG GGC; GAL4 *reverse*, 5' AGT TAC GAG AGG GTG GAC GGT; COX3 *forward*, 5' ATT GAA GCT GTA CAA CCT ACC GAA TT; COX3 *reverse*, 5' CCT GCG ATT AAG GCA TGA TGA. A análise de dados foi feita com *CFX Maestro Software* (Bio-Rad) e calculado de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

4.15. Ensaios utilizando *Saccharomyces cerevisiae* como modelo para avaliar a dependência de eIF5A para tradução de proteínas com sequencias de poli-prolinas de levedura Ldb17 e de mamíferos S6K

4.15.1. Anticorpos

Anticorpos primários utilizados nesta etapa do trabalho foram: anti-FLAG (produzido em coelho) numa diluição de 1:10000 e anti- α -tubulina numa diluição de 1:5000 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), anti-GAPDH numa diluição de 1: 2000 (Life Technologies), anti-S6 fosforilado em Ser 240/244 a uma diluição de 1: 2000 (produzido em coelho), anti-S6 total (produzido em camundongo) a uma diluição de 1: 2000, anti-S6K1 a uma diluição de 1: 5000 (célula Signaling Technology, MA, EUA), anti-S6K2 a 1:2000 (Thermo Fisher Scientific), anti-RPL5 em 1: 15000 e anti-yeIF5A a uma diluição de 1: 5000, ambos produzidos em coelho (BARBOSA *et al.*, 2016).

4.15.2. Construções plasmidiais

Os plasmídeos pFLAG-p70-S6K1 e pFLAG-p54-S6K2 foram previamente obtidos (PAVAN *et al.*, 2016). Para a produção de pFLAG-S6K2 Δ Pro, foi utilizado como molde o plasmídeo pFLAG-p54-S6K2. A mutação na construção de poliprolina FLAG-S6K2 Δ Pro foi realizada por PCR com iniciadores reversos contendo as bases correspondentes aos

aminoácidos da mesma região do S6K1 homólogo. A clonagem das proteínas S6Ks humanas no vetor pYES2 foi usada como molde nas construções pFLAG-p70-S6K1, pFLAG-p54-S6K2, pFLAG-S6K2ΔPro.

4.15.3. Experimentos com leveduras

Linhagens de levedura *S. cerevisiae* VZL 1074 (MATa *ura3 leu2 his3 kanMX4-tetOpr-TIF51A ura3::CMV-tTA*), com expressão do gene *TIF51A* endógeno (homólogo do gene eIF5A humano) controlado por um promotor reprimível por tetraciclina ou doxíciclina (TET-OFF), foi transformado com os plasmídeos pYES-S6K2, pYES2-S6K2ΔPro e pBG1805-LDB17, sob o promotor GAL1 (induzido pela galactose). Inicialmente, essas cepas foram cultivadas em meio de cultura SC-ura contendo rafinose e na presença ou ausência de doxíciclina no primeiro ensaio por 7 horas. Nesse momento, o conteúdo da proteína eIF5A já havia começado a diminuir nos frascos contendo doxíciclina. 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 teste, o conteúdo dos frascos foi centrifugado a 5000 x g e o meio de cultura foi substituído por meio contendo galactose e com ou sem doxíciclina. Deste modo, a produção das proteínas S6Ks e LDB17 foi induzida por 5 horas, com a repressão do promotor de eIF5A ocorrendo durante todo o ensaio de 12 horas.

4.16. Perfil transcricional do mutante *hyp2-3*

4.16.1. Preparo da cultura de leveduras

As linhagens selvagens (VZL1363) e mutantes *hyp2-3* (VZL1364) foram crescidas em 4 mL de meio de cultura líquido rico YPD (com 100 µg/mL de nourseotricina e 300 µg/mL de higromicina), em temperatura permissiva (25 °C), sob agitação constante durante a noite até a saturação do número de células. Devido às diferenças de crescimento entre selvagem e mutante, o cultivo do mutante iniciou-se no dia 1, enquanto que a cultura do selvagem no dia 2.

No terceiro dia, cada réplica biológica foi diluída em 25 mL de meio rico YPD suplementado com 100 µg/mL de nourseotricina e 300 µg/mL de higromicina e os inóculos retornados ao crescimento em agitador orbital a 200 rpm a 25°C por uma noite.

No quarto dia, as culturas foram diluídas, selvagens VZL1363 para O.D._{600nm} = 0,03 e mutantes VLZ1364 para O.D._{600nm} = 0,07 em 200 mL de meio YPD sem suplementação de drogas, em frascos de 500 mL, e ao crescimento em agitador orbital a 200 rpm a 25°C 11-12

horas, até atingirem $O.D.600nm = 0,5 - 0,7$. Então, diluir as culturas selvagens VLZ1363 para $O.D.600nm = 0,05$ e mutantes VLZ1364 para $O.D.600nm = 0,1$ em 1 L de meio YPD.

Mudar as culturas para agitador orbital 200 rpm a 30°C e deixar as culturas crescerem até atingirem $O.D.600nm$ aproximadamente 0,8-1,0.

4.16.2. Coleta de células

Ao atingir $O.D.600nm$ aproximadamente 0,8–1,0 os volumes de interesse das culturas são coletadas uma de cada vez, através de filtração em membranas 0,22 μm . Para RNA-Seq total foi utilizado um volume de cultura de 200mL. Então as células filtradas são raspadas em movimento único, utilizando espátulas metálicas previamente refrigeradas, e submersas em nitrogênio líquido.

4.16.3. Lise celular

Para obter o extrato bruto celular, preparou-se 2mL do tampão de lise total para lisar 200 mL de cultura. O tampão de lise celular total compreende :MOPS-Potássio pH 7,2 50mM; Glutamato de potássio 275mM; acetato de magnésio 5 mM; DTT 1 mM; cicloheximida 100ug/mL; *Suprase-in* (Ambion) 200U/mL; *Complete Protease Inhibitor Cocktail EDTA-free* (Roche) 1 tablete para 50 mL de tampão, Triton X-100 1%, sulfato de heparina 0.2 mg/mL e PMSF 1 mM.

As alíquotas de tampão foram congeladas gota a gota em nitrogênio líquido e combinadas com as células coletadas e congeladas numa câmara de moinho de bolas (MM-301 CryoMill - Retsch) previamente refrigeradas, e pulverizadas através de dois ciclos de 1 minuto a 20 Hz. As células pulverizadas foram descongeladas em banho-maria à temperatura ambiente. Os lisados foram imediatamente centrifugados por 10 min a 10.000 x g (adaptado de CHARTRON; HUNT; FRYDMAN, 2016).

4.16.4. Extração de RNA total e análise da qualidade

A extração de RNA total foi feita através do método extração por SDS-fenol à quente. Primeiramente, pré-aquece-se 0,75 mM de fenol ácido para 65 oC. Adicionou-se 40 μL de SDS 20% a 0,70 mL de extrato bruto celular clarificado celular. Essa mistura foi aquecida por 5 min a 65 oC com agitação seguido de refrigeração em gelo por 5 min. As amostras são centrifugadas a 20.000 x g e imediatamente a fase superior é transferida para um novo tubo. Outros 0,70 mL de fenol ácido é adicionado e incubado por e novamente centrifugados a 20.000 x g e

imediatamente a fase superior é transferida para um novo tubo. Então, adiciona-se 0,60 mL de clorofórmio e agita-se em vórtex por 30 s à temperatura ambiente. Centrifuga-se por 2 min a 20.000 x g, e a fase superior é transferida para um novo tubo pré-lubrificado (Corning, Cat no 3207) para evitar que RNA fique aderido às paredes do tubo. O RNA total é precipitado com adição de 1/9 do volume de NaOAc pH 5,5 3M, para uma concentração final de 0.3M de NaOAc e 1 mL de isopropanol. A mistura é refrigerada por pelo menos 30 min a -30 °C. Por fim, centrifuga-se por 30 min a 20.000 x g à 4 °C para decantar os ácidos nucleicos. O sobrenadante é removido e o *pellet* é lavado com 0.75 mL de etanol 80% gelado. Os tubos são rapidamente centrifugados para remover o etanol residual e as amostras são secas através de ar e ressuspendidas em 0.50 mL de Tris pH 7 a 10 mM (INGOLIA, 2010).

As amostras de RNA são purificadas utilizando o *kit* RNeasy Mini Kit (Cat No 74104), seguindo as normas do fabricante, e o RNA purificado é submetido ao tratamento em coluna com o *kit* Qiagen Rnase-Free Dnase Set (Cat No 79254) para degradação de DNA genômico.

Para analisar a integridade do RNA foi realizado eletroforese capilar das amostras, através do sistema Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies®), protocolo padrão para RNA. A qualidade do RNA foi verificada pelo *RNA Integrity Number* - RIN.

4.16.5. Preparo das bibliotecas para sequenciamento

Os mRNAs foram purificados utilizando o *kit* Ribo-Zero Gold rRNA Removal Kit (Yeast) de acordo com as instruções do fabricante. E as bibliotecas foram preparadas utilizando o *kit* TruSeq Stranded Total RNA kit (ILLUMINA - Document # 1000000040499 v00), foram quantificados por qPCR (KAPA Library Quantification Kits for Illumina platforms v1.14) e a análise de fragmento realizada através do DNA 1000 *chip* (Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer), e sequenciada utilizando um *NextSeq* (Illumina).

4.16.6. Análises de bioinformática

Para o alinhamento foi utilizado o programa Kallisto (versão 0.44.0) (BRAY et al., 2016) que quantifica abundância de transcritos usando pseudo-alinhamento, que não alinha base por base de uma sequência e sim k-mers, possibilitando um pseudo-alinhamento ultra rápido comparado com outros programas disponíveis (PACHTER, 2015).

A análise bioinformática englobou outros softwares além do alinhamento, como Sleuth (versão 0.46.0) no R para análise de expressão gênica diferencial (PIMENTEL et al., 2017), análise de enriquecimento para *Gene Ontology* (GO) através do banco de dados do *YeastMine* (<https://yeastmine.yeastgenome.org/yeastmine/begin.do>) e REVIGO para construções de tabelas sumarizadas (<http://revigo.irb.hr/>) (SUPEK et al., 2011).

Após a quantificação é possível fazer o cálculo das expressões diferenciais entre transcritos quantificados nas diferentes condições experimentais. A etapa de cálculo da expressão diferencial de genes tem como objetivo identificar os transcritos que são significativamente diferencialmente expressos por meio de testes estatísticos em larga escala (KHANG; LAU, 2015). Uma das características fundamentais para a diferença de expressão é considerar a variabilidade biológica das amostras, que corresponde à resposta individual aos diferentes estímulos a que um organismo é submetido resultando em uma variação entre os indivíduos (KROLL, 2002).

A primeira etapa da diferença de expressão é calcular a medida *Fold-change*, para avaliar a mudança entre o nível de expressão entre o selvagem *HYP2-3* e mutante de eIF5A *hyp2-3* (PIMENTEL et al., 2017).

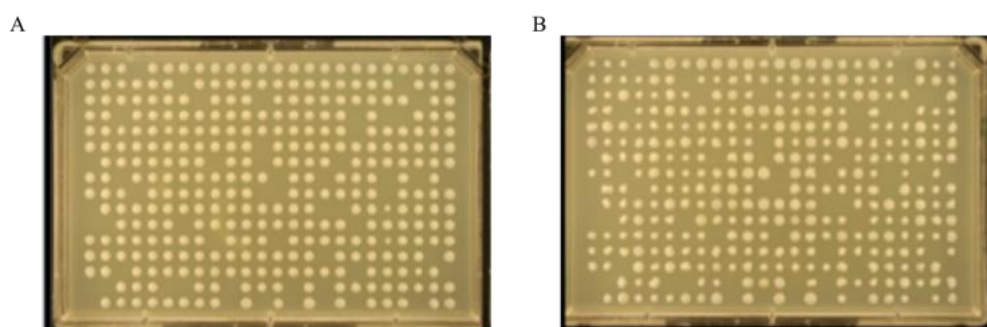
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Determinação de diferenças entre perfil proteômico de selvagem e mutante de eIF5A (*hyp2-3*) utilizando uma coleção de proteínas de fusão a GFP

Para entender o papel de eIF5A na tradução de genes específicos, foi realizada uma análise do perfil proteômico de *S. cerevisiae* através de fluorescência *in vivo* utilizando-se uma coleção de ORFs-GFP (HUH *et al.*, 2003) com *background* selvagem (*HYP2*) e mutante de eIF5A (*hyp2-3*), geradas pela metodologia SGA (*Synthetic Genetic Array*) (BARYSHNIKOVA *et al.*, 2010). Como normalizador interno, foi utilizada uma variação da proteína fluorescente vermelha (RFP) E2Crimson, sob o controle transcricional de um promotor constitutivo do gene de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*TDH3* em *S. cerevisiae*).

A Figura 8 apresenta o crescimento de uma placa da coleção de linhagem selvagem e da placa correspondente da coleção de linhagem mutante de eIF5A (*hyp2-3*), indicando o sucesso da geração dessas coleções. Após o cruzamento das linhagens *query* selvagem e mutante com a coleção ORFs-GFP, foram recuperadas 3.838 linhagens em ambas condições selvagem e mutante, o que representa aproximadamente 70% do proteoma de *S. cerevisiae* (HUH *et al.*, 2003).

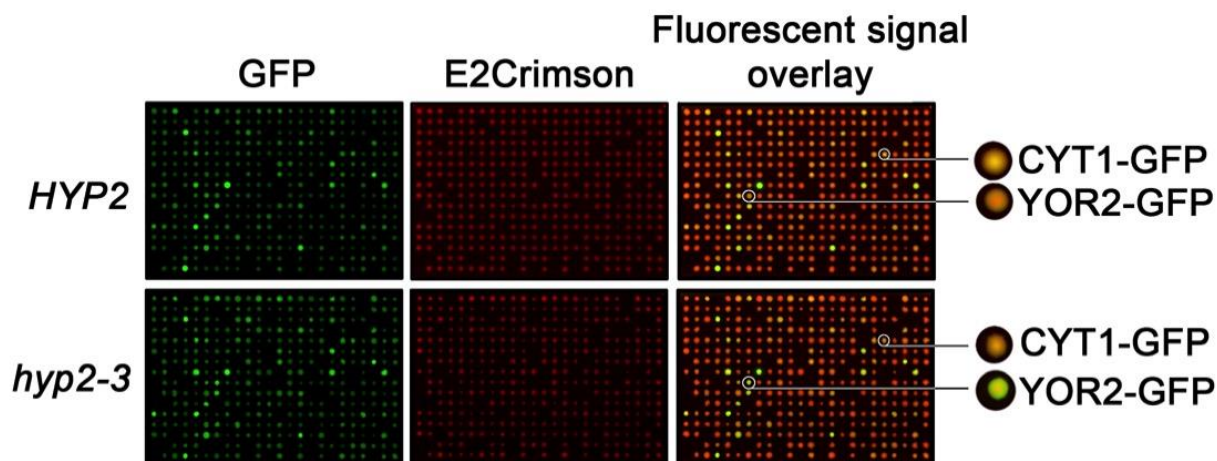
Figura 8. Placas das coleções GFP geradas para a linhagem selvagem (A) e mutante *hyp2-3* (B). Exemplo de uma das placas geradas em meio XXX através da metodologia descrita na Figura 6.



Fonte: autora deste trabalho.

Da mesma maneira, um exemplo de resultado de aquisição das imagens de fluorescência de GFP e E2Crimson sobrepostas está mostrado na Figura 9, com destaque para um resultado de diferença visível de cor entre duas colônias nas condições selvagem e mutante. Os outros clones presentes na placa aparecem mais ou menos verdes, o que reflete os diferentes níveis de proteínas fluorescentes que estão sendo produzidas pelas mesmas (GFP e E2Crimson).

Figura 9. Ilustração da fluorescência de uma placa da coleção. Imagem de sobreposição de verde e vermelho gerada a partir das intensidades de fluorescência de GFP e de E2Crimson de uma das placas da coleção da linhagem selvagem (A) e da placa correspondente da coleção da linhagem mutante *hyp2-3* (B). No destaque, estão ampliadas as colônias das linhagens *CYT1-GFP* e *YOR2-GFP*, demonstrando diferença visual entre os níveis de GFP do selvagem e do mutante.



Fonte: autora deste trabalho

5.2. Interações genéticas por análise de tamanho de colônias

Interação genética, por definição, é um fenômeno em que a função desempenhada por um determinado gene é modificada de acordo com a presença ou ausência de um ou mais genes. Dessa forma, a interação genética se caracteriza pela alteração não esperada de um determinado fenótipo, sendo observado apenas quando há combinação dos efeitos obtidos por dois ou mais genes modificados (BOONE; BUSSEY; ANDREWS, 2007; MANI *et al.*, 2008).

Neste caso, podemos considerar cada gene com fusão GFP no C-terminal como um gene modificado e em cada condição temos a presença de eIF5A (selvagem) e a sua ausência (mutante *hyp2-3*).

Com isso, o entendimento de como os genes interagem entre si e o que isso reflete fenotipicamente para um organismo contribui significativamente para o entendimento da função do gene em estudo, desde que esteja bem caracterizada a função dos parceiros genéticos. Portanto, as análises de interações genéticas têm sido utilizadas como uma importante ferramenta na caracterização de genes e vias metabólicas, identificando as correlações funcionais entre vários genes e seus produtos, de acordo com o tipo de interação observada (BOONE; BUSSEY; ANDREWS, 2007; DIXON *et al.*, 2009; MANI *et al.*, 2008).

As interações genéticas podem ser divididas em duas classes: positivas ou negativas. As interações negativas resultam em uma piora do crescimento celular (*fitness* celular), ou seja, o

fitness do duplo mutante é mais severo do que dos mutantes isolados. Estas interações também são conhecidas como interações sintéticas doentes (*synthetic sick*) e a sua forma mais severa resulta em letalidade sintética com morte celular (*synthetic lethal*). Estas, por sua vez, são resultados de genes cuja função está relacionada a vias metabólicas essenciais (BOONE; BUSSEY; ANDREWS, 2007; DIXON *et al.*, 2009; GUARENTE, 1993).

Por outro lado, as interações genéticas positivas refletem em um fenótipo menos severo do que daqueles dos mutantes isolados, ou seja, resultam em melhora do *fitness* celular, a qual pode refletir genes de um mesmo complexo proteico não essencial (BOONE; BUSSEY; ANDREWS, 2007).

Sabendo-se disso, foi analisado o tamanho das colônias de cada coleção gerada, selvagem e mutante de eIF5A, pois colônias muito pequenas devem ser eliminadas das análises, supondo que essas gerem resultados não confiáveis, por tratarem de colônias doentes, em que possivelmente a fusão de GFP àquela ORF resultou em alguma desestabilização da função da proteína (KAINTH *et al.*, 2009). Esses dados podem ajudar a rastrear possíveis interações genéticas com eIF5A.

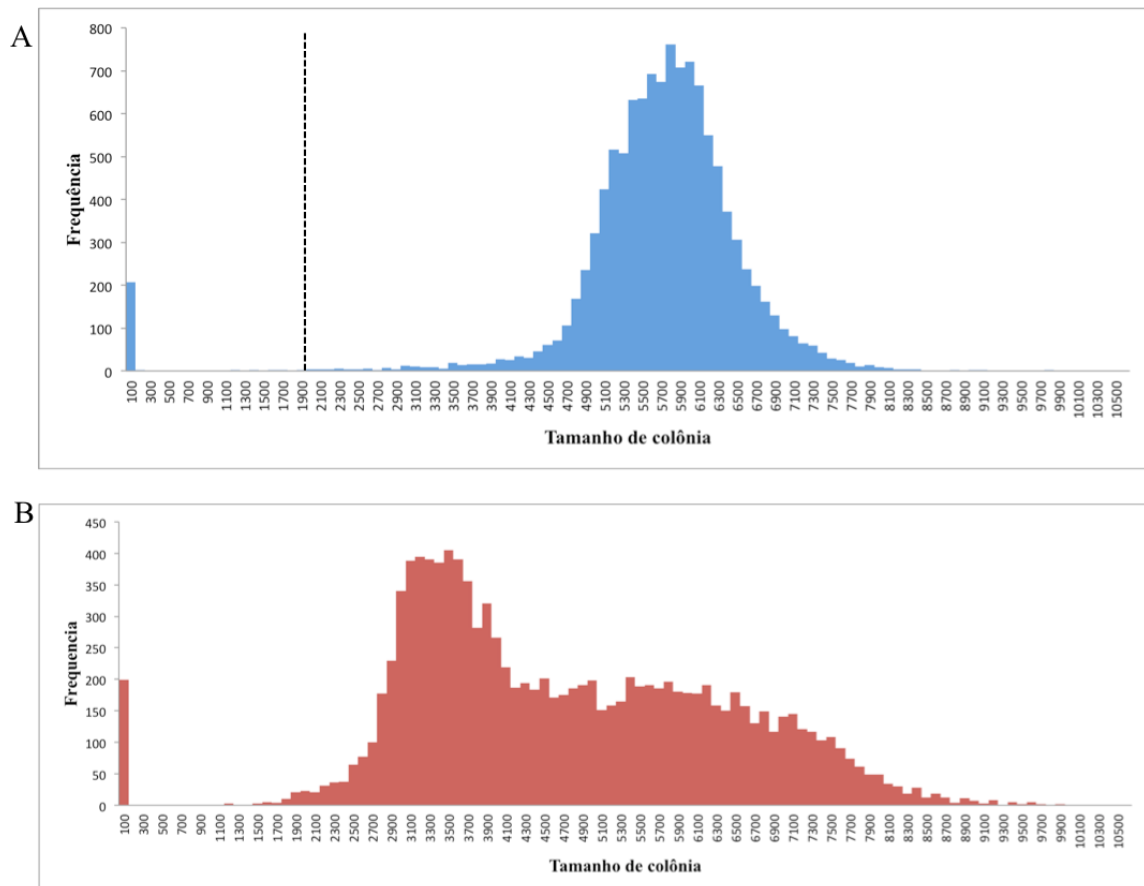
Após análise de tamanho de colônias, 151 colônias apresentaram colônias significativamente abaixo na média, considerando $p < 0,001$, para uma distribuição normal. Isto é, para a distribuição do tamanho de colônias da coleção selvagem, 84 colônias com tamanho máximo de 1.490 unidades de pixels foram consideradas significativamente abaixo da média. Para a distribuição do tamanho de colônias da coleção mutante, 67 colônias não cresceram e as demais estavam dentro da distribuição normal daquele grupo.

Dentre as 151 colônias pequenas demais, 2 eram coincidentes para as duas condições selvagem e mutante, portanto foram removidos 149 genes para a lista de análise de fluorescência.

Dentre aqueles 149 genes, 65 genes podem ter alguma interação genética negativa com eIF5A, pois geram colônias muito pequenas apenas para a coleção mutante. Por outro lado, os 82 genes removidos pela análise da coleção selvagem, devido ao crescimento abaixo do esperado, poderiam representar alguma interação genética positiva com eIF5A, pois geram colônias pequenas na coleção selvagem e, quando comparado com a coleção mutante, pode-se observar uma melhora do crescimento. Lembrando que 2 genes tiveram seus crescimentos considerados muito pequenos nas duas condições.

A análise de tamanho de colônia das coleções selvagem e mutante está representada na Figura 10. Pela distribuição do tamanho das colônias de cada condição, foi possível estabelecer um limite mínimo de tamanho de colônia, representado pela linha pontilhada no histograma.

Figura 10. Distribuição do tamanho de colônia das linhagens do rastreamento. Distribuição dos tamanhos de colônias das linhagens selvagem (A) e mutante *hyp2-3* (B), indicando o tamanho limite mínimo de 1.490 unidades de pixels. O eixo x representa a medida do tamanho de cada colônia das triplicatas biológicas, compartmentalizados em 100 unidades. O eixo y representa a frequência com que os tamanhos de colônia se encaixam dentro de cada compartimento. Baseado na distribuição normal, todas colônias com tamanho abaixo do limite mínimo foram removidas nas análises.



Fonte: autora deste trabalho

Os genes removidos que possivelmente representam uma interação genética com eIF5A estão apresentados na Tabela A1 (interações negativas) e Tabela A2 (interações positivas) dos Anexos desta tese e servirão como base de dados para estudos no futuro.

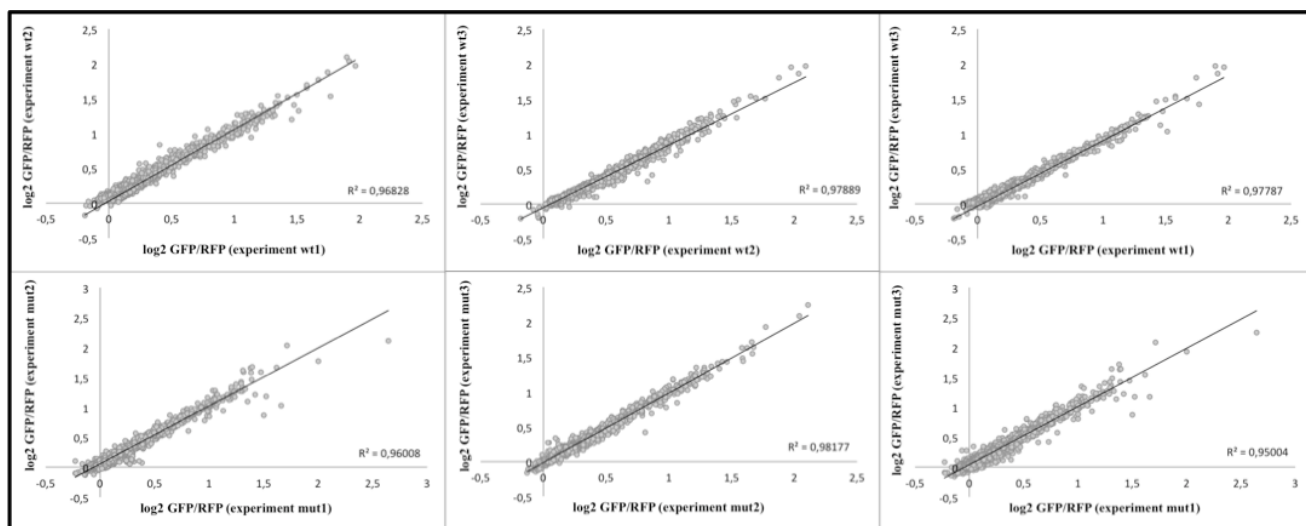
5.3. Análise de dados de fluorescência obtidos no *GenePix*

Após a obtenção dos dados de fluorescência *in vivo* como descrito em Métodos (4.3), das linhagens de *S. cerevisiae* mutante (*hyp2-3*) e selvagem (*HYP2*), obtidos em triplicata biológica, esses dados foram filtrados e normalizados como descrito anteriormente (Item 4.7).

Para comprovar que as triplicatas analisadas apresentam níveis de proteínas fluorescentes semelhantes, o que reflete na reprodutibilidade dos resultados, foi realizada a quantificação da associação linear entre as replicatas (2 a 2) por correlação de Pearson (r), utilizando para isso os valores da razão $\log_2$ GFP/E2Crimson (KAINTH *et al.*, 2009) (Figura 11).

Como pode ser observado na Figura 11, os coeficientes de correlação variaram de 0,98 (para a condição mutante 1 *versus* mutante 3) a 0,99 (para a condição mutante 2 *versus* mutante 3), demonstrando, assim, uma correlação positiva forte entre os valores das replicatas do experimento.

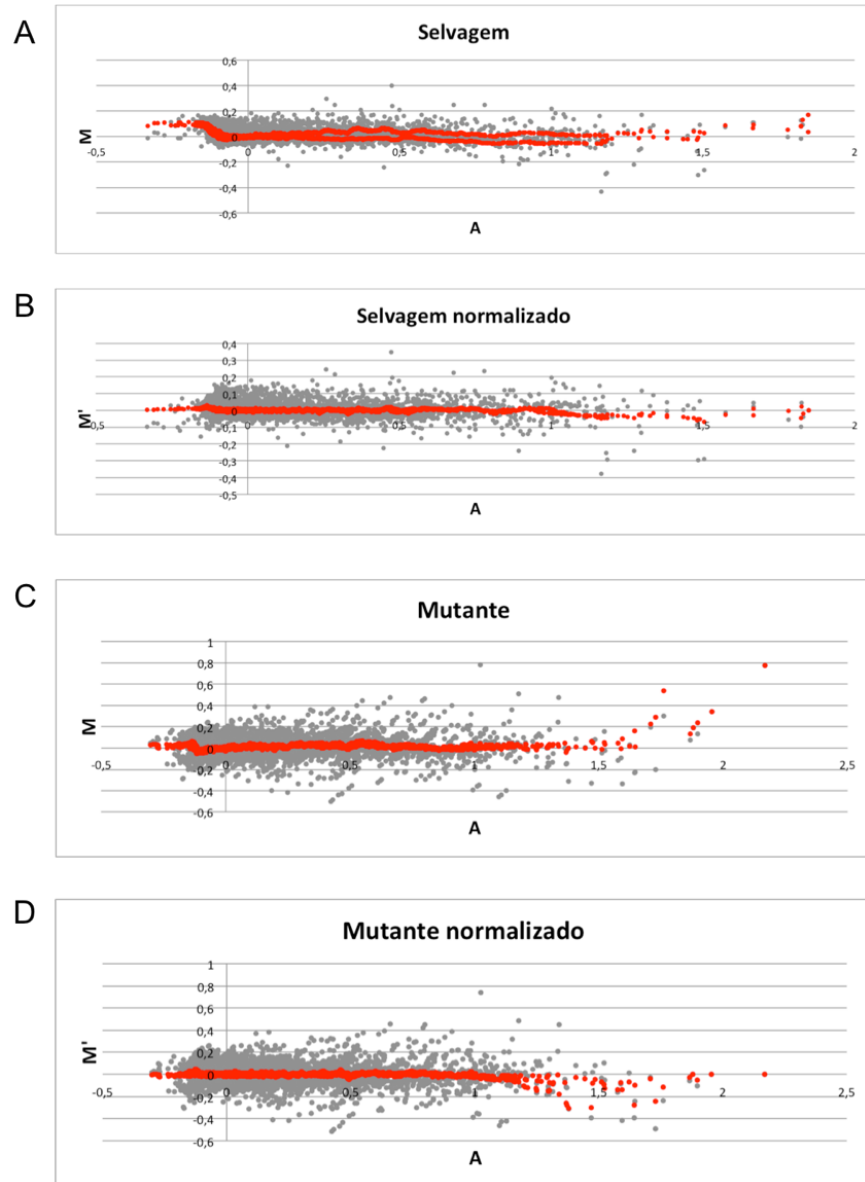
Figura 11. Correlação de Pearson entre as replicatas biológicas para o selvagem e mutante de eIF5A. As correlações estão apresentadas em duplicatas, e representam as medidas de fluorescência da razão GFP por RFP. O menor valor encontrado foi de $R^2 = 0.97$ ou $R^2 = 0.95$.



Fonte: autora deste trabalho

Uma abordagem técnica de representação gráfica envolvendo valores numéricos das intensidades gênicas incluem, por exemplo, os denominados MA-plots (YANG *et al.*, 2012). Esta abordagem é baseada na ideia do MA-plot, onde M é a diferença de valores de expressão em log e A é a média dos valores em log da expressão (DUDOIT *et al.*, 2002). Um MA-plot de dados normalizados deve mostrar uma nuvem de pontos espalhados ao redor do eixo $M=0$. Pela plotagem de “A” pela média móvel de “M”, obtém-se uma linha suave ao longo do gráfico de dispersão de “A x M”. A normalização é baseada nesta linha suave que cruza todos os genes, resultando na correção dos efeitos locais (Figura 12).

Figura 12. Gráficos de A (*add*) x M (*minus*) das das condições selvagem (A) e mutante (B) e suas respectivas correções pela normalização de LOESS. M é a diferença de valores de expressão em log e A é a média dos valores em log da expressão.



Fonte: autora deste trabalho

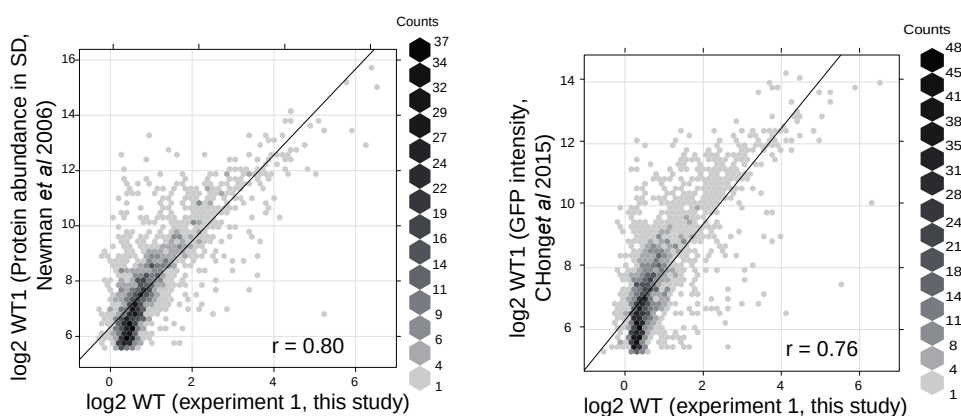
5.4. Abundância proteica

Apesar da fusão de GFP no C-terminal poder interferir com os níveis totais da proteína a qual está fundida, a grande maioria (80%, com base na análise de proteínas essenciais) permanece funcional. Além disso, mesmo quando a fusão com GFP influencia na abundância, as alterações relativas podem ser determinadas com precisão (NEWMAN *et al.*, 2006).

Os resultados de expressão proteica obtidos a partir da triplicada da condição selvagem demonstraram que a técnica de proteômica celular utilizando as quantificações de intensidade de fluorescência através do *Typhoon* possui uma forte correlação com os dados apresentados com as mesmas linhagens, analisadas por outros métodos quantitativos, como citometria de fluxo em larga escala (NEWMAN *et al.*, 2006) e microscopia de fluorescência (CHONG *et al.*, 2015).

Como mostrado na Figura 13, a correlação entre os dados de abundância proteica obtidos pela citometria de fluxo (NEWMAN *et al.*, 2006) e *Typhoon* é de $r=0.8$ (Figura 13A), já a correlação dos dados de com a microscopia (CHONG *et al.*, 2015) e o *Typhoon* é de $r=0.76$ (Figura 13B). Chong *et al.*, 2015, demonstrou que a correlação entre a citometria de fluxo e a microscopia é de $r=0.9$.

Figura 13 Correlação linear entre os dados de abundância proteica utilizando diferentes métodos quantitativos. A. A correlação de Pearson entre os dados de citometria de fluxo (Newman *et al.*, 2006) e *Typhoon* é $r=0.8$. B. A correlação de Pearson entre os dados de microscopia (Chong *et al.*, 2015) e *Typhoon* é $r=0.76$. Chong *et al.*, 2015, demonstrou que a correlação entre citômetro de fluxo e microscopia é $r=0.9$.

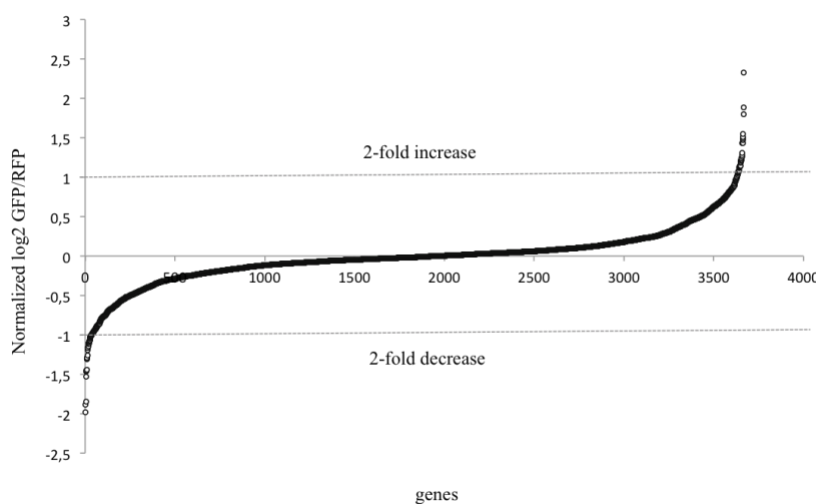


Fonte: autora deste trabalho

5.5. Análise de genes diferencialmente expressos

Uma vez quantificadas e normalizadas, as intensidades de fluorescência das razões mutante por selvagem em $\log_2$ GFP:E2Crimson foram classificadas em ordem crescente para identificar o comportamento dos dados. Assim, como demonstrado na Figura 14, os pontos na curva representam a média das triplicadas dos dados normalizados. Como esperado, a maioria das proteínas não possuem sua expressão alterada no mutante de eIF5A e estão representadas na porção horizontal da curva. A natureza sigmoidal da curva sugere que possivelmente existam proteínas diferencialmente expressas a serem descobertas, com valores de razões abaixo ou acima de zero, ou seja, respectivamente proteínas menos ou mais expressas na condição mutante. *Fold change* representa o valor de expressão de níveis proteicos de cada gene na linhagem mutante de eIF5A normalizado pelo valor da linhagem selvagem (Figura 14).

Figura 14. Distribuição das razões de GFP por E2Crimson para identificar proteínas diferencialmente expressas no mutante de eIF5A. O nível de expressão de cada proteína do mutante foi classificado em ordem crescente de *fold change*. O eixo y representa a razão de GFP por E2Crimson de mutante em relação ao selvagem de cada linhagem distribuída no eixo x.



Fonte: autora deste trabalho

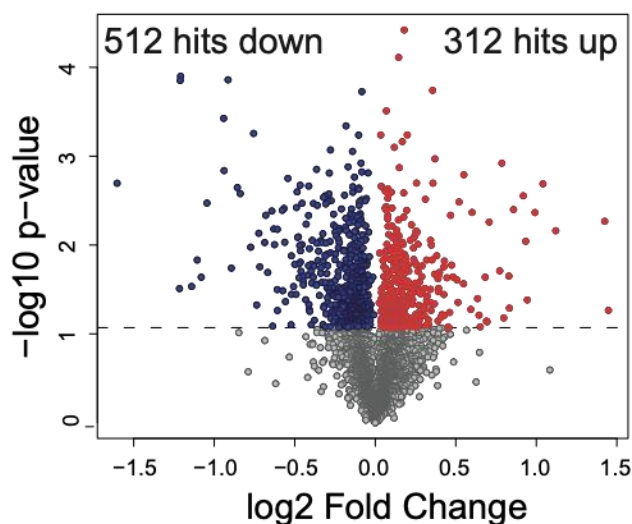
A definição de quem são os genes com diferenças de expressão estatisticamente significantes depende da estringência adotada na análise estatística. Se um teste estatístico é feito em um número pequeno de genes, o *p-value* é adequado para a análise, porém, em testes múltiplos em grande escala (como acontece com frequência na genômica), a análise pode ser mais bem servida controlando a taxa de descoberta falsa (*False discovery Rate* - FDR). Isso é definido como a proporção de falsos positivos entre todos os resultados significativos.

Foi realizado um teste T de *Student* bicaudal entre os dois grupos, para cada gene. Os valores p obtidos foram organizados em ordem crescente. Criou-se um índice “i” para os valores organizados, de números naturais (de um a 3648). O índice “i” foi dividido pelo tamanho amostral ($i/k \rightarrow i/3648$).

Calculou-se o FDR (*False Discovery Rate*) para um valor α de 0,35. Multiplicando α por i/k , obtém-se tal valor. A sua importância deve-se ao fato de excluir falsos positivos na obtenção dos genes diferencialmente expressos.

Foi calculado o valor de p e FDR (*False Discovery Rate*) para cada um dos genes, considerando um alfa de 0,35, mudar o alfa permite alterar a especificidade e sensibilidade do teste (STOREY; TIBSHIRANI, 2003). Os pontos do gráfico vulcão (Figura 15) representam os valores de p no eixo y e *fold change* no eixo x de cada gene, sendo aqueles diferencialmente expressos com significância estatística representados em vermelho.

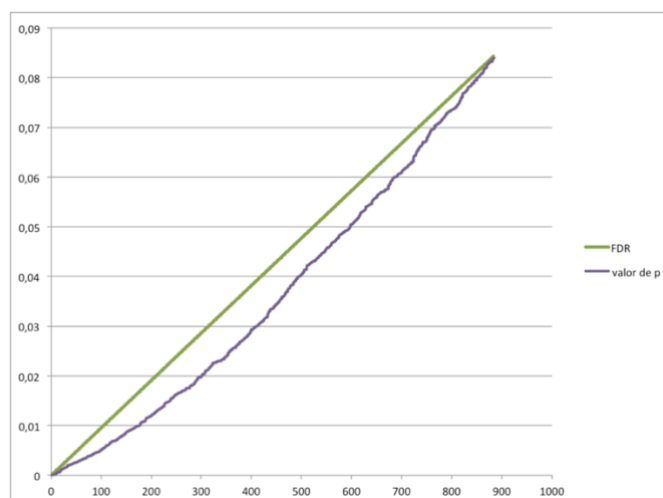
Figura 15. Proteínas diferencialmente expressas representadas em gráfico vulcão. O eixo x representa os valores de *fold change* em logaritmo de base dois e o eixo y representa os valores de p em logaritmo de base dois, com destaque em vermelho para as proteínas com diferença de expressão estatisticamente significativa.



Fonte: autora deste trabalho.

A diferença de expressão é obtida observando o valor p menor ou igual que FDR calculado, tais genes são considerados diferencialmente expressos. Foram considerados 883 genes diferencialmente expressos (ou *hits*), sendo 371 mais expressos e 512 menos expressos no mutante em relação ao selvagem (Figura 16). As listas de proteínas diferencialmente expressar encontram-se no em anexo, como Tabela A4 e Tabela A5, apresentando as proteínas aumentadas e diminuídas, respectivamente.

Figura 16. Genes diferencialmente expressos. Sobreposição dos valores de p (roxo) com os valores de FDR (verde), indicando 883 genes diferencialmente expressos.



Fonte: autora deste trabalho

5.6. Ontologia Genética

A atribuição de identificações de Ontologia Genética (*Genetic Ontology* - GO) aos 833 genes considerados diferencialmente expressos na análise identifica os componentes celulares, processos biológicos ou funções moleculares com o maior enriquecimento em relação com os demais 3.667 genes analisados e auxiliam no entendimento do comportamento biológico diferencial nas linhagens selvagem e mutante de eIF5A.

O enriquecimento é feito a partir da comparação das frequências encontradas na análise dos genes diferencialmente expressos com o número total de genes em estudo. A partir da análise de enriquecimento de GO é possível encontrar os primeiros significados biológicos que expliquem as diferenças entre as condições selvagem e mutante.

As proteínas diferencialmente presentes no mutante em relação ao selvagem foram analisadas quanto ao processo celular ao qual pertencem e houve predominância nos processos envolvendo organização mitocondrial, tradução mitocondrial e transporte de carboidratos. Uma vez que eIF5A atua diretamente na elongação da tradução (GREGGIO *et al.*, 2009; SAINI *et al.*, 2009) é possível que eIF5A atue diretamente na regulação da tradução de proteínas envolvidas com função mitocondrial.

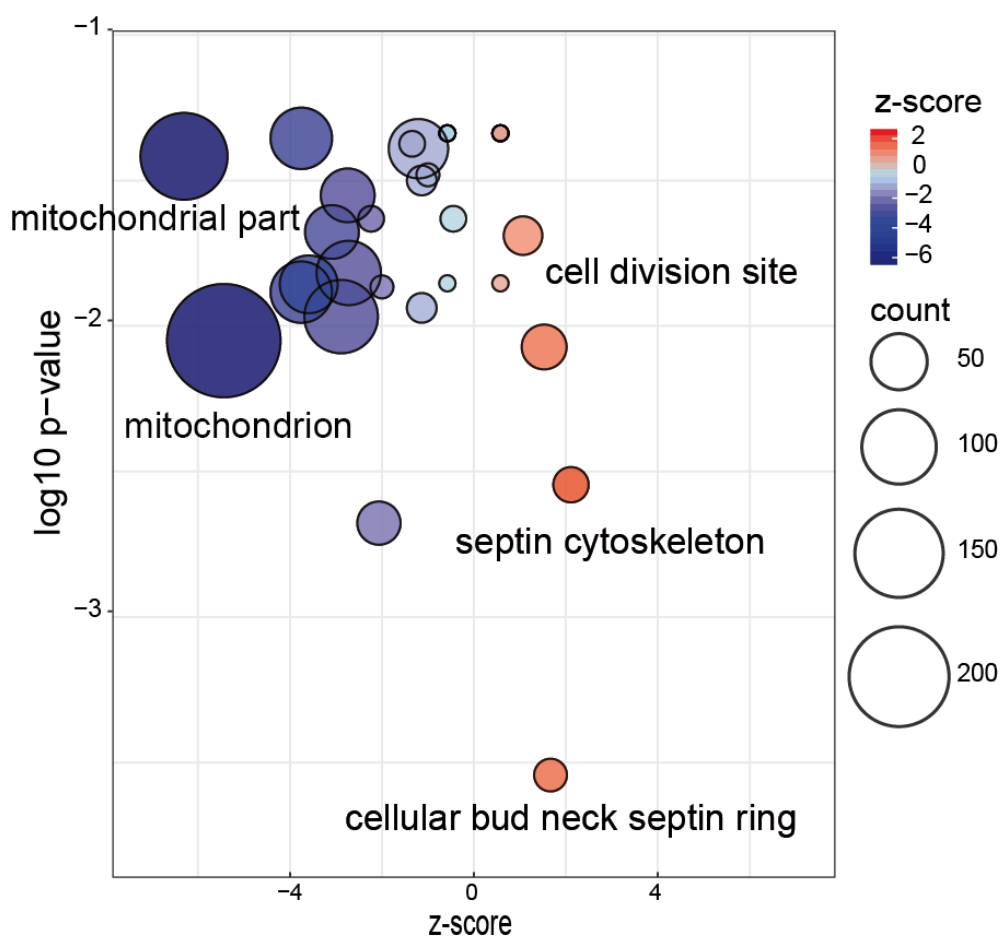
Na Tabela A3 do Anexo I estão apresentados os 38 genes envolvidos na organização mitocondrial que tem suas proteínas menos presentes no mutante de eIF5A.

A Figura 17 apresenta os processos celulares em que as proteínas identificadas no experimento de análise proteômica com mutante de eIF5A (*hyp2-3*) estão envolvidas

(<http://www.yeastgenome.com/cgi-bin/GO/goSlimMapper.pl>). Os processos celulares em que atuam estão classificados de acordo com o enriquecimento em relação à frequência encontrada na análise e no genoma.

A classificação de GO das proteínas representadas na Figura 17 (*Cellular Component*) e dos GOs para *Biological Process* e *Molecular Function* estão apresentadas nas Tabelas A6-A11 do Anexo I.

Figura 17. Classificação das proteínas identificadas como diferencialmente presentes no mutante de eIF5A em relação ao selvagem em diferentes compartimentos celulares biológicos. O enriquecimento dos termos da análise de Ontologia Genética (GO), representado no eixo y, compara a frequência dos termos associados às proteínas diferencialmente presentes no mutante de eIF5A à frequência dos mesmos termos associados ao proteoma de referência da linhagem selvagem. Os z-scores no eixo x foi usada para representar a diferença de expressão entre os grupos e o tamanho de cada círculo representa o número de genes agrupados em cada categoria.



Fonte: autora deste trabalho

5.7. Análise de proteínas contendo poli-P

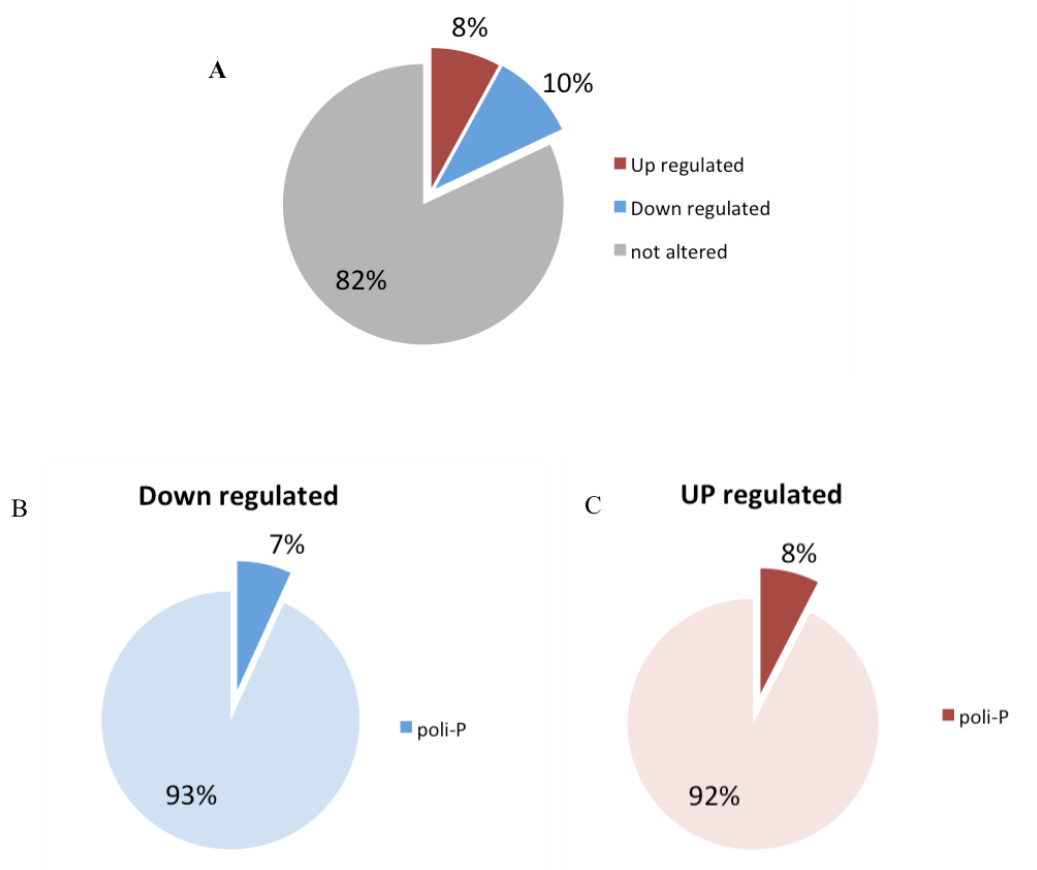
Está bem estabelecido o papel do fator EF-P (homólogo estrutural de eIF5A em bactérias) no alívio do bloqueio de ribossomos nos trechos de poliprolina, embora este fenômeno também seja associado, não somente às sequências de prolinas, mas também às sequências *upstream* e a taxa de início de tradução, que podem levar ao bloqueio do ribossomo em bactérias (LASSAK; WILSON; JUNG, 2015). Apesar do pressuposto geral, eIF5A foi associada ao mesmo mecanismo de ação na elongação da tradução de poliprolinas (GUTIERREZ *et al.*, 2013).

O proteoma da *S. cerevisiae* (linhagem BY4741, da qual são derivadas as linhagens utilizadas neste trabalho) possui 495 proteínas que possuem poli-P (<http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/PATMATCH/nph-patmatch>) com frequências variáveis, e até o momento apenas quatro dessas proteínas contendo poli-P foram demonstradas ter sua tradução dependente de eIF5A (GUTIERREZ *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2014), são elas Eap1, Ldb17, Vrp1 e Bni1 e na coleção de ORFs-GFP estão presentes 384 proteínas que possuem poli-P. Ldb17, Vrp1 e Bni1 não estão representadas nas coleções ORFs-GFP cruzadas com as linhagens *queries* VZL1363 e VZL1364.

Os dados obtidos neste trabalho demonstram que dentre todas as proteínas analisadas que continham alguma sequência poli-P, 18% foram diferencialmente expressas nas células mutante, sendo 8% aumentadas e 10% diminuídas (Figura 18A).

Ainda, ao analisar todas as proteínas menos expressas no mutante, apenas 7% são proteínas contendo poli-P (Figura 18B), contra 8% entre aquelas proteínas mais expressas (Figura 18C). Esses dados não mostram alterações significantes nos níveis de poliprolina do mutante *hyp2-3*.

Figura 18. Comparação dos níveis de proteínas poli-P na análise proteômica por GFP. A. Gráfico de pizza representando todas as proteínas poli-P analisadas, com 8% mais expressas e 10% menos expressas, e os 82% restantes não alterado. B. Dentre todas as proteínas diferencialmente menos expressas, apenas 7% são poli-P. C. Dentre todas as proteínas mais expressas 8% são poli-P.



Fonte: autora deste trabalho

Apesar de os dados apresentados na literatura enfatizarem a importância de eIF5A na tradução de proteínas que possuem sequências de poli-P, outro estudo recente demonstrou certas dúvidas à respeito deste papel. Ao avaliar o proteoma de células HeLa, (MANDAL; MANDAL; PARK, 2016), foi demonstrado que após a depleção de eIF5A nas células o percentual de proteínas com poli-P reduzidas não foi significativo em relação às proteínas com poli-P reduzidas na condição controle. Após a depleção de eIF5A, o nível de algumas proteínas com poli-P diminuiu, porém, o percentual de proteínas poli-P aumentadas foi superior, colocando em dúvida a contribuição de eIF5A na tradução de proteínas com poli-P.

Mais recentemente, o trabalho de (SCHULLER et al., 2017), utilizando a técnica de *ribosome profile* em *S. cerevisiae* com depleção de eIF5A celular, demonstrou que a ausência deste fator provoca um acúmulo de ribossomos não somente em *motifs* poli-P, ou seja, que

eIF5A possui um papel mais amplo na elongação da tradução e alivia o *stalling* ribossomal em muitos outros *motifs* além de PPP.

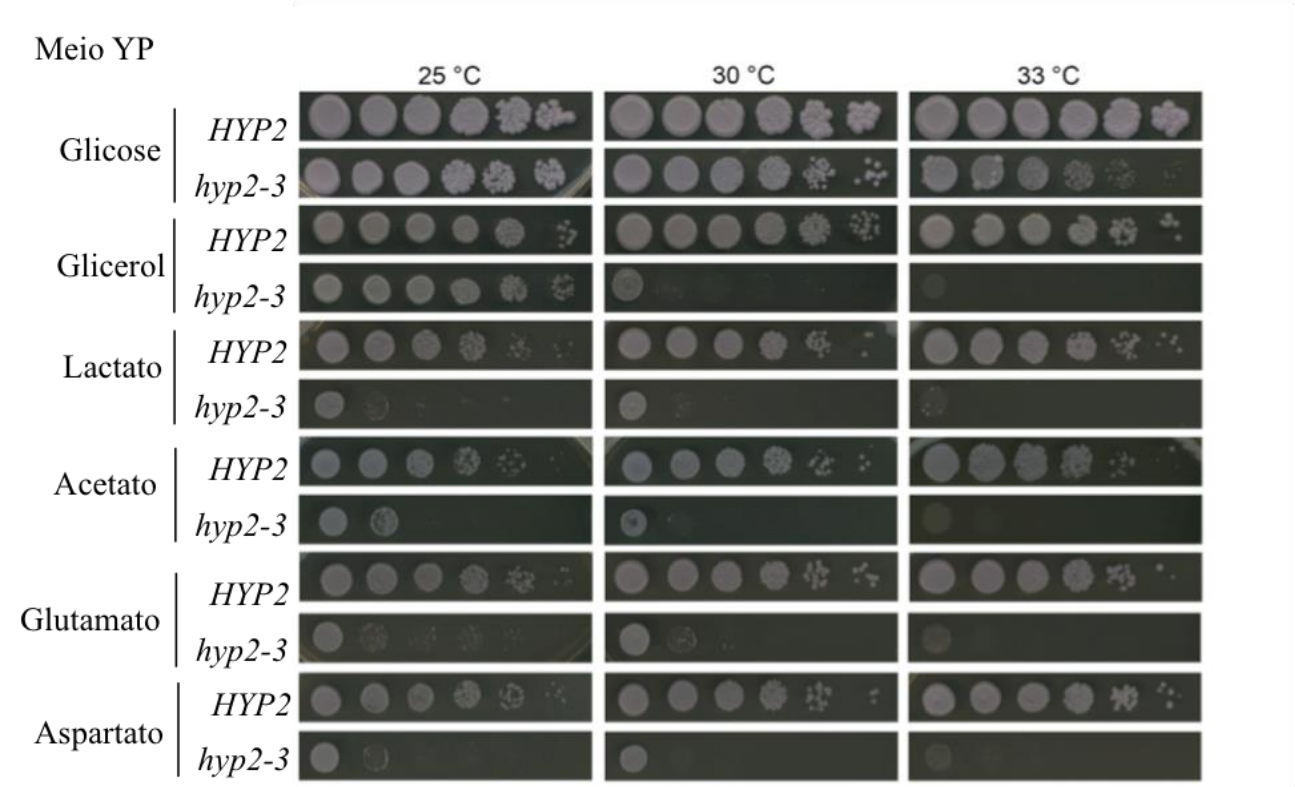
5.8. Análise de fenótipos de crescimento relacionados a função mitocondrial

S. cerevisiae é capaz de crescer em uma grande variedade de fontes de carbono (GANCEDO, 1998; HAMPSEY, 1997) entretanto, utiliza preferencialmente monossacarídeos simples, como glicose ou frutose, para produção de energia através da fermentação, mesmo com disponibilidade de outros di- ou trissacarídeos, ou ainda de fontes de carbono não fermentáveis, que requerem a fosforilação oxidativa para produção de energia, utilizadas apenas em último caso (BROACH, 2012). Para que a célula seja capaz de crescer em fontes alternativas fermentáveis e não fermentáveis, é necessário que haja uma mudança massiva no perfil transcricional, e consequentemente traducional, no intuito de adaptá-la as novas condições nutricionais, uma vez que, na presença de glicose, todas essas vias estão desativadas, em um processo conhecido por repressão catabólica (GANCEDO, 1998).

Para caracterização de possíveis defeitos relacionados a função mitocondrial, buscaram-se fenótipos de crescimento celular em fontes de carbono alternativas à glicose, como: o glicerol e o lactato, que são fontes de carbono não fermentáveis utilizadas como indicativo de deficiência respiratória; o acetato pode indicar possíveis defeitos no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (Ciclo de Krebs) e também o aspartato e o glutamato, que são os aminoácidos cuja oxidação, e utilização como fonte de carbono, é dependente da mitocôndria (BACH *et al.*, 2000; HAMPSEY, 1997).

O mutante de eIF5A (*hyp2-3*) apresentou defeitos de crescimento em todas as fontes de carbono não fermentáveis testadas (Figura 19), ou seja, aquelas que dependem da integridade funcional da mitocôndria de *S. cerevisiae*, atestando defeitos tanto no Ciclo de Krebs (acetato), quanto na respiração como um todo (glicerol e lactato).

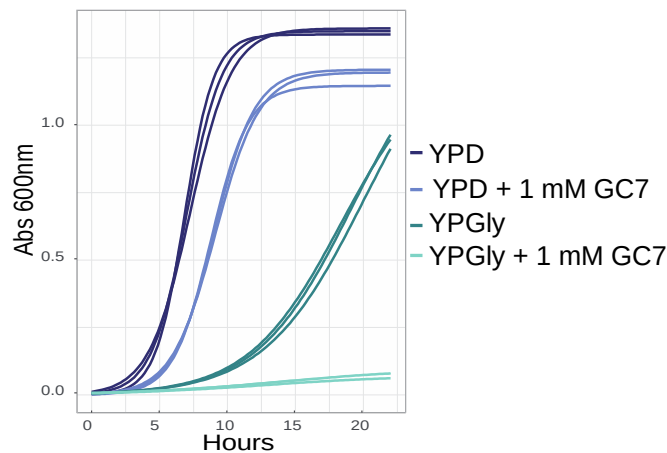
Figura 19. Fenótipos de crescimento obtidos em fontes de carbono não fermentáveis. As diluições seriadas dos alelos *HYP2* selvagem (wt) e mutante *hyp2-3* foram aplicadas em meio rico YP contendo fontes de carbono não fermentáveis, e as placas incubadas nas temperaturas de interesse de 3 a 6 dias.



Fonte: autora deste trabalho

Uma vez que a hipusinação é essencial para o crescimento celular em todas as arqueas e eucariotos testados até o (PARK; JOE; KANG, 1998; PARK; WOLFF; FOLK, 1993; SCHNIER *et al.*, 1991), também testamos o efeito da hipusinação para o crescimento em glicerol através do seu bloqueio pelo composto *N1-guanyl-1,7-diaminoheptane* (GC7), um conhecido inibidor da enzima desoxi-hipusina sintase (JAKUS *et al.*, 1993). Como pode ser observado na Figura 20, a adição de GC7 ao meio de cultura induz um defeito de crescimento severo na presença de apenas fonte de carbono não fermentável. Esses resultados demonstram que tanto a presença da proteína eIF5A quanto sua modificação hipusinação são necessárias para o funcionamento mitocondrial e utilização de fontes de carbono não fermentáveis.

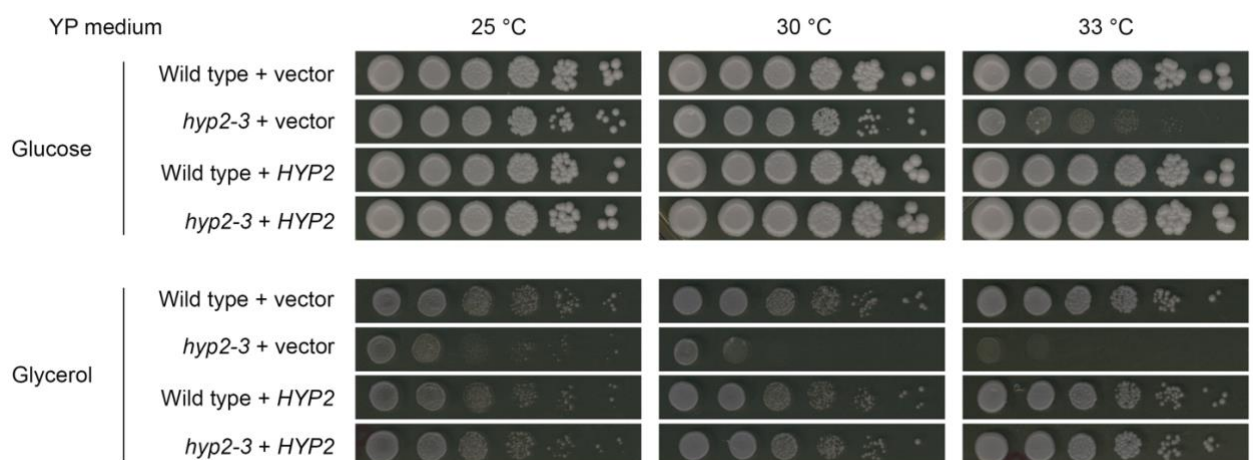
Figura 20. Curva de crescimento da linhagem selvagem de *S. cerevisiae* (VZL1363) em YPD (glicose) e YPGly (glicerol) com e sem a inibição da hipusinação por GC7.



Fonte: autora deste trabalho

Para confirmar que o dado da Figura 19 é dependente apenas do alelo do gene de eIF5A presente na linhagem de *S. cerevisiae*, foi avaliado o impacto da expressão de eIF5A selvagem (*HYP2*) sobre o crescimento do mutante *hyp2-3* em glicerol. Para tal, ambas linhagens VZL1363 e VZL1364 foram transformadas com os plasmídeos centroméricos pSV60 (vetor vazio) e pSV138 (pSV60 + *HYP2*). Os resultados são apresentados na Figura 21.

Figura 21. Complementação da mutação com uma cópia selvagem do gene de eIF5A. WT + vetor e WT + *HYP2* representam a linhagem VZL1363 transformada com os plasmídeos pSV60 e pSV138, respectivamente. *hyp2-3* + vetor e *hyp2-3* + *HYP2* representam a linhagem VZL1364 transformada com os plasmídeos pSV60 e pSV138, respectivamente. O experimento foi conduzido em meio com glicerol como fonte de carbono única, em comparação com o meio controle contendo glicose, nas temperaturas de 25 °C (permissiva), 30 °C e 33 °C (semipermissivas).



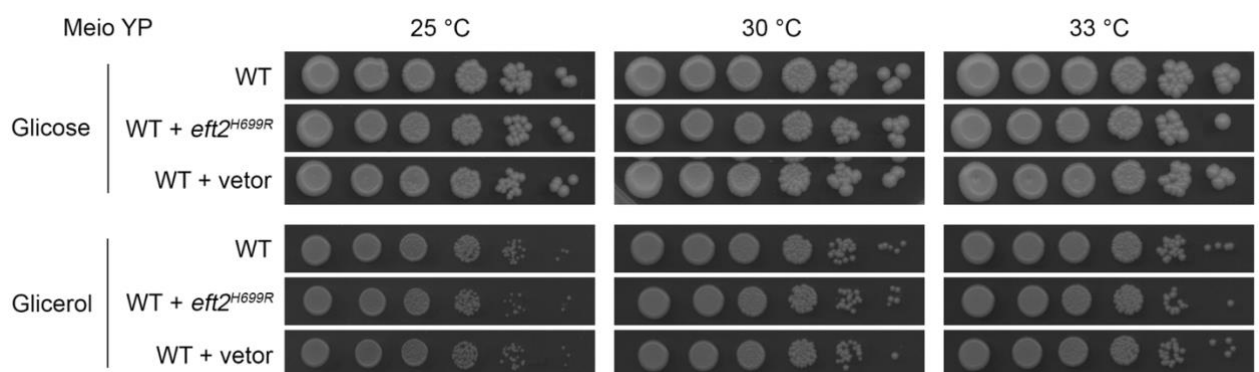
Fonte: autora deste trabalho

A presença do plasmídeo pSV60 em ambas VZL1363 (“WT + vetor”) e VZL1364 (“*hyp2-3* + vetor”) não alterou os fenótipos de crescimento observados. Entretanto, a inserção do plasmídeo pSV138, que contém gene selvagem de eIF5A, foi capaz de reverter o fenótipo observado para o mutante de eIF5A *hyp2-3* (*hyp2-3* + *HYP2*) tanto em glicose quanto em glicerol, evidenciando que o defeito respiratório é dependente da perda gradativa de função de eIF5A nessa linhagem. Este resultado era esperado uma vez que o alelo *hyp2-3* é recessivo (VALENTINI *et al.*, 2002).

Com o intuito de verificar se o fenótipo de deficiência respiratória corresponde a uma deficiência na tradução específica de elementos importantes para função mitocondrial ou um defeito geral de elongação da tradução, a linhagem selvagem (VZL1363) foi transformada com o plasmídeo pSV1104, que contém o mutante dominante negativo de eEF2 (*eft2^{H699K}*), que ocasiona um defeito geral na elongação da tradução celular (ORTIZ; KINZY, 2005).

Como pode ser observado na Figura 22, o mutante dominante negativo de eEF2 (*eft2^{H699K}*) não apresentou deficiência no crescimento em meio de cultura contendo fonte de carbono não fermentável, sem diferença com a linhagem selvagem apenas.

Figura 22. Perfil de crescimento celular de um mutante com defeito geral na elongação da tradução em meio não fermentável. A linhagem WT + *eft2^{H699R}* e WT + vetor correspondem à linhagem VZL1363 (*HYP2*), transformada com os plasmídeos pSV1104 (*eft2^{H699R}*) e pSV374 (vetor), respectivamente. O crescimento foi acompanhado em meio sólido com glicerol como fonte de carbono única, em comparação com o meio controle contendo glicose, nas temperaturas de 25 °C, 30 °C e 33 °C.

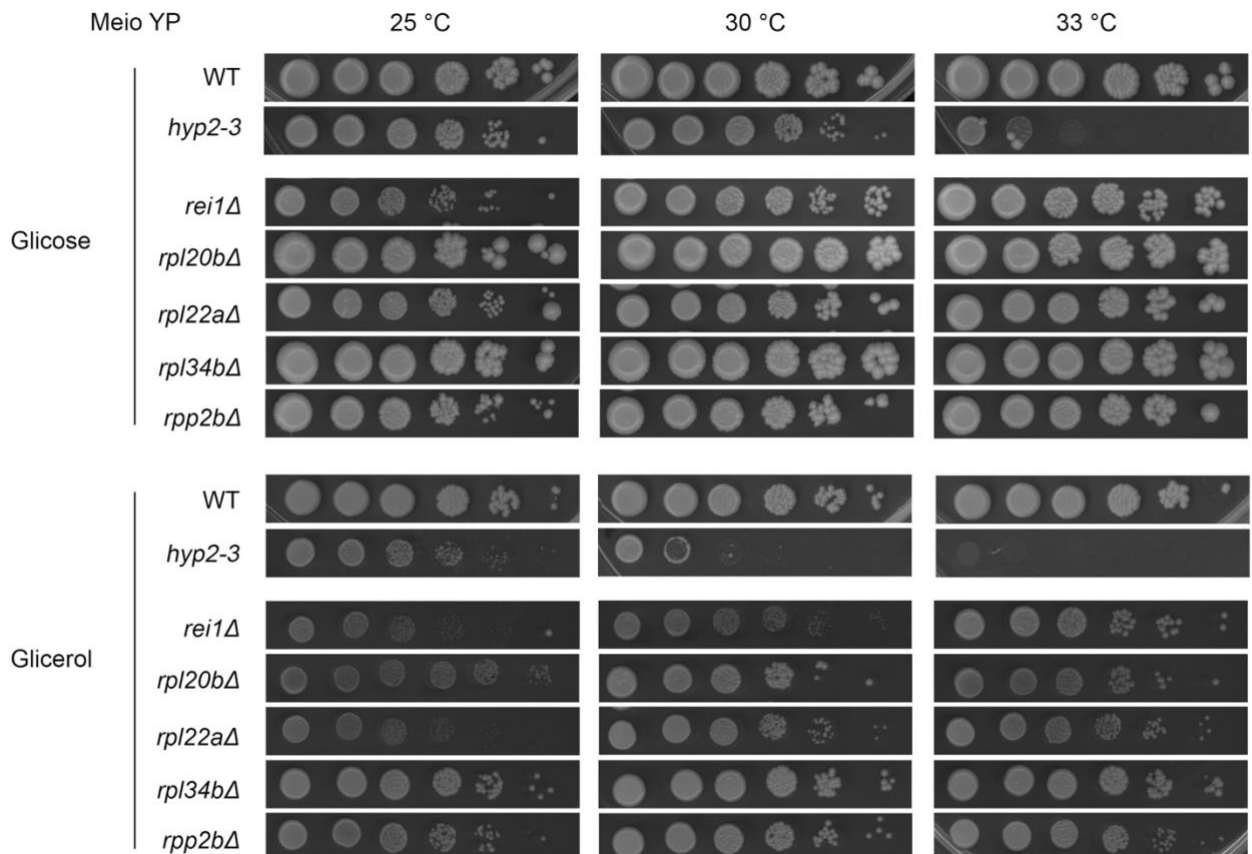


Fonte: autora deste trabalho

Com a mesma finalidade, avaliamos o comportamento de cinco linhagens da coleção nocaute correspondentes a proteínas estruturais e de montagem do ribossomo, sendo elas *reil1Δ*,

rpl20bΔ, *rpl22aΔ*, *rpl34bΔ* e *rpp2bΔ*, frente ao crescimento em meio contendo unicamente glicerol como fonte de carbono. Os resultados são apresentados na Figura 23.

Figura 23. Fenótipos de crescimento celular dos nocautes de proteínas ribossomais em meio contendo fonte de carbono não fermentável. O crescimento das linhagens da coleção nocaute foi acompanhado em meio com glicerol como fonte de carbono única, em comparação com o meio controle contendo glicose, nas temperaturas de 25 °C, 30 °C e 33 °C.



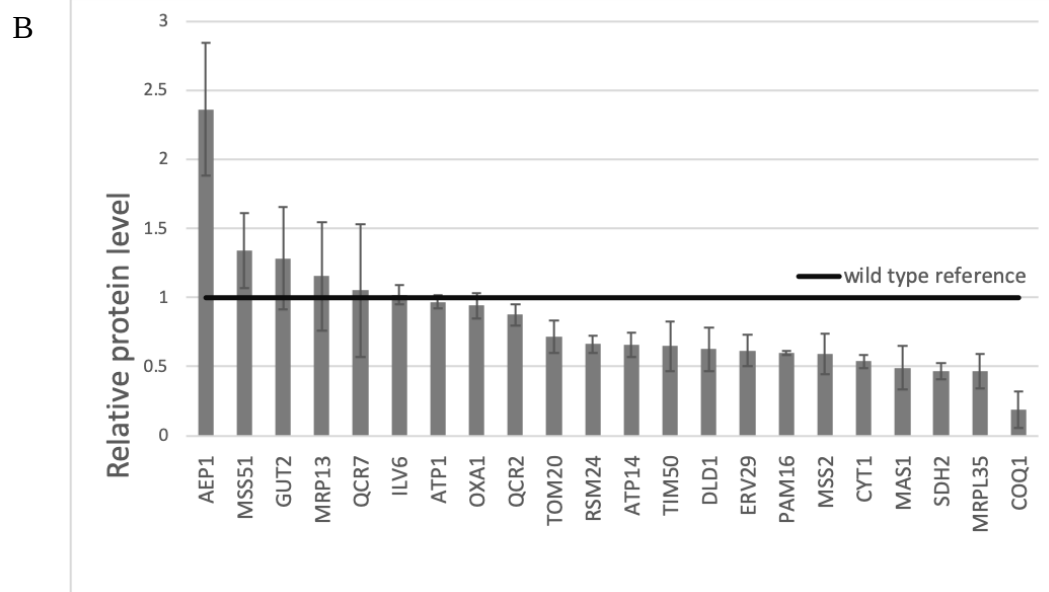
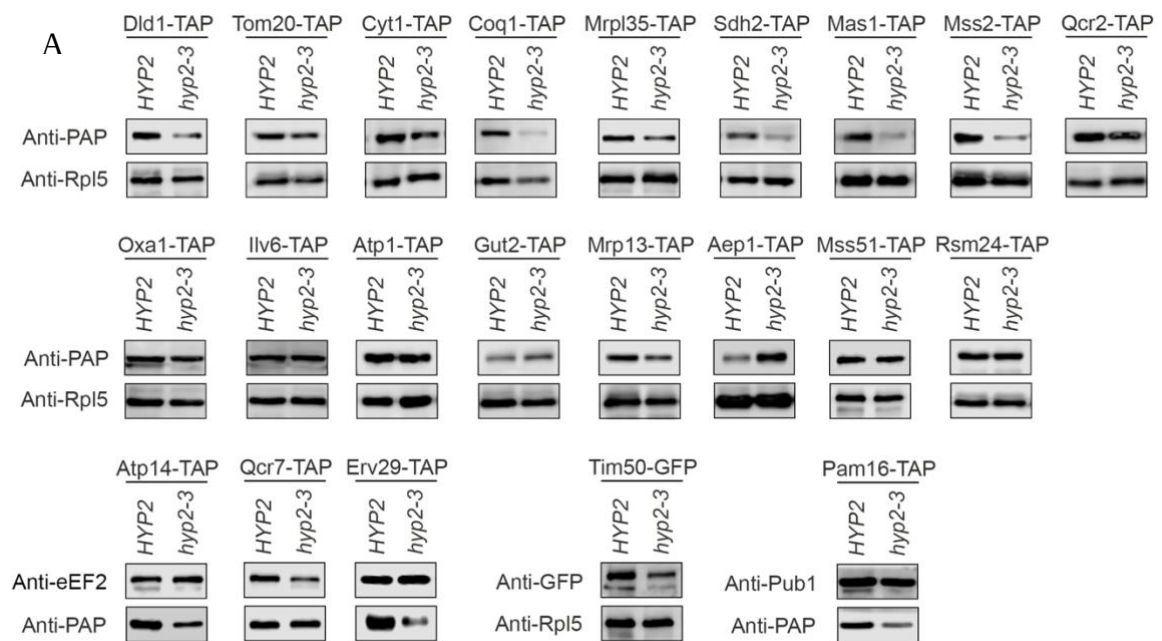
Fonte: autora deste trabalho

De forma geral, como pode ser observado na Figura 23, as linhagens contendo deleções de proteínas ribossomais, apesar de possuírem uma redução geral da elongação da tradução (STEFFEN *et al.*, 2012), não apresentaram defeito de crescimento no meio contendo glicerol como fonte de carbono única, diferente do observado para a linhagem VZL1364 (*hyp2-3*). O melhor perfil de crescimento desses mutantes se deu a partir dos 30 °C para ambos glicerol e glicose, sendo o maior atraso no crescimento observado em *rei1Δ* e *rpl22aΔ* a 25 °C.

5.9. Quantificação de proteínas em fusão com TAP (*Tandem Affinity Purification*) ou GFP por *western blot*

Algumas proteínas foram escolhidas para serem confirmados por *western blot*, sendo apresentado na Figura 24A uma representação da triplicata biológica realizada e na Figura 24B a quantificação das triplicatas biológicas realizadas. Na Figura 24 estão mostrados os resultados para Dld1, Tom20, Cyt1, Coq1, Mrpl1, Sdh2, Mas1, Mss2, Qcr2, Oxa1, Ilv6, Atp1, Gut2, Mrp13, Aep1, Mss51, Rsm24Sdh2, Cyt1, Rsm24, Atp14, Qcr7, Erv29, Tim50 e Pam16. Sdh2 é uma subunidade da succinato desidrogenase, um complexo mitocondrial que acopla a oxidação do succinato à transferência de elétrons para a ubiquinona como parte do ciclo do ácido cítrico (também chamado de ciclo do ácido tricarboxílico ou Ciclo de Krebs) e da cadeia respiratória (OYEDOTUN; LEMIRE, 2004). Cyt1 é o citocromo c1 de *S. cerevisiae*, componente da cadeia respiratória mitocondrial (BOUMANS; GRIVELL; BERDEN, 1998). Rsm24, componente da subunidade menor do ribossomo mitocondrial, o qual intermedia a tradução no lúmen da organela. Mss2, proteína localizada na membrana interna da mitocôndria, requerida para exportar a proteína Cox2 traduzida no lúmen mitocondrial. Mas1 é uma proteína essencial em *S. cerevisiae* responsável por clivar a sequência alvo no N-terminal de proteínas importadas para a mitocôndria e Coq1 que catalisa a primeira etapa na biossíntese de coenzima Q. Como pode ser visto, existe uma clara diminuição dos níveis dessas proteínas no mutante de eIF5A (*hyp2-3*) em comparação ao selvagem (*HYP2*). O dado mostrado é uma replicata representativa de experimento realizado em triplicata biológica com resultados semelhantes (dados não mostrados).

Figura 24. Análise dos níveis das proteínas necessárias para a cadeia respiratória mitocondrial. (A) Os níveis das proteínas Dld1, Tom20, Cyt1, Coq1, Mrp11, Sdh2, Mas1, Mss2, Qcr2, Oxa1, Ilv6, Atp1, Gut2, Mrp13, Aep1, Mss51, Rsm24Sdh2, Cyt1, Rsm24, Atp14, Qcr7, Erv29, Tim50 e Pam16 foram determinados por *western blot* utilizando linhagens derivadas da coleção TAP (GHAEMMAGHAMI *et al.*, 2003; HUH *et al.*, 2003) em *background* genético do gene selvagem de eIF5A (*HYP2*) ou mutante (*hyp2-3*). A proteína Rpl5, eEF2 ou Pub1 representadas foram utilizadas como proteínas normalizadoras. (B) Quantificação das triplicadas biológicas dos níveis de proteínas.



Fonte: autora deste trabalho

5.10. Caracterização da fisiologia mitocondrial em células com depleção de eIF5A

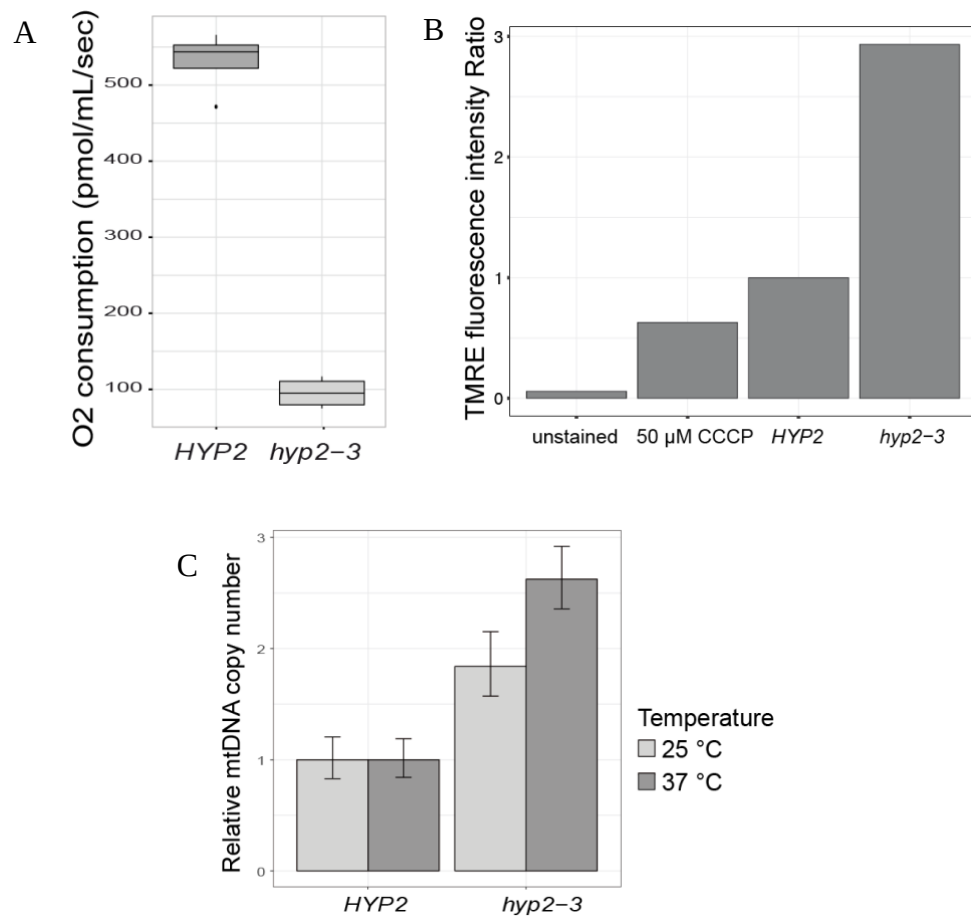
Também foi caracterizado o estado fisiológico mitocondrial em células onde eIF5A foi depletada através de medidas de consumo de oxigênio, quantificação de conteúdo de DNA mitocondrial, medidas do potencial de membrana por citometria de fluxo e morfologia mitocondrial.

Até o momento, foi confirmado que a depleção de eIF5A causa a redução da abundância de diversas proteínas mitocondriais e que essas linhagens apresentam disfunção mitocondrial, como incapacidade de crescimento celular em fontes de carbono não fermentável, redução no consumo de oxigênio (Figura 25a) e aumento no conteúdo de DNA mitocondrial (Figura 25b), embora sua morfologia apresenta-se normal (Figura 25d).

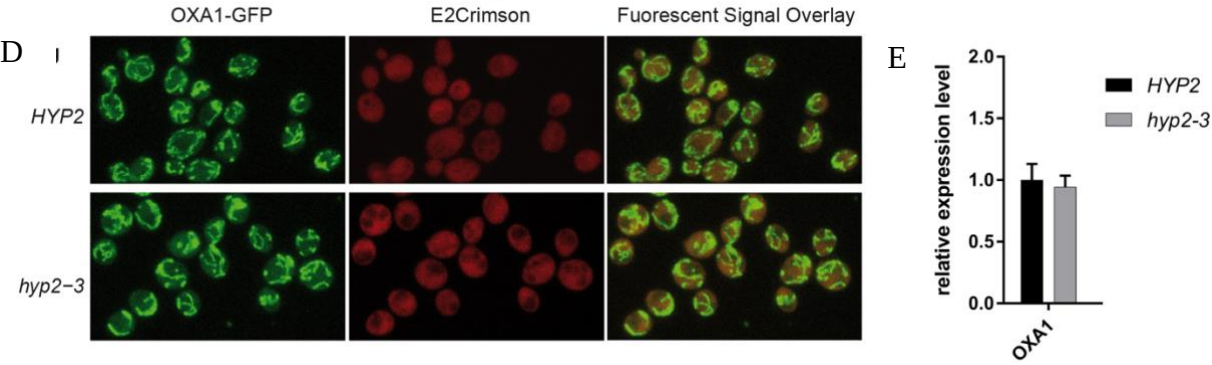
Interessantemente, observou-se um aumento no potencial de membrana nestas células através das medidas de fluorescência por citometria de fluxo utilizando o fluoróforo catiônico TMRE (*tetramethylrhodamine*), que cora permanentemente a membrana mitocondrial, após ser rapidamente sequestrado por mitocôndrias ativas (Figura 25c).

O potencial de membrana mitocondrial é resultado da diferença do potencial elétrico gerado pelo gradiente eletroquímico através da membrana interna e seu valor também pode estar relacionado com a formação de ROS (*reactive oxygen species*, em português ERO – espécies reativas de oxigênio). Um aumento exponencial na produção de ROS é observado em mitocôndrias com alto potencial de membrana (KADENBACH, 2003).

Figura 25. Caracterização da fisiologia mitocondrial em linhagem com eIF5A mutante (*hyp2-3*). (a) Atividade respiratória reduzida no mutante de eIF5A durante o crescimento em glicerol. As linhagens selvagem *HYP2* (SVL1363) e mutante *hyp2-3* (SVL1364) foram crescidas até a fase exponencial a 25 °C em YPD (glicose) e então submetidas a mudança para a temperatura semipermissiva de 33 °C durante 8 horas em meio YPGly (glicerol). A taxa de consumo de O₂ está expressa em pmol O₂/mL/sec (média ± S.E.M.) para n=2 de experimentos realizados em duplicatas independentes. (b) Quantidade de DNA mitocondrial está aumentado no mutante de eIF5A. Número de cópias de mtDNA quantificados por PCR quantitativo relativo ao genoma nuclear. (c) Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$) está aumentado nas células mutantes *hyp2-3*. As células foram marcadas com TMRE antes de serem submetidas a citometria, e a intensidade de fluorescência foi medida em um número superior a 105 células utilizando o equipamento *Scanford* e então calculado relativo à linhagem selvagem. (d) Morfologia mitocondrial não é alterada na linhagem mutante *hyp2-3*. Células das linhagens selvagem e mutante expressando a proteína vermelha fluorescente E2Crimson e a proteína mitocondrial Oxa1 cromossomicamente fusionada a GFP foram avaliadas. Células foram crescidas até a fase exponencial a 25 °C, e submetidas a mudança para a temperatura restritiva de 37 °C durante 4 horas e observadas por microscopia confocal. (e) *Western blot* quantitativo de Oxa1 nas linhagens selvagens e mutante *hyp2-3*.



Continuação da Figura 25



Fonte: autora deste trabalho

5.11. O *motif* de poliprolina da proteína S6K2: dependência translacional do eIF5A e importância para as interações proteína-proteína

Foi realizado em colaboração com o laboratório professor Dr Augusto Ducatti (Unicamp) e o nosso laboratório, em que foi explorada a função de eIF5A na tradução de S4K2 humano, utilizando o modelo de levedura *S. cerevisiae*. Neste capítulo, serão focados os experimentos realizados em nosso laboratório. Os experimentos aqui descritos, realizados durante este doutorado, foram publicados como parte do trabalho intitulado “The poplyproline-motif of S6K2: eIF5A translational dependence and importance for protein-protein interaction”, publicado na revista científica *Journal of Cell Biochemistry* em 20 de setembro de 2018. Para evitar problemas de *copyright* com a revista, realizamos aqui o detalhamento e descrição de nossa participação neste trabalho referenciando as figuras presentes do artigo (Anexo I).

Observamos diferenças entre a produção de S6K2 em leveduras com depleção de eIF5A, em concordância com a observação anterior da dependência de proteína de poliprolina eIF5A em leveduras (GUTIERREZ *et al.*, 2013; PELECHANO; ALEPUZ, 2017). No entanto, não observamos diferenças no conteúdo de S6K2 nas células HeLa depletadas de eIF5A, mesmo após 96 h de silenciamento genético e após atingir uma quantidade extremamente baixa de eIF5A (anexo – 1, Figura 4A-C) (MENEGUELLO *et al.*, 2019). Na tentativa de ver uma possível regulação compensatória devido à depleção de eIF5A, o mRNA do conteúdo de S6K2 foi avaliado, mas nenhuma alteração foi observada (Anexo 1-Figura 3D). Portanto, concluímos que a depleção de eIF5A não afetou a proteína S6K2 nas células HeLa. Embora aparentemente de forma diferente dos dados obtidos em *S. cerevisiae*, nossos dados obtidos em HeLa estão de acordo com as observações de Mandal *et al.* (2016) que não observaram influências óbvias nas proteínas ricas em poliprolina nas células HeLa após a depleção de eIF5A (MANDAL; MANDAL; PARK, 2016),. De fato, a síntese proteica nos dois sistemas, embora semelhante, pode conter diferenças importantes que explicam os resultados observados. Alternativamente, um possível mecanismo poderia estar presente para aliviar a tradução da proteína S6K2 em células HeLa.

Foi demonstrado recentemente por Shin *et al.* (2017), utilizando ensaios *in vitro*, que eIF5A favorece muito a tradução de proteínas contendo poliprolina; no entanto, a tradução ainda é capaz de ocorrer a uma taxa mais baixa na ausência de eIF5A (SHIN *et al.*, 2017). Considerando esse cenário, é possível que a taxa de degradação de S6K2 seja menor que sua taxa de síntese, mesmo em baixa quantidade de eIF5A, portanto, não são observadas diferenças no conteúdo final de proteína de S6K2 (Anexo 1-Figura 2b). No entanto, ao utilizar células de

S. cerevisiae, avaliamos o aumento do teor de proteínas heterólogas, em um modelo de superexpressão. Nesta condição, a redução da proteína eIF5A faz com que as células sejam incapazes de produzir S6K2 tão rápido quanto quando eIF5A está presente na quantidade padrão, respondendo pela diferença observada (Anexo 1-Figura 4a, b, c). Essa hipótese poderia explicar o motivo pelo qual Mandal *et al.* (2016) não observaram uma correlação óbvia entre as proteínas eIF5A e poliprolina após o silenciamento da eIF5A.

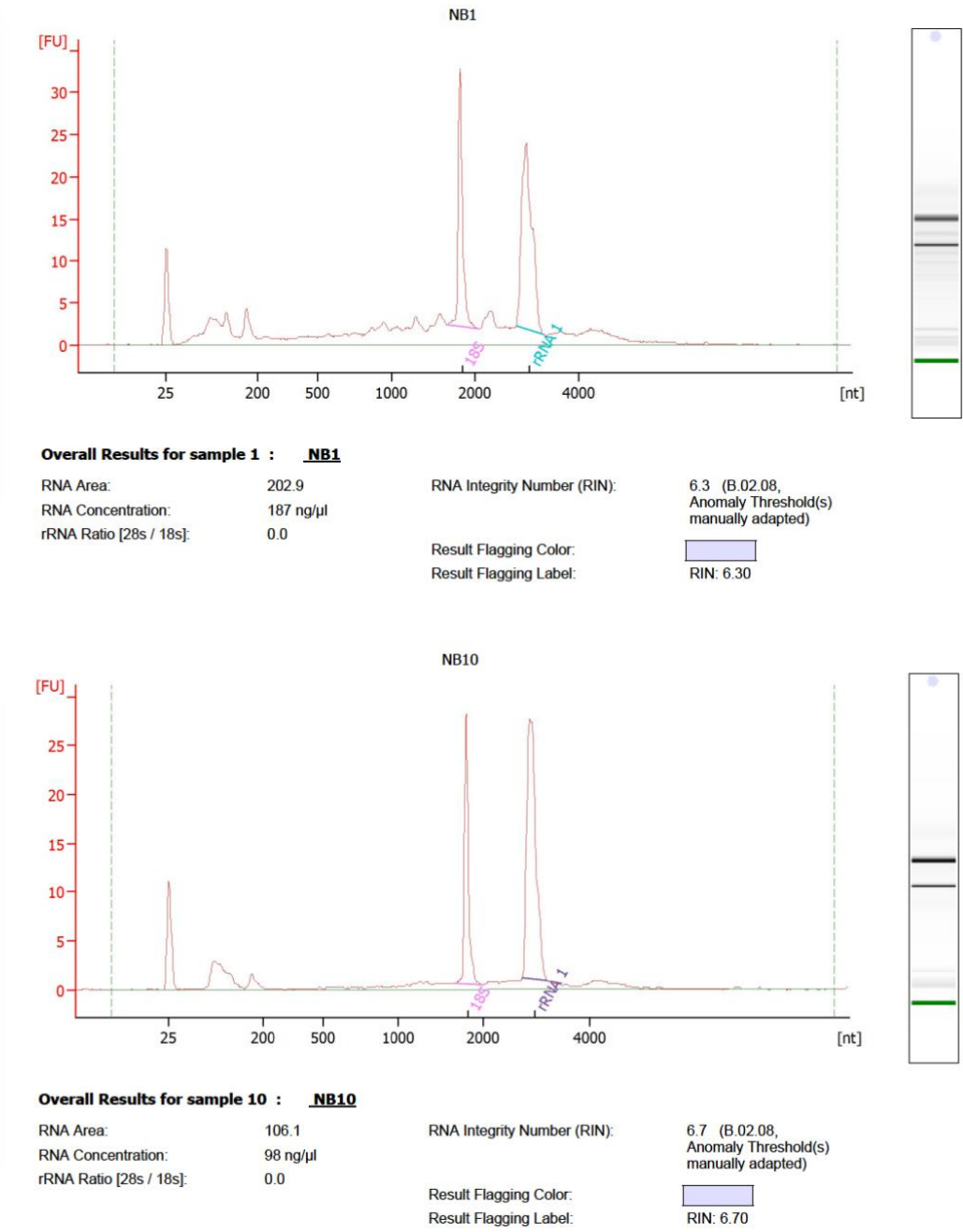
De qualquer forma, isso não exclui a observação de que, mesmo após extrema redução de eIF5A, o conteúdo endógeno de proteína S6K2 em HeLa não mudou em nossa condição experimental e permaneceu em conteúdo regular. Esta é uma observação particularmente importante, uma vez que é bem sabido que a depleção de eIF5A resulta em várias alterações de fenótipos, como influências no ciclo celular (HANAUSSKEABEL *et al.*, 1994), apoptose (CARAGLIA *et al.*, 2003) e especialmente interrupção e modulação do crescimento de síntese proteica em células HeLa (MANDAL; MANDAL; PARK, 2016; MÉMIN *et al.*, 2014). Além disso, o esgotamento do eIF5A foi proposto como uma estratégia para prevenção e tratamento do câncer (NAKANISHI; CLEVELAND, 2016). Esses efeitos observados pela depleção de eIF5A provavelmente não podem ser correlacionados com reduções na expressão de S6K2, um importante modulador da síntese de proteínas.

5.12. Análise do perfil transcricional do mutantes *hyp2-3*

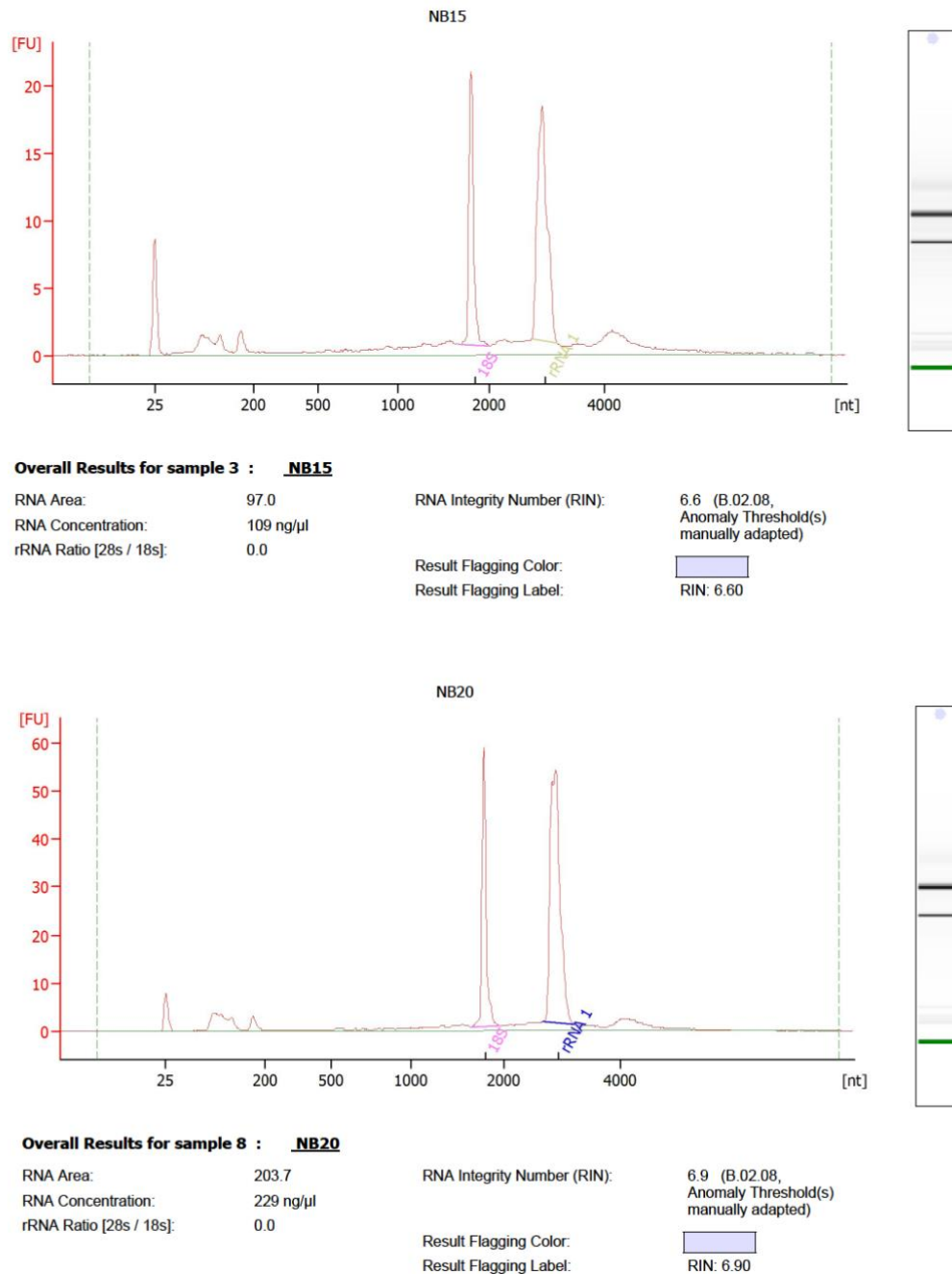
Para o maior entendimento do papel da proteína eIF5A foi proposto o estudo do perfil transcricional da linhagem WT VZL1363 e da linhagem mutante *hyp2-3* VZL1363 de *S. cerevisiae* através de experimentos de RNA-seq. Sabe-se que o transcriptoma é o conjunto total de RNAs transcritos em uma célula, em um tecido, em determinada condição fisiológica. Portanto, a análise de um transcriptoma pode fornecer dados relacionados com a diferença de expressão gênica, identificar transcritos raros ou ainda não conhecidos, identificar variantes de *splicing*, etc, na condição desejada. Portanto, para investigar a atuação de eIF5A no controle da expressão gênica foi realizado o perfil transcricional e o perfil traducional da linhagem WT e da linhagem mutante *hyp2-3* de *S. cerevisiae* a fim de identificar mRNAs cuja tradução é dependente ou mediada por eIF5A.

Assim como trabalhos envolvendo sequenciamento de DNA, a qualidade das amostras do RNA também é muito importante. Para isso, antes de iniciar o procedimento de construção das bibliotecas foi avaliada a integridade do RNA no equipamento *Bioanalyzer* para a obtenção do valor RIN (*RNA Integrity Number*). O índice RIN é um valor que varia de 1 a 10. Amostras com valores de RIN próximo de 8 ou menores sem sinal de degradação são recomendadas para prosseguir com a construção da biblioteca para ser utilizada no sequenciamento. Como observado na Figura 26, todas as amostras possuíam boa qualidade para serem sequenciadas. O eletroferograma mostrou picos definidos correspondentes aos RNAs ribossomais e valor de RIN próximo a 6 sem sinal de degradação.

Figura 26. Eletroferograma das amostras de mRNA total utilizadas para a construção das bibliotecas. O eletroferograma mostra a relação de intensidade dos rRNA. Os picos visualizados correspondem aos rRNA 5,8S, 18S e 25S, respectivamente. NB1: replica biológica selvagem 1, NB10: replica biológica mutante 1, NB15: replica biológica selvagem 2, NB20: replica biológica mutante 2.



Continuação da Figura 26



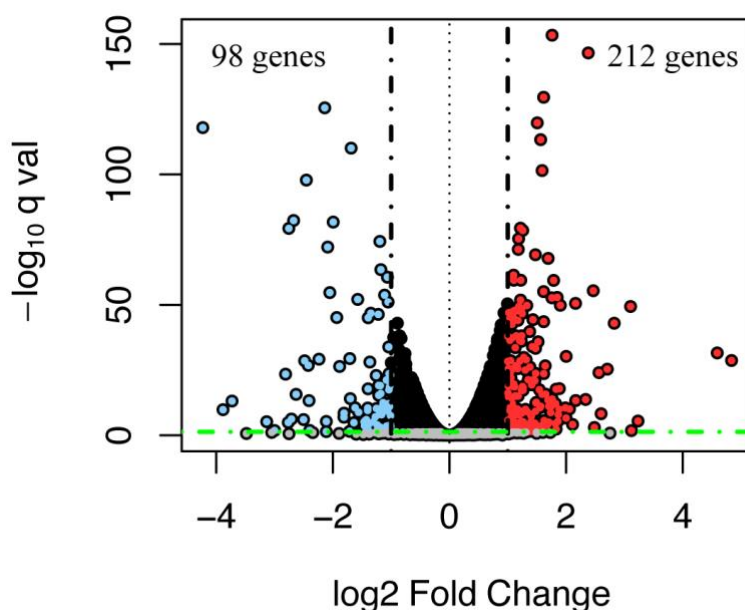
Fonte: autora deste trabalho

Pôde-se observar que após o mapeamento das bibliotecas de RNA-seq, foi possível a identificação de 6.612 genes, valor próximo aos 6.572 genes presentes no genoma de referência (<http://www.yeastgenome.org>). O valor de expressão relativa dos transcritos foi obtido através do programa *Sleuth* (PIMENTEL et al., 2017).

O cálculo da razão da expressão, ou *fold-change*, foi realizado de uma condição em relação a outra, ou seja, do mutante em relação ao selvagem. Para isso, um determinado gene com 95% de probabilidade de ser diferencialmente expresso (ou seja, aqueles encontrados dentro do grupo de genes com valor p-ajustado $\leq 0,05$) foi considerado superexpresso quando o valor de *fold-change* for positivo, ou subexpresso, quando possuir *fold-change* negativo.

A Figura 27 representa as contagens estatísticas após análise dos transcritos. Assim, foram encontrados 2.695 transcritos diferencialmente expressos na linhagem mutante *hyp2-3*, ou seja, com valor p-ajustado menor que 0,05. Considerando o valor de expressão de cada gene da linhagem selvagem igual a 1X, um total de 212 transcritos apresentaram *fold-change* maior ou igual a 2X. Possivelmente, estes genes estão sendo mais expressos na células ou são menos degradados, de acordo com dados de Valentini, *et al.* (2002), há uma forte indução a estabilização de mRNA nos mutantes de eIF5A. Enquanto que 98 genes apresentaram *fold-change* menos que 2X, representando o grupo de genes que menos expressos na linhagem mutante *hyp2-3* quando comparada com a linhagem selvagem.

Figura 27. Gráfico tipo vulcão obtido após análise de transcritos através do *Sleuth*. Acima da linha horizontal verde estão representados os 2.695 transcritos diferencialmente expressos com p menos que 0,05. Em cinza está representada a proporção de transcritos com os valores p maior que 0,05, em vermelho os transcritos com *fold-change* acima de 2 em relação ao selvagem e, em azul, os transcritos com *fold-change* abaixo de 2 em relação ao selvagem.

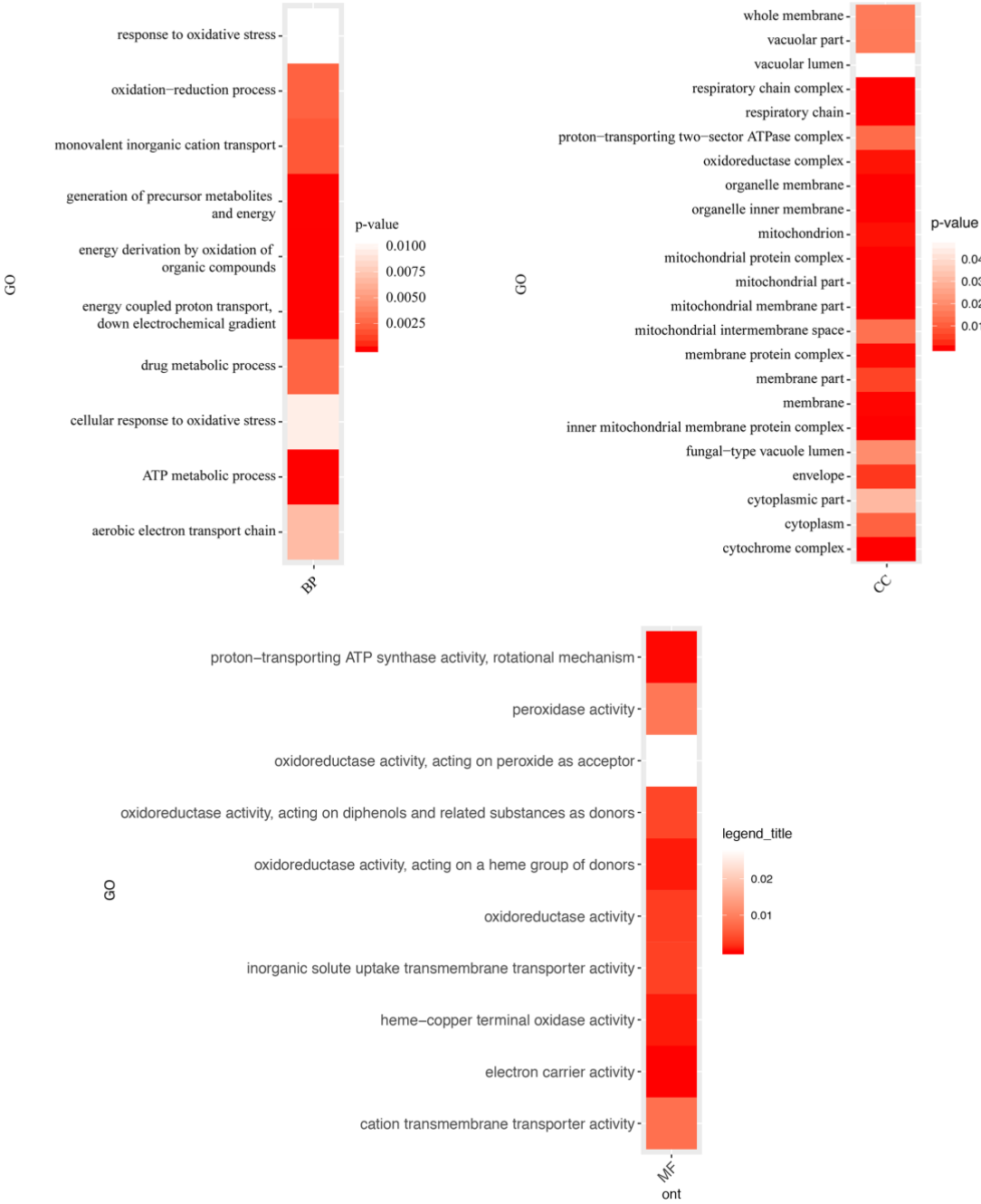


Fonte: autora deste trabalho

Após a seleção dos transcritos diferencialmente expressos foi realizada a análise de enriquecimento utilizando ontologia genética ou *Gene Ontology* (GO) para os genes em grupos de co-expressão, ou seja, para a lista de genes superexpressos e para a lista de genes subexpressos. GO é uma das ontologias mais utilizadas sobre genes e seus produtos, sendo composta por três ontologias independentes conhecidas: processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares. A ontologia de processos biológicos refere-se a processos físicos ou químicos de um gene ou uma proteína. Já a ontologia de funções moleculares está relacionada com as atividades bioquímicas de um produto gênico e, a ontologia de componentes celulares, que representam os locais relativos às estruturas celulares nas quais um produto genético desempenha uma função, compartimentos celulares (por exemplo, mitocôndria) ou complexos macromoleculares estáveis dos quais eles fazem parte (por exemplo, o ribossomo). Diferentemente dos outros aspectos do GO, as classes de componentes celulares não se referem a processos, mas a uma anatomia celular (<http://geneontology.org>). Deste modo, os dados extraídos dos experimentos de RNA-seq (mRNA total) considerados diferencialmente expressos foram analisados com o objetivo de visualizar os principais processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares que foram estimulados ou reprimidos na depleção de eIF5A na célula.

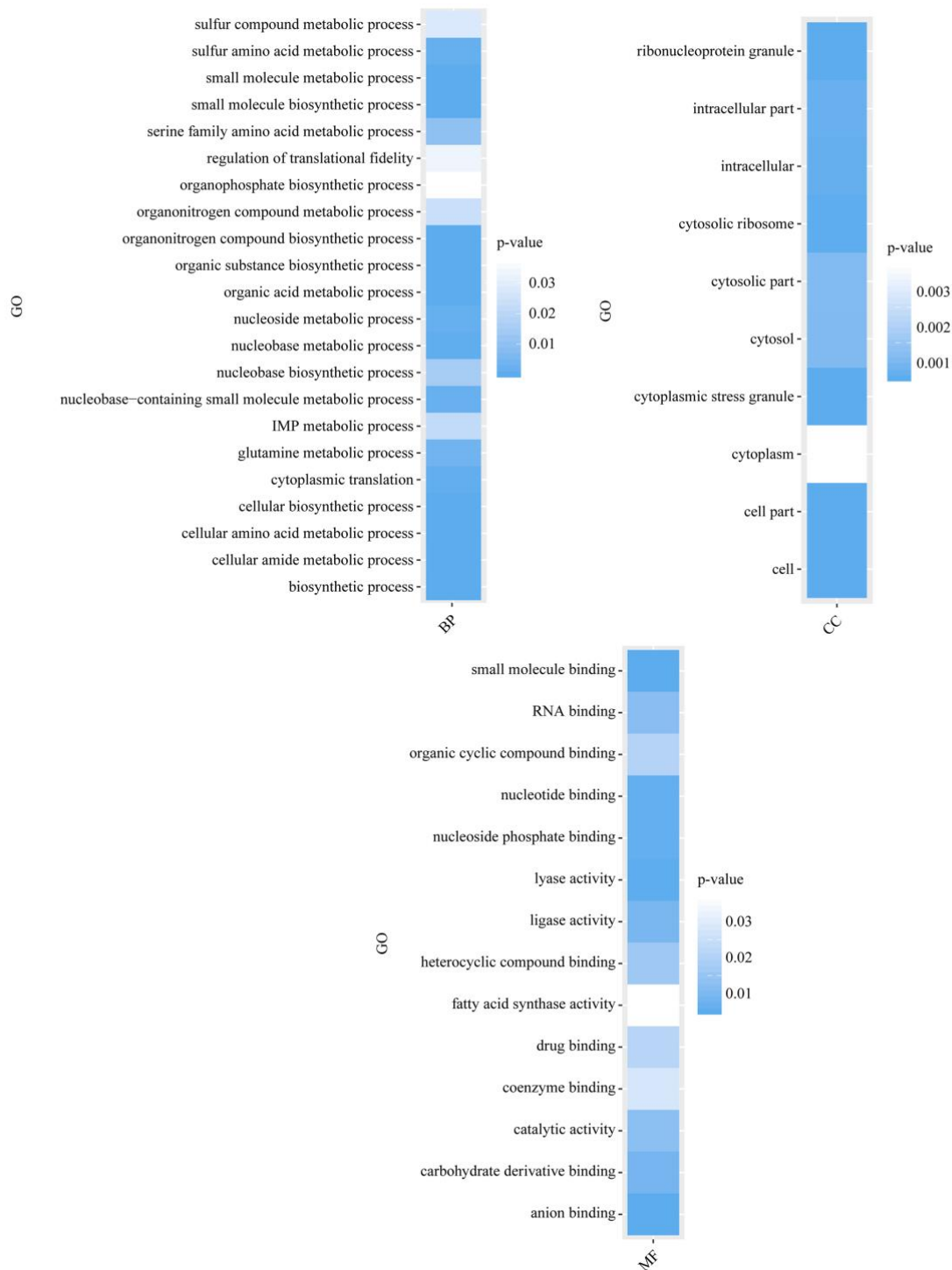
Portanto, para verificar quais processos biológicos e funções moleculares estão reprimidos ou induzidos devido à depleção de eIF5A na célula, foi utilizado o banco de dados *YeastMine* (<https://yeastmine.yeastgenome.org/yeastmine/begin.do>). Estes são subconjuntos de categorias GO gerados a partir do agrupamento de categorias muito específicas e produzindo categorias mais genéticas, assim, a lista obtida foi sumarizada utilizando o programa REVIGO (SUPEK et al., 2011) o que facilita a análise inicial de dados anotados com os termos GO. Assim, a representatividade de genes que compõem processos celulares, funções moleculares e componentes celulares nos grupos mais expressos ou menos expressos estão indicadas nas Figuras 28 e Figura 29, respectivamente.

Figura 28. Termos GO enriquecidos no grupo de genes superexpressos. A. Termo GO para categoria de Processos Biológicos (BP). B. Termo GO para categoria de Componente Celular (CC) C. Termo GO para categoria de Função Molecular (MF).



Fonte: autora deste trabalho

Figura 29. Termos GO enriquecidos no grupo de genes subexpressos. A. Termo GO para categoria de Processos Biológicos (BP). B. Termo GO para categoria de Componente Celular (CC) C. Termo GO para categoria de Função Molecular (MF).



Fonte: autora deste trabalho

Há uma grande variação na expressão gênica de genes que codificam para proteínas mitocôndrias. Interessantemente, observa-se um aumento na expressão de genes compartimentalizados na mitocôndria e o mesmo não é observado na análise de transcritos subexpressos.

Esses dados indicam que há uma resposta celular nuclear dos mutante de eIF5A frente à perda do proteômica mitocondrial.

E que o fenótipo mitocondrial observado nos mutantes de eIF5A está mais diretamente associado ao controle traducional de eIF5A para esses transcritos do que um efeito transcricional.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi gerada coleção de leveduras GFP nos *backgrounds* das linhagens selvagem e mutante de eIF5A (*hyp2-3*), através de cruzamento pelo método de SGA. Também foram quantificados os tamanhos de colônia e intensidade de fluorescência de GFP e E2Crimson a partir das colônias em placa de meio sólido e os dados foram analisados.

Após selecionadas as proteínas diferencialmente presentes no mutante *hyp2-3*, foram realizados ensaios funcionais que correlacionam as proteínas diferencialmente presentes no mutante *hyp2-3* e as funções de eIF5A na célula com alguns fenótipos observados. Em condições de redução da função de eIF5A (temperaturas de crescimento semipermissivas de 30 °C e 33 °C), as células são incapazes de crescer em meio com fonte única de carbono não fermentável (glicerol). A depleção da função de eIF5A por temperatura (33 °C) também demonstra a diminuição dos níveis de tradução de proteínas componentes da cadeia respiratória, essenciais para o correto processamento de fontes de carbono que dependam da mitocôndria para sua oxidação (MERZ; WESTERMANN, 2009; QIAN et al., 2012; STEINMETZ et al., 2002).

Como apresentado nesta tese, nossos dados do perfil proteômico *in vivo* da coleção ORFs-GFP de leveduras mutantes *hyp2-3* demonstraram que mutantes de eIF5A apresentam diversas proteínas mitocondriais com produção diminuída.

Vários ensaios de função mitocondrial revelaram que o mutante *hyp2-3* tem diferenças na fisiologia mitocondrial que por outro lado não é uma perda mitocondrial ou perda de mtDNA. Assim, as diminuições das funções mitocondriais podem ser resultantes da diminuição de proteínas essenciais para o seu funcionamento.

O perfil transcricional do mutante de eIF5A revelou que essa redução de abundância das proteínas mitocondriais não é devido a uma redução geral dos mensageiros e além disso, há uma resposta celular frente a redução de proteínas mitocôndrias com o aumento dos mensageiros que codificariam as proteínas do compartimento mitocondrial. Esse resultado mostra que o fenótipo mitocondrial observado está associado à regulação traducional no mutante de eIF5A.

Interessantemente, a desaceleração das taxas de elongação da tradução por códons raros ou outras sequências causadores de parada ou atraso na tradução podem facilitar a ligação de Partícula Reconhedora de Sinal (SRP) ao ribossomo, o que pode interferir com o direcionamento ao retículo endoplasmático (CHARTRON; HUNT; FRYDMAN, 2016; PECHMANN; CHARTRON; FRYDMAN, 2014). Assim, existem diferentes caminhos pelos

quais eIF5A poderia interferir com a tradução de proteínas direcionadas à mitocôndria ou ao retículo endoplasmático e trabalhos futuros são necessários para abordar os mecanismos pelos quais eIF5A regula a tradução dessas proteínas.

7. Lista de tabelas suplementares

Tabela A1. 65 genes com possível interação genética negativa com eIF5A

Tabela A2. 82 genes com possível interação genética positiva com eIF5A

Tabela A3. 38 genes envolvidos com organização mitocondrial classificados como menos expressos no mutante de eIF5A (*hyp2-3*) em comparação com o selvagem

Tabela A4. Genes *upregulated* estatisticamente significativos no rastreamento visual com a coleção ORFs-GFP .

Tabela A5. Genes *downregulated* estatisticamente significativos no rastreamento visual com a coleção ORFs-GFP .

Tabela A6. Genes *upregulated* agrupados em GO por processo biológico

Tabela A7. Genes *upregulated* agrupados em GO por compartimento celular

Tabela A8. Genes *upregulated* agrupados em GO por função molecular

Tabela A9. Genes *downregulated* agrupados em GO por processo biológico

Tabela A10. Genes *downregulated* agrupados em GO por componente celular

Tabela A11. Genes *downregulated* agrupados em GO por função molecular

8. Referências bibliográficas

- ANTHONY, C.; ZONG, Q.; DE BENEDETTI, A. Overexpression of eIF4E in *Saccharomyces cerevisiae* causes slow growth and decreased alpha-factor response through alterations in CLN3 expression. **J Biol Chem**, [s. l.], v. 276, n. 43, p. 39645–39652, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11479284>>
- APPONI, L. H.; KELLY, S. M.; HARREMAN, M. T.; LEHNER, A. N.; CORBETT, A. H.; VALENTINI, S. R. An interaction between two RNA binding proteins, Nab2 and Pub1, links mRNA processing/export and mRNA stability. **Mol Cell Biol**, Department of Biological Sciences, School of Pharmaceutical Sciences, Sao Paulo State University, UNESP, Araraquara, SP 14801-902, Brazil., v. 27, n. 18, p. 6569–6579, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17636033>
- ASHBURNER, M.; BALL, C. A.; BLAKE, J. A.; BOTSTEIN, D.; BUTLER, H.; CHERRY, J. M.; DAVIS, A. P.; DOLINSKI, K.; DWIGHT, S. S.; EPPIG, J. T.; HARRIS, M. A.; HILL, D. P.; ISSEL-TARVER, L.; KASARSKIS, A.; LEWIS, S.; MATESE, J. C.; RICHARDSON, J. E.; RINGWALD, M.; RUBIN, G. M.; SHERLOCK, G. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. **Nat Genet**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 25–29, 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10802651>>
- BACH, S.; BOUCHAT, O.; PORTETELLE, D.; VANDENBOL, M. Co-deletion of the MSB3 and MSB4 coding regions affects bipolar budding and perturbs the organization of the actin cytoskeleton. **Yeast**, [s. l.], v. 16, n. 11, p. 1015–1023, 2000.
- BAILLY, M.; DE CRÉCY-LAGARD, V. Predicting the pathway involved in post-translational modification of elongation factor P in a subset of bacterial species. **Biol Direct**, Department of Microbiology and Cell Science, University of Florida, Gainesville, FL, USA., v. 5, p. 3, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20070887>>
- BARBOSA, N. M.; BOLDRIN, P. E. G.; ROSSI, D.; YAMAMOTO, P. A.; WATANABE, T. F.; SERRÃO, V. H.; HERSHEY, J. W. B.; FRASER, C. S.; VALENTINI, S. R.; ZANELLI, C. F. Mapping surface residues of eIF5A that are important for binding to the ribosome using alanine scanning mutagenesis. **Amino Acids**, [s. l.], v. 48, v. 2016/07/07, n. 10, p. 2363–2374, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27388480>>
- BARYSHNIKOVA, A.; COSTANZO, M.; DIXON, S.; VIZEACOMAR, F. J.; MYERS, C. L.; ANDREWS, B.; BOONE, C. **Synthetic genetic array (SGA) analysis in *Saccharomyces cerevisiae* and *schizosaccharomyces pombe***. 2. ed. [s.l.] : Elsevier Inc., 2010. v. 470. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(10\)70007-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(10)70007-0)>
- BEN-SHEM, A.; JENNER, L.; YUSUPOVA, G.; YUSUPOV, M. Crystal structure of the eukaryotic ribosome. **Science**, IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire), 1 rue Laurent Fries, BP10142, Illkirch F-67400, France. adam@igbmc.fr, v. 330, n. 6008, p. 1203–1209, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21109664>>
- BENNE, R.; BROWNLUEDI, M. L.; HERSHEY, J. W. B. PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PROTEIN-SYNTHESIS INITIATION-FACTORS EIF-1, EIF-4C, EIF-4D, AND EIF-5 FROM RABBIT RETICULOCYTES. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 253, n. 9, p. 3070–3077, 1978.

BLAHA, G.; STANLEY, R. E.; STEITZ, T. A. Formation of the first peptide bond: the structure of EF-P bound to the 70S ribosome. **Science**, Department of Molecular Biophysics, Yale University, New Haven, CT 06520, USA., v. 325, n. 5943, p. 966–970, 2009. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19696344>

BOONE, C.; BUSSEY, H.; ANDREWS, B. J. Exploring genetic interactions and networks with yeast. **Nat Rev Genet**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 437–449, 2007. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17510664>>

BOUMANS, H.; GRIVELL, L. A.; BERDEN, J. A. The respiratory chain in yeast behaves as a single functional unit. **J Biol Chem**, [s. l.], v. 273, n. 9, p. 4872–4877, 1998. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9478928>>

BRAY, N. L.; PIMENTEL, H.; MELSTED, P.; PACHTER, L. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. **Nature Biotechnology**, [s. l.], v. 34, n. 5, p. 525–527, 2016.

BROACH, J. R. Nutritional control of growth and development in yeast. **Genetics**, [s. l.], v. 192, n. 1, p. 73–105, 2012.

BULLWINKLE, T. J.; ZOU, S. B.; RAJKOVIC, A.; HERSCH, S. J.; ELGAMAL, S.; ROBINSON, N.; SMIL, D.; BOLSHAN, Y.; NAVARRE, W. W.; IBBA, M. (R)- β -lysine-modified elongation factor P functions in translation elongation. **J Biol Chem**, Department of Microbiology, Ohio State University, Columbus, Ohio 43210, USA., v. 288, n. 6, p. 4416–4423, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23277358>>

CANKORUR-CETINKAYA, A.; DERELI, E.; ERASLAN, S.; KARABEKMEZ, E.; DIKICIOGLU, D.; KIRDAR, B. A novel strategy for selection and validation of reference genes in dynamic multidimensional experimental design in yeast. **PLoS One**, [s. l.], v. 7, n. 6, p. e38351, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22675547>>

CARAGLIA, M.; MARRA, M.; GIUBERTI, G.; D'ALESSANDRO, A. M.; BALDI, A.; TASSONE, P.; VENUTA, S.; TAGLIAFERRI, P.; ABBRUZZESE, A. The eukaryotic initiation factor 5A is involved in the regulation of proliferation and apoptosis induced by interferon-alpha and EGF in human cancer cells. **J Biochem (Tokyo)**, Department of Biochemistry and Biophysics, II University of Naples, Via Costantinopoli 16, 80132, Naples, Italy., v. 133, n. 6, p. 757–765, 2003.

CHARTRON, J. W.; HUNT, K. C.; FRYDMAN, J. Cotranslational signal-independent SRP preloading during membrane targeting. **Nature**, [s. l.], v. 536, v. 2016/08/03, n. 7615, p. 224–228, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27487213>>

CHAUVIN, C.; KOKA, V.; NOUSCHI, A.; MIEULET, V.; HOAREAU-AVEILLA, C.; DREAZEN, A.; CAGNARD, N.; CARPENTIER, W.; KISS, T.; MEYUHAS, O.; PENDE, M. Ribosomal protein S6 kinase activity controls the ribosome biogenesis transcriptional program. **Oncogene**, [s. l.], v. 33, n. 4, p. 474–483, 2014.

CHEN, K. Y.; LIU, A. Y. C. Biochemistry and function of hypusine formation on eukaryotic initiation factor 5A. **Biological Signals**, Department of Chemistry, Rutgers University, Piscataway, N.J. 08855-0939, USA. KYCHEN@rutchem.rutgers.edu, v. 6, n. 3, p. 105–109, 1997.

CHONG, Y. T.; KOH, J. L. Y.; FRIESEN, H.; DUFFY, K.; COX, M. J.; MOSES, A.; MOFFAT, J.; BOONE, C.; ANDREWS, B. J.; DUFFY, S. K.; DUFFY, K.; COX, M. J.; MOSES, A.; MOFFAT, J.; BOONE, C.; ANDREWS, B. J. Yeast proteome dynamics from single cell imaging and automated analysis. **Cell**, [s. l.], v. 161, n. 6, p. 1413–1424, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26046442>>

CLEVELAND, W. S.; CLEVELAND, W. S. RobLoc1979. [s. l.], v. 74, n. 368, p. 829–836, 2007.

COSTANZO, M.; BOONE, C. SGAM: an array-based approach for high-resolution genetic mapping in *Saccharomyces cerevisiae*. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, [s. l.], v. 548, p. 37–53, 2009.

DANAIE, P.; ALTMANN, M.; HALL, M. N.; TRACHSEL, H.; HELLIWELL, S. B. CLN3 expression is sufficient to restore G1-to-S-phase progression in *Saccharomyces cerevisiae* mutants defective in translation initiation factor eIF4E. **Biochem J**, Institute for Biochemistry and Molecular Biology, University of Berne, Buhlstrasse 28, CH-3012 Bern, Switzerland., v. 340 (Pt 1, p. 135–141, 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10229668>

DEVER, T. E.; GREEN, R. The elongation, termination, and recycling phases of translation in eukaryotes. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, [s. l.], 2012.

DEVER, T. E.; GUTIERREZ, E.; SHIN, B. S. The hypusine-containing translation factor eIF5A. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, [s. l.], v. 49, n. 5, p. 413–425, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25029904>>

DIAS, C. A.; CANO, V. S.; RANGEL, S. M.; APPONI, L. H.; FRIGIERI, M. C.; MUNIZ, J. R.; GARCIA, W.; PARK, M. H.; GARRATT, R. C.; ZANELLI, C. F.; VALENTINI, S. R. Structural modeling and mutational analysis of yeast eukaryotic translation initiation factor 5A reveal new critical residues and reinforce its involvement in protein synthesis. **Febs J**, Department of Biological Sciences, School of Pharmaceutical Sciences, Sao Paulo State University - UNESP, Araraquara, Brazil., v. 275, n. 8, p. 1874–1888, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18341589>

DIAS, C. A. O.; BORGES GREGIO, A. P.; ROSSI, D.; GALVAO, F. C.; WATANABE, T. F.; PARK, M. H.; VALENTINI, S. R.; ZANELLI, C. F.; GREGIO, A. P. B.; ROSSI, D.; GALVÃO, F. C.; WATANABE, T. F.; PARK, M. H.; VALENTINI, S. R.; ZANELLI, C. F. eIF5A interacts functionally with eEF2. **Amino Acids**, [s. l.], v. 42, n. 2–3, p. 697–702, 2012.

DIXON, S. J.; COSTANZO, M.; BARYSHNIKOVA, A.; ANDREWS, B.; BOONE, C. Systematic mapping of genetic interaction networks. **Annu Rev Genet**, [s. l.], v. 43, p. 601–625, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19712041>>

DOERFEL, L. K.; RODNINA, M. V. Elongation factor P: Function and effects on bacterial fitness. **Biopolymers**, Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Am Fassberg 11, 37077, Goettingen, Germany., 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23828669>>

DUDOIT, S.; YANG, Y. H.; CALLOW, M. J.; SPEED, T. P. Statistical methods for identifying differentially expressed genes in replicated cDNA microarray experiments.

Statistica Sinica, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 111–139, 2002.

ESTEVEZ, G. H. Métodos estatísticos para a análise de dados de cDNA microarray em um ambiente computacional integrado. [s. l.], 2007. Disponível em:
<<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/95/95131/tde-03062007-210232/>>

FRIGIERI, M. C.; JOAO LUIZ, M. V.; APPONI, L. H.; ZANELLI, C. F.; VALENTINI, S. R.; LUIZ, M. V. S. J.; APPONI, L. H.; ZANELLI, C. F.; VALENTINI, S. R. Synthetic lethality between eIF5A and Ypt1 reveals a connection between translation and the secretory pathway in yeast. **Molecular Genetics and Genomics**, Department of Biological Sciences, School of Pharmaceutical Sciences, Sao Paulo State University, UNESP, Rod Araraquara-Jau, km 1, Araraquara, SP, 14801-902, Brazil., v. 280, n. 3, p. 211–221, 2008. Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18568365>

FUJIMURA, K.; CHOI, S.; WYSE, M.; STRNADEL, J.; WRIGHT, T.; KLEMKE, R. Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A (EIF5A) Regulates Pancreatic Cancer Metastasis by Modulating RhoA and Rho-associated Kinase (ROCK) Protein Expression Levels. **J Biol Chem**, [s. l.], 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26483550>>

GANCEDO, J. M. Yeast carbon catabolite repression. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, [s. l.], v. 62, n. 2, p. 334–61, 1998. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9618445>>
<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC98918>>

GHAEMMAGHAMI, S.; HUH, W. K.; BOWER, K.; HOWSON, R. W.; BELLE, A.; DEPHOURE, N.; O'SHEA, E. K.; WEISSMAN, J. S. Global analysis of protein expression in yeast. **Nature**, [s. l.], v. 425, n. 6959, p. 737–741, 2003. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14562106>>

GOLDSTEIN, A. L.; MCCUSKER, J. H. Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, [s. l.], v. 15, n. 14, p. 1541–1553, 1999.

GÖTTERT, H.; MATTIAZZI USAJ, M.; ROSEBROCK, A. P.; ANDREWS, B. J. Reporter-Based Synthetic Genetic Array Analysis: A Functional Genomics Approach for Investigating Transcript or Protein Abundance Using Fluorescent Proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. **Methods Mol Biol**, [s. l.], v. 1672, p. 613–629, 2018. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29043651>>

GREGIO, A. P. B.; CANO, V. P. S.; AVACA, J. S.; VALENTINI, S. R.; ZANELLI, C. F. eIF5A has a function in the elongation step of translation in yeast. **Biochem Biophys Res Commun**, Department of Biological Sciences, School of Pharmaceutical Sciences, Sao Paulo State University-UNESP, Faculdade de Ciencias Farmaceuticas, Rodovia Araraquara-Jau, km 01, Araraquara, SP 14801-902, Brazil., v. 380, n. 4, p. 785–790, 2009. Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19338753>

GUARENTE, L. Strategies for the identification of interacting proteins. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Department of Biology, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge 02139., v. 90, n. 5, p. 1639–1641, 1993. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8446576>>

GUTIERREZ, E.; SHIN, B. S.; WOOLSTENHULME, C. J.; KIM, J. R.; SAINI, P.;

BUSKIRK, A. R.; DEVER, T. E. eif5A promotes translation of polyproline motifs. **Molecular Cell**, [s. l.], 2013.

HAMPSEY, M. A review of phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, [s. l.], v. 13, n. 12, p. 1099–1133, 1997.

HANAUSKEABEL, H. M.; PARK, M. H.; HANAUSKE, A. R.; POPOWICZ, A. M.; LALANDE, M.; FOLK, J. E. INHIBITION OF THE G1-S TRANSITION OF THE CELL-CYCLE BY INHIBITORS OF DEOXYHYPUSINE HYDROXYLATION. **Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research**, [s. l.], v. 1221, n. 2, p. 115–124, 1994.

HANAWA-SUETSUGU, K.; SEKINE, S.; SAKAI, H.; HORI-TAKEMOTO, C.; TERADA, T.; UNZAI, S.; TAME, J. R.; KURAMITSU, S.; SHIROUZU, M.; YOKOYAMA, S. Crystal structure of elongation factor P from *Thermus thermophilus* HB8. **Proc Natl Acad Sci U S A**, RIKEN Genomic Sciences Center, 1-7-22 Suehiro-cho, Tsurumi, Yokohama 230-0045, Japan., v. 101, n. 26, p. 9595–9600, 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15210970>

HENDERSON, A.; HERSHEY, J. W. Eukaryotic translation initiation factor (eIF) 5A stimulates protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Department of Microbiology and Immunology, University of California, 513 Parnassus Avenue, Room S-472, San Francisco, CA 94143, USA., v. 108, n. 16, p. 6415–6419, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21451136>>

HERSCH, S. J.; ELGAMAL, S.; KATZ, A.; IBBA, M.; NAVARRE, W. W. Translation initiation rate determines the impact of ribosome stalling on bacterial protein synthesis. **J Biol Chem**, [s. l.], v. 289, n. 41, p. 28160–28171, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25148683>>

HERSCH, S. J.; WANG, M.; ZOU, S. B.; MOON, K. M.; FOSTER, L. J.; IBBA, M.; NAVARRE, W. W. Divergent Protein Motifs Direct Elongation Factor P-Mediated Translational Regulation in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*. **MBio**, Department of Molecular Genetics, University of Toronto, Toronto, ON, Canada., v. 4, n. 2, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23611909>>

HINNEBUSCH, A. G.; LORSCH, J. R. The mechanism of eukaryotic translation initiation: New insights and challenges. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, [s. l.], v. 4, n. 10, 2012.

HUH, W. K.; FALVO, J. V.; GERKE, L. C.; CARROLL, A. S.; HOWSON, R. W.; WEISSMAN, J. S.; O'SHEA, E. K. Global analysis of protein localization in budding yeast. **Nature**, [s. l.], v. 425, n. 6959, p. 686–691, 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14562095>>

INGOLIA, N. T. Genome-Wide Translational Profiling by Ribosome Footprinting. In: ELSEVIER (Ed.). **Methods in Enzymology, Vol 470: Guide to Yeast Genetics:: Functional Genomics, Proteomics, and Other Systems Analysis, 2nd Edition**. [s.l.: s.n.]. p. 119–142.

JACKSON, R. J.; HELLEN, C. U. T.; PESTOVA, T. V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 113–127, 2010. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1038/nrm2838>>

JAKUS, J.; WOLFF, E. C.; PARK, M. H.; FOLK, J. E. Features of the spermidine-binding site of deoxyhypusine synthase as derived from inhibition studies: Effective inhibition by bis- and mono-guanylated diamines and polyamines. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 268, n. 18, p. 13151–13159, 1993.

JENNER, L.; MELNIKOV, S.; DE LOUBRESSE, N. G.; BEN-SHEM, A.; ISKAKOVA, M.; URZHUMTSEV, A.; MESKAUSKAS, A.; DINMAN, J.; YUSUPOVA, G.; YUSUPOV, M. Crystal structure of the 80S yeast ribosome. **Current Opinion in Structural Biology**, [s. l.], v. 22, n. 6, p. 759–767, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.sbi.2012.07.013>>

KADENBACH, B. Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, [s. l.], v. 1604, n. 2, p. 77–94, 2003.

KAINTH, P.; SASSI, H. E.; PEÑA-CASTILLO, L.; CHUA, G.; HUGHES, T. R.; ANDREWS, B. Comprehensive genetic analysis of transcription factor pathways using a dual reporter gene system in budding yeast. **Methods**, [s. l.], v. 48, v. 2009/03/06, n. 3, p. 258–264, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.02.015>>

KHANG, T. F.; LAU, C. Y. Getting the most out of RNA-seq data analysis. **PeerJ**, [s. l.], v. 2015, n. 10, p. 1–20, 2015.

KLIER, H.; WOHL, T.; ECKERSKORN, C.; MAGDOLEN, V.; LOTTSPEICH, F. Determination and mutational analysis of the phosphorylation site in the hypusine-containing protein Hyp2p. **FEBS Lett**, Max Planck Institute for Biochemistry, Martinsried, Germany., v. 334, n. 3, p. 360–364, 1993.

KNUPP, J.; MARTINEZ-MONTAÑÉS, F.; VAN DEN BERGH, F.; COTTIER, S.; SCHNEITER, R.; BEARD, D.; CHANG, A. Sphingolipid accumulation causes mitochondrial dysregulation and cell death. **Cell Death and Differentiation**, [s. l.], v. 24, n. 12, p. 2044–2053, 2017.

KOH, P. O. Ferulic acid attenuates focal cerebral ischemia-induced decreases in p70S6 kinase and S6 phosphorylation. **Neuroscience Letters**, [s. l.], v. 555, p. 7–11, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2013.09.001>>

KROLL, M. H. Evaluating sequential values using time-adjusted biological variation. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, [s. l.], v. 40, n. 5, p. 499–504, 2002.

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**, Department of Molecular Genetics, the Weizmann Institute of Science, Rehovot 76199, Israel., v. 285, n. 17, p. 12474–12481, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20181941>>

LASSAK, J.; KEILHAUER, E. C.; FÜRST, M.; WUICHET, K.; GÖDEKE, J.; STAROSTA, A. L.; CHEN, J. M.; SØGAARD-ANDERSEN, L.; ROHR, J.; WILSON, D. N.; HÄUSSLER, S.; MANN, M.; JUNG, K. Arginine-rhamnosylation as new strategy to activate translation elongation factor P. **Nat Chem Biol**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 266–270, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25686373>>

LASSAK, J.; WILSON, D. N.; JUNG, K. Stall no more at polyproline stretches with the translation elongation factors EF-P and IF-5A. **Mol Microbiol**, [s. l.], 2015. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26416626>>

LEE-FRUMAN, K. K.; KUO, C. J.; LIPPINCOTT, J.; TERADA, N.; BLENIS, J. Characterization of S6K2, a novel kinase homologous to S6K1. **Oncogene**, [s. l.], v. 18, n. 36, p. 5108–5114, 1999.

LI, C. H.; OHN, T.; IVANOV, P.; TISDALE, S.; ANDERSON, P. eIF5A Promotes Translation Elongation, Polysome Disassembly and Stress Granule Assembly. **Plos One**, Division of Rheumatology, Immunology and Allergy, Brigham and Women's Hospital, Boston, Massachusetts, United States of America., v. 5, n. 4, p. e9942, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20376341>>

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

LUBAS, M.; HARDER, L. M.; KUMSTA, C.; TIESSEN, I.; HANSEN, M.; ANDERSEN, J. S.; LUND, A. H.; FRANKEL, L. B. eIF 5A is required for autophagy by mediating ATG 3 translation. **EMBO reports**, [s. l.], v. 19, n. 6, p. 1–17, 2018.

MAGNUSON, B.; EKIM, B.; FINGAR, D. C. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 441, n. 1, p. 1–21, 2012.

MANDAL, A.; MANDAL, S.; PARK, M. H. Global quantitative proteomics reveal up-regulation of endoplasmic reticulum stress response proteins upon depletion of eIF5A in HeLa cells. **Sci Rep**, [s. l.], v. 6, v. 2016/05/16, p. 25795, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27180817>>

MANI, R.; ST ONGE, R. P.; HARTMAN, J. L.; GIAEVER, G.; ROTH, F. P. Defining genetic interaction. **Proc Natl Acad Sci U S A**, [s. l.], v. 105, v. 2008/02/27, n. 9, p. 3461–3466, 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18305163>>

MATHEWS, M. B.; HERSHEY, J. W. The translation factor eIF5A and human cancer. **Biochim Biophys Acta**, [s. l.], v. 1849, n. 7, p. 836–844, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25979826>>

MELIS, N.; RUBERA, I.; COUGNON, M.; GIRAUD, S.; MOGRABI, B.; BELAID, A.; PISANI, D. F.; HUBER, S. M.; LACAS-GERVAIS, S.; FRAGAKI, K.; BLONDEAU, N.; VIGNE, P.; FRELIN, C.; HAUET, T.; DURANTON, C.; TAUC, M. Targeting eIF5A hypusination prevents anoxic cell death through mitochondrial silencing and improves kidney transplant outcome. **Journal of the American Society of Nephrology**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 811–822, 2017.

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. **J Mol Biol**, [s. l.], 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27196944>>

MÉMIN, E.; HOQUE, M.; JAIN, M. R.; HELLER, D. S.; LI, H.; CRACCHIOLO, B.; HANAUSKE-ABEL, H. M.; PE'ERY, T.; MATHEWS, M. B.; MEMIN, E.; HOQUE, M.; JAIN, M. R.; HELLER, D. S.; LI, H.; CRACCHIOLO, B.; HANAUSKE-ABEL, H. M.; PE'ERY, T.; MATHEWS, M. B.; MÉMIN, E.; HOQUE, M.; JAIN, M. R.; HELLER, D. S.;

LI, H.; CRACCHIOLO, B.; HANAUSKE-ABEL, H. M.; PE'ERY, T.; MATHEWS, M. B. Blocking eIF5A modification in cervical cancer cells alters the expression of cancer-related genes and suppresses cell proliferation. **Cancer Res**, [s. l.], v. 74, n. 2, p. 552–562, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24220243>>

MENEGUELLO, L.; BARBOSA, N. M.; PEREIRA, K. D.; PROENÇA, A. R. G.; TAMBORLIN, L.; SIMABUCO, F. M.; IWAI, L. K.; ZANELLI, C. F.; VALENTINI, S. R.; LUCHESSI, A. D. The polyproline-motif of S6K2: eIF5A translational dependence and importance for protein-protein interactions. **Journal of Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 120, n. 4, p. 6015–6025, 2019.

MERZ, S.; WESTERMANN, B. Genome-wide deletion mutant analysis reveals genes required for respiratory growth, mitochondrial genome maintenance and mitochondrial protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genome Biol**, [s. l.], v. 10, v. 2009/09/14, n. 9, p. R95, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19751518>>

NAGANATHAN, A.; WOOD, M. P.; MOORE, S. D. The large ribosomal subunit protein L9 enables the growth of EF-P deficient cells and enhances small subunit maturation. **PLoS One**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. e0120060, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25879934>>

NAKANISHI, S.; CLEVELAND, J. L. Targeting the polyamine-hypusine circuit for the prevention and treatment of cancer. **Amino Acids**, [s. l.], v. 48, n. 10, p. 2353–2362, 2016.

NEWMAN, J. R.; GHAEMMAGHAMI, S.; IHMELS, J.; BRESLOW, D. K.; NOBLE, M.; DERISI, J. L.; WEISSMAN, J. S. Single-cell proteomic analysis of *S. cerevisiae* reveals the architecture of biological noise. **Nature**, [s. l.], v. 441, v. 2006/05/14, n. 7095, p. 840–846, 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16699522>>

NGUYEN, S.; LEIJA, C.; KINCH, L.; REGMI, S.; LI, Q.; GRISHIN, N. V.; PHILLIPS, M. A. Deoxyhypusine Modification of Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A (eIF5A) Is Essential for *Trypanosoma brucei* Growth and for Expression of Polyprolyl-containing Proteins. **J Biol Chem**, [s. l.], v. 290, n. 32, p. 19987–19998, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26082486>>

OLSEN, G. J.; WOESE, C. R. Archaeal genomics: An overview. **Cell**, [s. l.], v. 89, n. 7, p. 991–994, 1997.

ORTIZ, P. A.; KINZY, T. G. Dominant-negative mutant phenotypes and the regulation of translation elongation factor 2 levels in yeast. **Nucleic Acids Res**, Department of Molecular Genetics, Microbiology and Immunology, UMDNJ Robert Wood Johnson Medical School 675 Hoes Lane, Piscataway, NJ 08854-5635, USA., v. 33, n. 18, p. 5740–5748, 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16214807>

OYEDOTUN, K. S.; LEMIRE, B. D. The quaternary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* succinate dehydrogenase. Homology modeling, cofactor docking, and molecular dynamics simulation studies. **J Biol Chem**, [s. l.], v. 279, v. 2003/12/12, n. 10, p. 9424–9431, 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14672929>>

PARK, M. H. 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, Laboratory of Cellular Development and Oncology, National Institute of Dental Research, Bethesda, Maryland 20892., v. 264, n. 31, p. 18531–18535, 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2509461>>

PARK, M. H.; JOE, Y. A.; KANG, K. R. Deoxyhypusine synthase activity is essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem**, Oral and Pharyngeal Cancer Branch, NIDR, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892-4340, USA. mpark@yoda.nidr.nih.gov, v. 273, n. 3, p. 1677–1683, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9430712>>

PARK, M. H.; LEE, Y. B.; JOE, Y. A. Hypusine is essential for eukaryotic cell proliferation. **Biological Signals**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 115–123, 1997.

PARK, M. H.; WOLFF, E. C.; FOLK, J. E. Is hypusine essential for eukaryotic cell proliferation? **Trends Biochem Sci**, Enzyme Chemistry Section, National Institute of Dental Research, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892., v. 18, n. 12, p. 475–479, 1993.

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**, Program in Developmental Biology, Department of Molecular and Human Genetics, Baylor College of Medicine, Houston, TX 77030, USA., v. 185, n. 7, p. 1181–1194, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19546244>>

PAVAN, I. C. B.; YOKOO, S.; GRANATO, D. C.; CARNIELLI, M.; TAVARES, M. R.; FREITAS, L. B. De; LEME, F. P.; LUCHESSI, A. D.; SIMABUCO, F. M.; BIOSCIENCES, B. Different interactomes for p70-S6K1 and p54-S6K2 revealed by proteomic. [s. l.], p. 1–35, [s.d.].

PECHMANN, S.; CHARTRON, J. W.; FRYDMAN, J. Local slowdown of translation by nonoptimal codons promotes nascent-chain recognition by SRP in vivo. **Nat Struct Mol Biol**, [s. l.], v. 21, v. 2014/11/24, n. 12, p. 1100–1105, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25420103>>

PEIL, L.; STAROSTA, A. L.; LASSAK, J.; ATKINSON, G. C.; VIRUMÄE, K.; SPITZER, M.; TENSON, T.; JUNG, K.; REMME, J.; WILSON, D. N. Distinct XPPX sequence motifs induce ribosome stalling, which is rescued by the translation elongation factor EF-P. **Proc Natl Acad Sci U S A**, [s. l.], v. 110, n. 38, p. 15265–15270, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24003132>>

PELECHANO, V.; ALEPUZ, P. EIF5A facilitates translation termination globally and promotes the elongation of many non polyproline-specific tripeptide sequences. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], 2017.

PENDE, M.; UM, S. H.; MIEULET, V.; STICKER, M.; GOSS, V. L.; MESTAN, J.; MUELLER, M.; FUMAGALLI, S.; KOZMA, S. C.; THOMAS, G. 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. **Molecular and Cellular Biology**, [s. l.], v. 24, n. 8, p. 3112–3124, 2004.

PIMENTEL, H.; BRAY, N. L.; PUENTE, S.; MELSTED, P.; PACHTER, L. Differential analysis of RNA-seq incorporating quantification uncertainty. **Nature Methods**, [s. l.], v. 14, n. 7, p. 687–690, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.4324>>

PULESTON, D. J.; BUCK, M. D.; KLEIN GELTINK, R. I.; KYLE, R. L.; CAPUTA, G.; O'SULLIVAN, D.; CAMERON, A. M.; CASTOLDI, A.; MUSA, Y.; KABAT, A. M.; ZHANG, Y.; FLACHSMANN, L. J.; FIELD, C. S.; PATTERSON, A. E.; SCHERER, S.; ALFEI, F.; BAIXAULI, F.; AUSTIN, S. K.; KELLY, B.; MATSUSHITA, M.; CURTIS, J. D.; GRZES, K. M.; VILLA, M.; CORRADO, M.; SANIN, D. E.; QIU, J.; PÄLLMAN, N.; PAZ, K.; MACCARI, M. E.; BLAZAR, B. R.; MITTLER, G.; BUESCHER, J. M.; ZEHN, D.; ROSPERT, S.; PEARCE, E. J.; BALABANOV, S.; PEARCE, E. L. Polyamines and eIF5A Hypusination Modulate Mitochondrial Respiration and Macrophage Activation. **Cell Metab**, [s. l.], v. 30, v. 2019/05/23, n. 2, p. 352- 363.e8, 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31130465>>

QIAN, W.; MA, D.; XIAO, C.; WANG, Z.; ZHANG, J. The genomic landscape and evolutionary resolution of antagonistic pleiotropy in yeast. **Cell Rep**, [s. l.], v. 2, v. 2012/10/25, n. 5, p. 1399–1410, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23103169>>

RODNINA, M. V; WINTERMEYER, W. Recent mechanistic insights into eukaryotic ribosomes. **Curr Opin Cell Biol**, Max-Planck-Institute for Biophysical Chemistry, Department of Physical Biochemistry, 37077 Göttingen, Germany. Rodnina@mpibpc.mpg.de, v. 21, n. 3, p. 435–443, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19243929>>

ROSSI, D.; KUROSHU, R.; ZANELLI, C. F.; VALENTINI, S. R. eIF5A and EF-P: two unique translation factors are now traveling the same road. **Wiley Interdiscip Rev RNA**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 209–222, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24402910>>

SAINI, P.; EYLER, D. E.; GREEN, R.; DEVER, T. E. Hypusine-containing protein eIF5A promotes translation elongation. **Nature**, [s. l.], 2009.

SCHMIDT, C.; BECKER, T.; HEUER, A.; BRAUNGER, K.; SHANMUGANATHAN, V.; PECH, M.; BERNINGHAUSEN, O.; WILSON, D. N.; BECKMANN, R. Structure of the hypusinylated eukaryotic translation factor eIF-5A bound to the ribosome. **Nucleic Acids Res**, [s. l.], 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26715760>>

SCHNIER, J.; SCHWELBERGER, H. G.; SMIT-MCBRIDE, Z.; KANG, H. A.; HERSHEY, J. W. Translation initiation factor 5A and its hypusine modification are essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Cell Biol**, Department of Biological Chemistry, School of Medicine, University of California, Davis 95616., v. 11, n. 6, p. 3105–3114, 1991.

SCHULLER, A. P.; WU, C. C.; DEVER, T. E.; BUSKIRK, A. R.; GREEN, R. eIF5A Functions Globally in Translation Elongation and Termination. **Mol Cell**, [s. l.], v. 66, v. 2017/04/06, n. 2, p. 194- 205.e5, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28392174>>

SHIN, B.-S.; KATOH, T.; GUTIERREZ, E.; KIM, J.-R.; SUGA, H.; DEVER, T. E. Amino acid substrates impose polyamine, eIF5A, or hypusine requirement for peptide synthesis. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 45, n. 14, p. 8392–8402, 2017. Disponível em: <<http://academic.oup.com/nar/article/45/14/8392/3868901>>

SIMONETTI, A.; MARZI, S.; JENNER, L.; MYASNIKOV, A.; ROMBY, P.; YUSUPOVA, G.; KLAHOLZ, B. P.; YUSUPOV, M. A structural view of translation initiation in bacteria.

Cellular and Molecular Life Sciences, [s. l.], v. 66, n. 3, p. 423–436, 2009.

SMIT-MCBRIDE, Z.; SCHNIER, J.; KAUFMAN, R. J.; HERSHEY, J. W. Protein synthesis initiation factor eIF-4D. Functional comparison of native and unhypusinated forms of the protein. **J Biol Chem**, Department of Biological Chemistry, School of Medicine, University of California, Davis 95616., v. 264, n. 31, p. 18527–18530, 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2509460>>

SMYTH, G. K.; SPEED, T. Normalization of cDNA microarray data. **Methods**, [s. l.], v. 31, n. 4, p. 265–273, 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14597310>>

STAROSTA, A. L.; LASSAK, J.; PEIL, L.; ATKINSON, G. C.; VIRUMÄE, K.; TENSION, T.; REMME, J.; JUNG, K.; WILSON, D. N. Translational stalling at polyproline stretches is modulated by the sequence context upstream of the stall site. **Nucleic Acids Res**, [s. l.], v. 42, n. 16, p. 10711–10719, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25143529>>

STEFFEN, K. K.; MCCORMICK, M. A.; PHAM, K. M.; MACKAY, V. L.; DELANEY, J. R.; MURAKAMI, C. J.; KAEBERLEIN, M.; KENNEDY, B. K. Ribosome deficiency protects against ER stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, [s. l.], v. 191, n. 1, p. 107–118, 2012.

STEINMETZ, L. M.; SCHARFE, C.; DEUTSCHBAUER, A. M.; MOKRANJAC, D.; HERMAN, Z. S.; JONES, T.; CHU, A. M.; GIAEVER, G.; PROKISCH, H.; OEFNER, P. J.; DAVIS, R. W. Systematic screen for human disease genes in yeast. **Nat Genet**, [s. l.], v. 31, v. 2002/07/22, n. 4, p. 400–404, 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12134146>>

STOREY, J. D.; TIBSHIRANI, R. Statistical significance for genomewide studies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 100, n. 16, p. 9440–9445, 2003.

STRACK, R. L.; HEIN, B.; BHATTACHARYYA, D.; HELL, S. W.; KEENAN, R. J.; GLICK, B. S. A rapidly maturing far-red derivative of DsRed-Express2 for whole-cell labeling. **Biochemistry**, [s. l.], v. 48, n. 35, p. 8279–8281, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19658435>>

SUPEK, F.; BOŠNJAK, M.; ŠKUNCA, N.; ŠMUC, T. REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. **PLoS One**, [s. l.], v. 6, v. 2011/07/18, n. 7, p. e21800, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21789182>>

TONG, A. H.; EVANGELISTA, M.; PARSONS, A. B.; XU, H.; BADER, G. D.; PAGE, N.; ROBINSON, M.; RAGHIBIZADEH, S.; HOGUE, C. W.; BUSSEY, H.; ANDREWS, B.; TYERS, M.; BOONE, C. Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants. **Science**, Banting and Best Department of Medical Research, University of Toronto, Toronto ON, Canada M5G 1L6., v. 294, n. 5550, p. 2364–2368, 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11743205>

UDE, S.; LASSAK, J.; STAROSTA, A. L.; KRAXENBERGER, T.; WILSON, D. N.; JUNG, K. Translation elongation factor EF-P alleviates ribosome stalling at polyproline stretches. **Science**, Center for Integrated Protein Science Munich (CiPSM), Ludwig-Maximilians-Universität München, Munich, Germany., v. 339, n. 6115, p. 82–85, 2013. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23239623>>

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

WAGIH, O.; USAJ, M.; BARYSHNIKOVA, A.; VANDERSLUIS, B.; KUZMIN, E.; COSTANZO, M.; MYERS, C. L.; ANDREWS, B. J.; BOONE, C. M.; PARTS, L. SGAtools: one-stop analysis and visualization of array-based genetic interaction screens. **Nucleic Acids Res**, [s. l.], v. 41, v. 2013/05/15, n. Web Server issue, p. W591-6, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23677617>>

WANG, X.; LI, W.; WILLIAMS, M.; TERADA, N.; ALESSI, D. R.; PROUD, C. G. Regulation of elongation factor 2 kinase by p90RSK1 and p70 S6 kinase. **EMBO Journal**, [s. l.], v. 20, n. 16, p. 4370–4379, 2001.

WOLFF, E. C.; KANG, K. R.; KIM, Y. S.; PARK, M. H. Posttranslational synthesis of hypusine: evolutionary progression and specificity of the hypusine modification. **Amino Acids**, Oral and Pharyngeal Cancer Branch, National Institute of Dental and Craniofacial Research, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892-4340, USA., v. 33, n. 2, p. 341–350, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17476569>

WOOLSTENHULME, C. J.; GUYDOSH, N. R.; GREEN, R.; BUSKIRK, A. R. High-precision analysis of translational pausing by ribosome profiling in bacteria lacking EFP. **Cell Rep**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 13–21, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25843707>>

YANG, Y. H.; DUDOIT, S.; LUU, P.; LIN, D. M.; PENG, V.; NGAI, J.; SPEED, T. P. Normalization for cDNA microarray data: A robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. **Selected Works of Terry Speed**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 591–600, 2012.

ZANELLI, C. F.; MARAGNO, A. L. C. C.; GREGIO, A. P. B. B.; KOMILI, S.; PANDOLFI, J. R. J. R.; MESTRINER, C. A.; LUSTRI, W. R.; VALENTINI, S. R. eIF5A binds to translational machinery components and affects translation in yeast. **Biochem Biophys Res Commun**, Department of Biological Sciences, School of Pharmaceutical Sciences, Sao Paulo State University-UNESP, Araraquara, SP 14801-902, Brazil., v. 348, n. 4, p. 1358–1366, 2006.

Anexos

The polyproline-motif of S6K2: eIF5A translational dependence and importance for protein-protein interactions

Leticia Meneguello^{1,2} | Natália M. Barbosa³ | Karina D. Pereira^{1,2} | André R. G. Proença¹ | Leticia Tamborlin^{1,2} | Fernando M. Simabuco⁴  | Leo K. Iwai⁵ | Cleslei F. Zanelli³ | Sandro R. Valentini³ | Augusto D. Luchessi^{1,2} 

¹Laboratory of Biotechnology, School of Applied Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Limeira, Brazil

²Institute of Biosciences, Department of Biology, São Paulo State University (UNESP), Rio Claro, Brazil

³Department of Biological Sciences, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University (UNESP), Araraquara, Brazil

⁴Laboratory of Functional Properties in Foods, School of Applied Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Limeira, Brazil

⁵Special Laboratory of Applied Toxinology, Center of Toxins, Immune-Response and Cell Signaling, LETA/CeTICS, Butantan Institute, Butanta, Brazil

Correspondence

Augusto D. Luchessi, Laboratório de Biotecnologia, Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Rua Pedro Zaccaria, 1300, Limeira 13484-350, São Paulo, Brazil.

Email: augusto.luchessi@fca.unicamp.br

Funding information

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Grant/Award Numbers: 2013/07467-1, 2010/18095-0, 2012/13558-7

Abstract

Ribosomal S6 kinase 1 (S6K1) and S6K2 proteins are effectors of the mammalian target of rapamycin complex 1 pathway, which control the process of protein synthesis in eukaryotes. S6K2 is associated with tumor progression and has a conserved C-terminus polyproline rich motif predicted to be important for S6K2 interactions. It is noteworthy that the translation of proteins containing sequential prolines has been proposed to be dependent of eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) translation factor. Therefore, we investigated the importance of polyproline-rich region of the S6K2 for its intrinsic phosphorylation activity, protein-protein interaction and eIF5A role in S6K2 translation. In HeLa cell line, replacing S6K2 polyproline by the homologous S6K1-sequence did not affect its kinase activity and the S6K2 endogenous content was maintained after eIF5A gene silencing, even after near complete depletion of eIF5A protein. Moreover, no changes in S6K2 transcript content was observed, ruling out the possibility of compensatory regulation by increasing the mRNA content. However, in the budding yeast model, we observed that S6K2 production was impaired when compared with S6K2ΔPro, after reduction of eIF5A protein content. These results suggest that although the polyproline region of S6K2 is capable of generating ribosomal stalling, the depletion of eIF5A in HeLa cells seems to be insufficient to cause an expressive decrease in the content of endogenous S6K2. Finally, coimmunoprecipitation assays revealed that the replacement of the polyproline motif of S6K2 alters its interactome and impairs its interaction with RPS6, a key modulator of ribosome activity. These results evidence the importance of S6K2 polyproline motif in the context of S6Ks function.

KEYWORDS

eukaryotic translation initiation factor 5A, polyproline, protein interaction, ribosomal protein L7a, ribosomal protein S6, ribosomal S6 kinase 2, ribosomal protein S6 kinases

1 | INTRODUCTION

The ribosomal protein S6 kinases (S6Ks) are serine/threonine kinases belonging to the AGC kinase family, likewise PKA, PKG, and PKC. Two S6K genes were described encoding proteins with 83% identity, p70-S6K1 (70 kDa) and p54-S6K2 (54 kDa), wherein the major differences are found in their N-terminus and C-terminus.^{1,2} S6Ks are activated by phosphorylation controlled by phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1)³ and mammalian target of rapamycin complex 1, which is a cellular sensor-stimulated by nutrients availability, adenosine triphosphate and growth factors (IGF-1; insulin). In a condition with low amounts of nutrients, mTOR is inhibited and the autophagy process is enhanced to control the cellular homeostasis.⁴ In addition, the mTOR complex is essential in many metabolic processes, such as cellular growth, transcription, protein synthesis, ribosome biogenesis, transport of nutrients, and spatial cellular control of cytoskeleton.⁵ Both S6Ks are responsible for phosphorylating the ribosomal protein S6, mainly S6K2,⁶ and this activation is essential for protein synthesis and cell cycle progression.^{7,8} In addition, other translational factors, such as eukaryotic translation initiation factor 4B (eIF4B), programmed cell death protein 4 (PDCD4), and eukaryotic elongation factor-2 kinase (eEF2K) are phosphorylated by S6Ks, resulting in protein synthesis stimulation.^{9,10}

The mTOR/S6K pathway deregulation has been associated with some disorders like obesity, diabetes, and cancer.¹¹ Moreover, S6K2 is overexpressed in breast and endometrial cancer with higher frequencies than S6K1.² Furthermore, S6K2 has been involved in proliferation and cell survival in response to mTOR activation, a mechanism related to tumor progression based on the S6K2 requirement rather than S6K1.¹²

While S6K2 is highly homologous to S6K1, most of the regulatory sites are conserved, suggesting a similar activation mechanism (Figure 1a).¹³ Unlike S6K1, S6K2 contains at its C-terminus a nuclear localization signal and a polyproline-rich region with five consecutive prolines (PPPPP). This proline-rich region is conserved among eukaryotes (Figure 1b), suggesting an evolutionary importance of such motif in S6K2 protein. Therefore, S6K2 activation or activity could be influenced by independent mechanisms besides phosphorylation, highlighting the possibility that the polyproline domain could confer differential S6K2 regulation. In addition, it might be important for protein-protein interactions,¹⁴ although such postulation has never been validated for this protein.

Recently, it has been proposed that eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) is required for translation of proteins containing sequences of tri-proline peptides

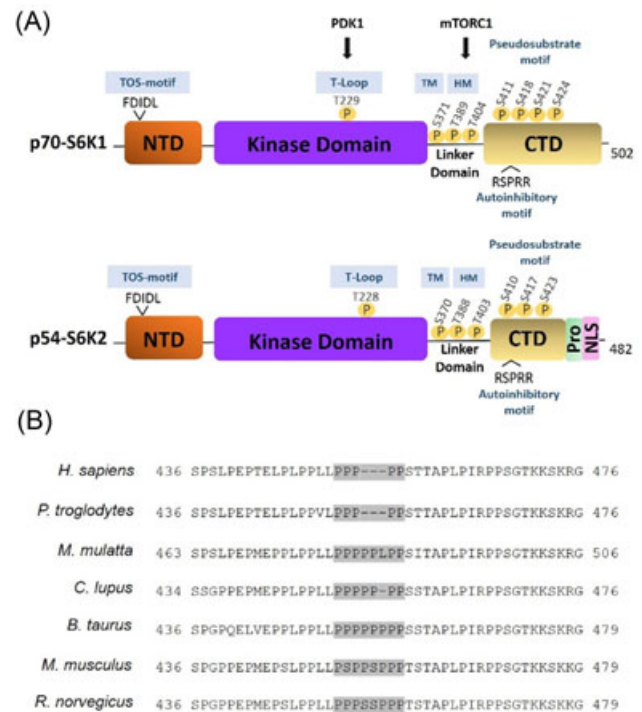


FIGURE 1 A, S6K isoforms and protein domains. The phosphorylation sites that are essential for the activation of proteins are presented (adapted from Magnusson⁹). B, Alignment of the amino acid sequences of the C-terminal regions of S6K2 in different mammals using NCBI HomoloGene. The conservation of the polyproline sequence among different species are highlighted. CTD, C-terminal domain; HM, hydrophobic motif; NLS, nuclear localization signal; NTD, N-terminal domain; Pro, proline-rich domain; S6K, ribosomal S6 kinase; TM, turn motif; TOS-motif, TOR signaling motif

(PPP/PPG) or longer consecutive prolines sequences.¹⁵ Later, other recent studies reinforced those data.¹⁶⁻¹⁹ The interest in studying the mechanism of eIF5A factor relies on the fact that this protein has been correlated with tumorigenesis,^{20,21} cancer metastasis,²² and diseases such as malaria, diabetes,²³ and HIV-1.^{24,25} In addition, eIF5A has been associated with several cellular processes like development and cell differentiation.^{26,27}

Considering the important functions of S6K2 in cell metabolism, this study aimed to investigate the role of its C-terminal polyproline stretch, regarding the translational dependence of eIF5A, kinase activity, and protein-protein interactions.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Cell culture

Human epithelial HeLa cell line derived from a cervical adenocarcinoma was grown in the Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) containing 10% fetal bovine

serum (FBS) (Life Technologies, Inc, Carlsbad, CA) supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, and 100 mg/mL streptomycin (Life Technologies) in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37°C.

2.2 | Quantitative polymerase chain reaction

Two micrograms of total RNA isolated from HeLa cells using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) were used as a template for the synthesis of cDNA using SuperScript¹ III First-Strand Synthesis System (Invitrogen). Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) experiments were performed using 100 ng cDNA, 0.6 mM primers (Exxtend, Paulinia, Brazil), and SYBR Select Master Mix (Applied Biosystem, Warrington, UK). The cycling parameters were: 10 minutes at 95°C followed by 40 cycles of 15 seconds at 95°C, 30 seconds at 60°C, and 30 seconds at 72°C. The relative content of mRNAs was determined after normalization with Tubulin transcript using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. Each set of primers was designed to recognize unique regions of *EIF5A* (forward, 5'-GCTTGCGCGGCTGTCATAG-3'; reverse, 5'-CAGGGTCTTAGTACGCAGG-3'); *RPS6K2B* (forward, 5'-GAGCCTGTGGGACACTATGA-3'; reverse, 5'-ACCTGGAACACCTTGCCATA-3'), and Tubulin (forward, 5'-GCAACAACTCTCCTCTTCG-3'; reverse, 5'-GAATCATCTCCTCCCCCAAT-3').

2.3 | Cell transfection and RNA gene silencing

HeLa cells were seeded at a density of 3×10^5 cells per well in six-well plates, and 4×10^6 in 150 mm diameter dishes, and grown for 24 hours in the regular culture medium. Cells were transfected in serum-free culture medium with the plasmids of interest for 6 hours using the reagent Lipofectamine 2000, following the manufacturer's recommendations (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). After the transfection period, cells were grown in complete culture medium for 24 hours and harvested for further analysis. For gene silencing, the short interfering RNA (siRNA) to *EIF5A* (#10797), and the negative control (nontargeting negative control siRNA, #4390843) were obtained from Life Technologies. Cells were treated using RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific), and 24 hours after the first treatment, cells received the second siRNA treatment. Cells were harvest and analyzed after 48, 72, and 96 hours of the first treatment.

2.4 | Immunoblotting

HeLa cells were rinsed with phosphate-buffered saline (PBS) and lysed in lysis buffer (100 mM Tris/HCl, pH 7.4;

10 mM Na₂ ethylenediamine tetraacetic acid [EDTA], pH 8.0; 1% Triton X-100; and complete EDTA-free protease inhibitor cocktail; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). About 30 µg of total protein extract was resolved by 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Proteins were transferred to nitrocellulose membranes and blocked with Tris-buffered saline with Tween 20 (TBS-T) containing 5% nonfat milk, and the primary and secondary antibodies were diluted in this same buffer. Next, the membranes were incubated overnight at 4°C with the desired primary antibodies. Membranes were washed with TBS-T and incubated for 1 hour at room temperature with the appropriate specific horseradish peroxidase-conjugated anti-immunoglobulin (IgG) (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Finally, membranes were washed with TBS-T and immunoreactive proteins were detected by enhanced chemiluminescence using an enhanced chemiluminescence (ECL) reagent (GE Healthcare).

2.5 | Antibodies

Primary antibodies are rabbit anti-FLAG at 1:10 000, and mouse anti- α -tubulin at 1:5000 (Sigma-Aldrich, St Louis, MI), mouse anti-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase at 1:2000 (Life Technologies), rabbit anti-eIF5A at 1:2000 (Abcam, Cambridge, UK), rabbit anti-S6 phosphorylated in Ser 240/244 at 1:2000, mouse anti-S6 total at 1:2000, rabbit anti-S6K1 at 1:5000 and rabbit anti-ribosomal protein L7a (anti-RPL7a) at 1:2000 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA), rabbit anti-S6K2 at 1:2000 (Thermo Fisher Scientific), rabbit anti-RPL5 at 1:15,000, and rabbit anti-yeIF5A at 1:5,000.²⁸

2.6 | Plasmid constructs

The plasmids pFLAG-p70-S6K1 and pFLAG-p54-S6K2 used in this study were previously obtained.²⁹ For the pFLAG-S6K2 Δ Pro production, the pFLAG-p54-S6K2 plasmid was used as a template. The mutation on the polyproline construction FLAG-S6K2 Δ Pro was performed by PCR with reverse primers containing the bases corresponding to the amino acids of the same region of homology for S6K1. The cloning of the human S6Ks genes into pYES2 vector used as templates the constructs pFLAG-p54-S6K2 and pFLAG-S6K2 Δ Pro. Primer sequences are described in Supporting Information Table S1.

2.7 | Yeast experiments

Yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* VZL 1074 (*MATa ura3 leu2 his3 kanMX4-tetOpr-TIF51AURA3::CMV-tTA*),

with endogenous *TIF51A* gene (human eIF5A gene homolog) expression controlled by a tetracycline/doxycycline-repressible promoter (TET-OFF), was transformed with the plasmids pYES-S6K2, pYES2-S6K2ΔPro, and pBG1805-LDB17, under the *GAL1* promoter (galactose inducible). Initially, those strains were grown in raffinose-containing a SC-ura culture medium and in the presence or absence of doxycycline in the first 7-hour assay. At this time, the content of the eIF5A protein had already begun to reduce in the flasks containing doxycycline. To maintain *TIF51A* transcription repression and induce production of the proteins contained in the galactose-controlled expression vectors (pYES2 and pBG1805), after 7 hours from the start of the assay, the contents of the flasks were centrifuged at 5000g and the culture medium was replaced with medium containing galactose with or without doxycycline. In this way, the production of the S6Ks and LDB17 proteins were induced for 5 hours, with repression of the eIF5A promoter occurring throughout the whole 12 hours assay.

2.8 | Coimmunoprecipitation assays using anti-FLAG antibody coupled with agarose beads

Transfected cells growing in 150 mm diameter dishes were harvested and resuspended in 400 μ L of lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100) containing protease inhibitor cocktail (Roche). Lysates were incubated on ice for 15 minutes and centrifuged at 12 000g for 10 minutes at 4°C. Supernatants were collected and incubated overnight at 4°C with 20 μ L of anti-FLAG agarose-coupled beads (Sigma-Aldrich) under mild agitation. Subsequently, the beads were washed five times with 1 mL of ice-cold TBS (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl) and eluted with 300 ng/ μ L of FLAG peptide (Sigma-Aldrich) at 4°C overnight under moderate agitation. Supernatants were collected and stored at -20°C until mass spectrometry and immunoblotting analysis.

2.9 | Mass spectrometry analyses

Mass spectrometry analyses were performed using the eluates from coimmunoprecipitation anti-FLAG assays (GFP, S6K2, and S6K2ΔPro). Two independent experiments were analyzed. Samples were digested with sequencing grade modified trypsin (Sigma-Aldrich) at a ratio of 1:50 (enzyme:sample) and incubated at 37°C overnight. Samples were desalted using Sep-Pak Light tC18 solid phase extraction columns (Waters Corporation, Milford, MA), concentrated and dried in Speed-Vac (RVC 2-18, Christ, Osterode am Harz, Germany). After complete

drying, samples were resuspended in 0.1% formic acid. Five micrograms of each sample was analyzed on the LTQ Orbitrap Velos mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) coupled to the EASY-nLC II liquid chromatography (Thermo Fisher Scientific). Peptides were separated by a 2% to 40% acetonitrile gradient in 0.1% formic acid over 25 minutes, at a flow rate of 200 nL/min. The sample was electrosprayed by an electrospray nano-flow interface with 2.3 kV on the capillary. For the MS, the spectrometer was operated in a positive mode and spectra were acquired in the *m/z* range of 300 to 1800 Da with 60,000-resolution using data-dependent acquisition, where the top 10 most intense ions per scan were fragmented by collision-induced dissociation. The minimal signal threshold to trigger a data-dependent scan was set to 5,000. The dynamic exclusion duration was set to 70 seconds.

2.10 | Data analyses

Data acquisition was controlled by the computer software Xcalibur 1.4 (Thermo Fisher Scientific). Mass data files (.raw) were converted to.mgf using MS Convert software (v.3.0.4445, ProteoWizard, SourceForge, La Jolla, CA) and analyzed in Mascot (v.2.4; Matrix Science Ltd, Boston, MA), where ± 10 ppm mass tolerance for precursor ions and ± 0.5 Da MS/MS tolerance for fragment ions were applied. A false discovery rate of 0.1% and the score of -10 $\lg P \geq 35$ were applied to accept the sequences. Trypsin was defined for the specificity of the enzymes with at most two miss cleavages, carbamidomethylation of cysteine residues was determined as fixed modification, whereas methionine oxidation, Ser/Thr, and Tyr phosphorylations were defined as variable modifications. Proteins were identified by searching MS data and MS/MS in the *Homo sapiens* database downloaded from NCBI.

Datasets processed by Proteome Discoverer were submitted to the Contaminant Repository for Affinity Purification (CRAPome) analyses (<http://www.crapome.org>), and proteins identified were sorted by Significance Analysis of INteractome (SAINT) score, or the fold change scores FC-A or FC-B. The CRAPome controls CC130, CC135, CC136, CC137, CC139, and CC140 were used, since they were also performed in similar conditions. Proteins with Saint probability (SP) greater than 0.9 and FC-A and FC-B scores greater than 4.0 were considered as having high interaction value.³⁰

2.11 | Statistical analyses

Statistical analyses were performed using the one way analysis of variance test to evaluate the existence of differences between groups. The Tukey test was used to compare the differences between groups. Data were

expressed as a mean $\pm$ standard deviation and the significance considered was 5% ($P < 0.05$). The analyses were performed using Sigma Plot software for Windows, version 10.0 (2006; Systat Software, Erkrath, Germany).

3 | RESULTS

3.1 | The S6K2 Δ Pro was produced similar to S6K2 and the S6 phosphorylation was maintained in the mutant protein in HeLa cells

To certify that transfected cells with the pFLAG-S6K1, pFLAG-S6K2 and pFLAG-S6K2 Δ Pro constructs (Figure 2A) were expressing the proteins of interest; extracts were prepared after 24 hours of transfection and analyzed by immunoblotting. As a result, it was observed that the transfected cells overexpressed all the proteins of interest fused to FLAG peptide. Even the mutated protein, containing a substitution of the proline sequence, was also translated efficiently (Figure 2B). This evaluation is important since it has been reported that mutations on polyproline sequences could negatively affects their production, such as the HIV-2 protein VPX.³¹

To analyze the functionality of the S6K2 Δ Pro protein, we evaluated the content of the phosphorylated RPS6 protein, which is one of the main targets of S6Ks, after the S6Ks overexpression. We observed the overexpression of S6K2 Δ Pro causes a significant increase in phosphorylated RPS6 after 24 hours, as well as S6K1 and S6K2 when compared with empty vector (Figure 2C and 2D). However, there were no significant differences in the phosphorylation state of RPS6 comparing the different S6Ks.

3.2 | Suppression of *EIF5A* by siRNA in HeLa cells does not reduce the endogenous content of S6K2 mRNA or protein

To assess if eIF5A silencing influences the translation of the endogenous S6K2 protein, HeLa cells were treated with siRNA-eIF5A and siRNA-control (negative control) molecules for 48, 72, and 96 hours. RT-qPCR and immunoblotting were performed to evaluate the mRNA and protein content of eIF5A and S6K2, respectively. A decrease in eIF5A protein content at all treatment times was observed, especially at 72 and 96 hours (Figure 3). The results obtained in the RT-qPCR analyses corroborate with those observed in the immunoblotting assays. A significant reduction in the content of *EIF5A* transcript in all treatments was observed when compared with the siRNA control. However, despite the decrease in the amount of the eIF5A protein, no differences were observed in the content of endogenous S6K2 mRNA or protein (Figure 3A, 3B, and 3D).

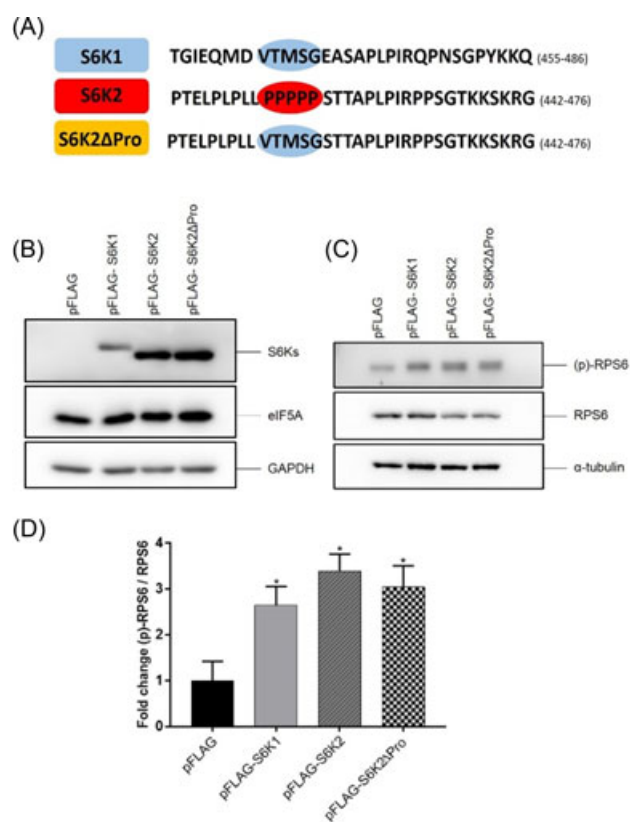


FIGURE 2 A, Representation of the S6K2 Δ Pro protein. S6K2 polyproline (PPPPP) was replaced by the homologous amino acids sequence found in S6K1 (VTMSG). B, Immunoblotting assay showing the expression of S6Ks fused to FLAG in HeLa cells transfected with pFLAG-empty, pFLAG-S6K1, pFLAG-S6K2, and pFLAG-S6K2 Δ Pro constructs after 24 hours. Fusion proteins were detected with an anti-FLAG antibody, the endogenous content of eIF5A was observed with anti-eIF5A antibody, and GAPDH was used as a loading control. C, RPS6 phosphorylated content was evaluated after S6Ks overexpression. The phosphorylated and total forms of RPS6 protein were identified using specific antibodies, and anti- α -tubulin antibody was used as a loading control. Band intensities of each of the proteins were quantified by densitometry. D, Graphic representation of the fold change (p)-RPS6/RPS6. The ratio between the phospho and total RPS6 was normalized with tubulin. Each column represents the mean values of three independent experiments and is shown as mean values. Bars represent mean $\pm$ standard deviation. Statistically significant difference is indicated with a single asterisk ($P < 0.05$). GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; PPPPP, five consecutive prolines; RPS6, ribosomal protein S6; S6K, ribosomal S6 kinase

3.3 | The overexpression of S6K2 was impaired under depletion of eIF5A content in *S. cerevisiae* TET-OFF system

Since several polyproline proteins were demonstrated to have their translation dependent on eIF5A in *S. cerevisiae*,

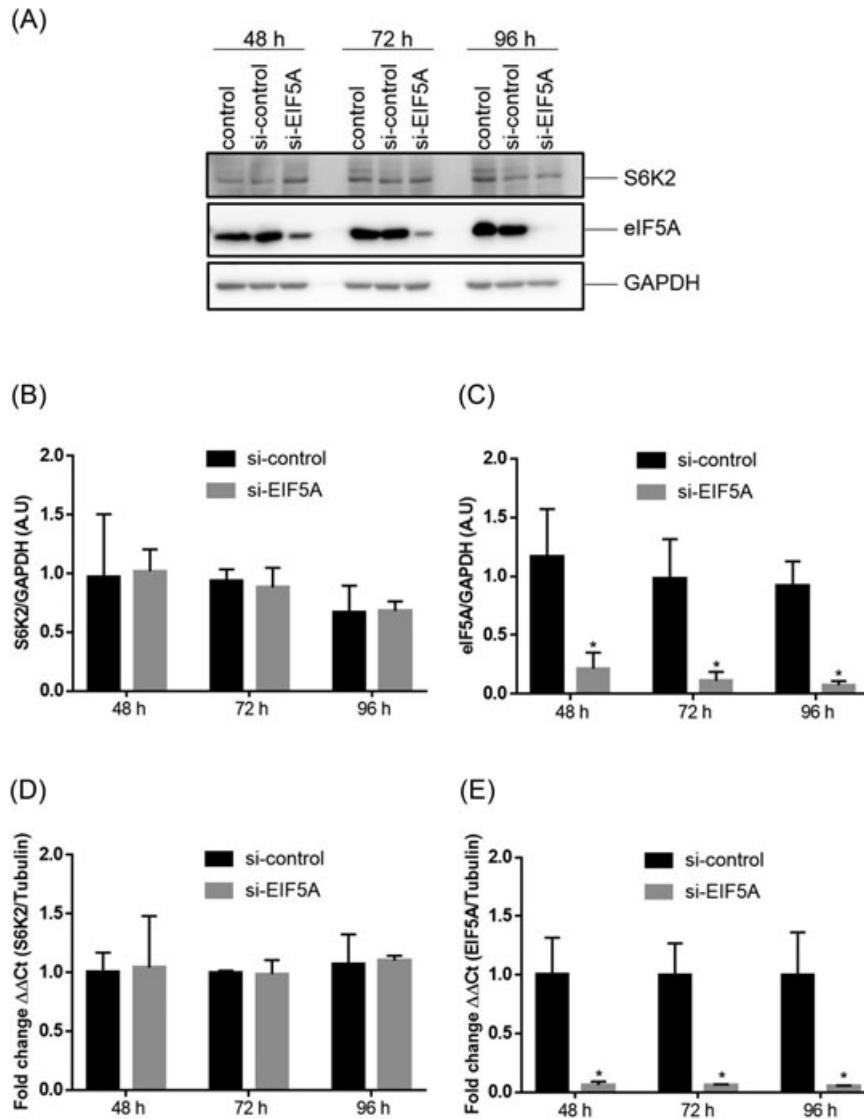


FIGURE 3 Analyses of the endogenous content of S6K2 after eIF5A gene silencing in HeLa cells. A, Immunoblotting assays were performed using total protein extracts from cellular control, negative control siRNA, and cells treated with siRNA-eIF5A at 48, 72, and 96 hours. The endogenous content of S6K2 and eIF5A protein were observed using anti-S6K2 and anti-eIF5A antibody; GAPDH antibody was used for loading controls. The band intensities of the proteins were quantified by densitometry. Columns represent mean of three independent experiments. Bars represent means $\pm$ standard deviation. B, The relative content of S6K2 protein. C, The relative content of eIF5A protein. D, Analyses of the relative content of the *RPS6K2B* and (E) *EIF5A* transcript in HeLa cells. Data are expressed using the fold change of relative expression ratio $\Delta\Delta C_t$ and the significance level was adopted as 5% ($P < 0.05$). Statistical analyses were performed using one-way analysis of variance test to evaluate the existence of differences between groups and the Tukey test was used to compare the differences between groups. eIF5A, eukaryotic translation initiation factor 5A; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; S6K2, ribosomal S6 kinase 2

we decided to test whether translation of human S6K2 depends on eIF5A in yeasts. To shut down eIF5A function, we used a haploid yeast strain in which its sole source of eIF5A is produced from a TET-OFF repressible promoter (VZL1074²⁸). As a control, was used the LDB17 protein, which contains a sequence of nine consecutive proline residues at its C-terminus and has been previously demonstrated to have its translation dependent on eIF5A.¹⁵ Then, it was assayed whether S6K2 and S6K2 Δ Pro proteins

are equally produced upon depletion of eIF5A in yeast. As expected, the production of the LDB17 protein was highly impaired (Figure 4A). We also observed a decreased production of S6K2 protein (Figure 4A and 4B) after eIF5A depletion for 10 hours and 12 hours (Figure 4B and 4C). On the other hand, no decrease was observed for the S6K2 Δ Pro mutant protein levels (Figure 4A). These results suggest a dependence of eIF5A for S6K2 translation in yeasts, and that this dependence is caused by its pentaproline motif.

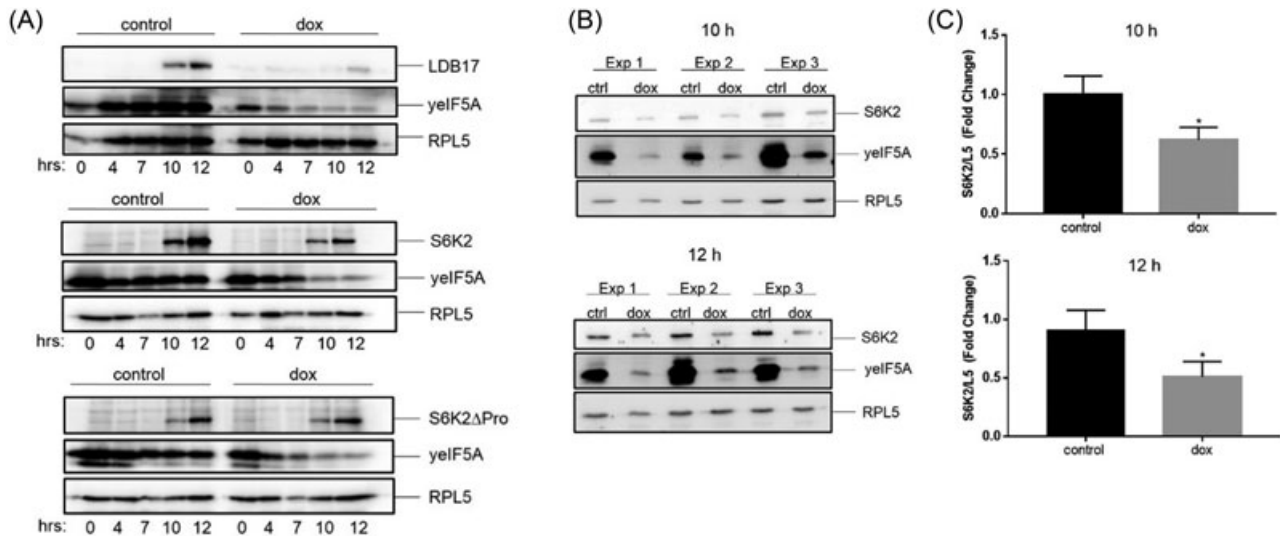


FIGURE 4 Assays using *Saccharomyces cerevisiae* with tetracycline-repressible eIF5A promoter transformed with plasmid vectors containing a galactose-inducible promoter. A, pBG1805-LDB17, pYES2-S6K2, and pYES2-S6K2ΔPro. Yeasts were analyzed to evaluate the repression of eIF5A with doxycycline (dox) followed by induction of the galactose expression of genes contained in the plasmids. Total protein extracts were analyzed by immunoblotting using anti-yelF5A and anti-S6K2 antibodies. The RPL5 antibody was used as loading control. B, Band intensities of S6K2 protein produced at 10 and 12 hours after starting the experiment (3 and 5 hours after induction of the production by galactose, respectively) were quantified by densitometry. Three independent experiments performed in different days were loaded on the same gel. C, Columns represent the mean of three independent experiments. The Tukey test was used to compare the differences between groups. Significance level adopted was 5% ($P < 0.05$). Bars represent means $\pm$ standard deviation. eIF5A, eukaryotic translation initiation factor 5A; RPL, ribosomal protein; S6K2, ribosomal S6 kinase 2

3.4 | The five consecutive polyproline of S6K2 are required for interaction with the ribosomal protein S6

To identify if the S6K2 polyproline region has some influence on interactions with other proteins, coimmunoprecipitation assays of overexpressed FLAG-GFP, FLAG-S6K2, and FLAG-S6K2ΔPro proteins in HeLa cells were performed. To characterize the profile of protein partners, the coimmunoprecipitation products were identified by mass spectrometry analyses. The proteomic data was submitted to the CRAPome server to eliminate possible contaminating proteins (Supporting Information Table S2). The S6K2 interactome and the molecular function network are presented in Supporting Information Figures 1 and 2.

The majority of classified proteins presented a high interaction probability for both S6K2 and S6K2ΔPro (Supporting Information Table S2), suggesting that polyproline region may be important for specific protein interactions (Supporting Information Figure 3). However, it was observed that some protein interactions related to protein synthesis, mainly ribosomal proteins, could be influenced by this motif (Supporting Information Table S3).

We sought to validate by coimmunoprecipitation assay the interaction between S6K2 and the RPS6 (Figure 5A), the main partner of the S6Ks protein. In

addition, the ribosomal protein L7a (RPL7a) protein (Figure 5B) was chosen, since it has been proposed that S6K2 could be involved in ribosomal biogenesis,^{7,29} and by observations that both RPL7a and S6K2 are frequently located at the nucleolus.^{29,32} Besides that, the nuclear import of GFP-tagged RPL7a was proposed to be dependent on the mTOR kinase activity.³³

An immunoblotting assay with a specific antibody for the RPS6 protein revealed that the interaction between S6K2 and RPS6 is impaired for the S6K2ΔPro mutant protein (Figure 5A), suggesting that the polyproline region may contribute to the establishment of this interaction. In addition, although the polyproline motif does not seem to influence S6K2-RPL7a interaction (Figure 5B), the validation of the interaction between these two proteins by immunoprecipitation was demonstrated for the first time.

4 | DISCUSSION

4.1 | Polyproline of S6K2 protein in functional analyses and its translational control

The functional analyses by phosphorylation activity of the mutated protein showed that the overexpression of

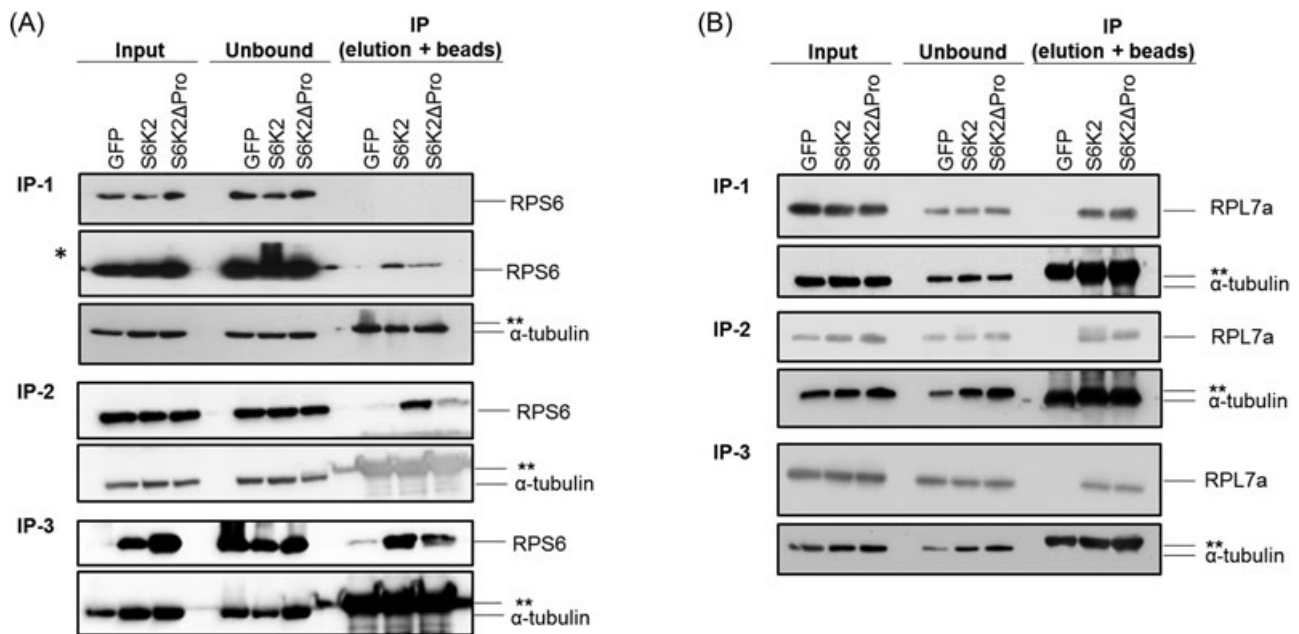


FIGURE 5 The polyproline motif of S6K2 is important for interaction with the ribosomal protein S6, however, is dispensable for interaction with RPL7a. A,B, Immunoblotting assay performed using total extracts protein HeLa cells transfected with pFLAG-GFP, pFLAG-S6K2, and pFLAG-S6K2ΔPro, as input. Anti-FLAG coimmunoprecipitation and the unbound extract are presented. The eluate and beads-coupled with anti-FLAG were loaded together. Total protein extracts were analyzed using anti-RPS6, anti-RPL7a, and anti-tubulin antibody was used as loading control. *Longer exposure period to intensify band visualization; **Visualization of the antibody heavy chain in the eluate sample was performed by incubation with the peroxidase-conjugated anti-IgG mouse polyclonal antibody. RPL7a, ribosomal protein L7a; S6K2, ribosomal S6 kinase 2

S6K2ΔPro causes an increase in the phosphorylation of the RPS6 protein, as well as the overexpression of S6K1 and S6K2 proteins (Figure 2C and 2D). In this context, in vitro and in vivo phosphorylation of the RPS6 protein due to overexpression of S6K1/2 has been demonstrated in previous studies.^{34,35} Since the mutation on its C-terminal does not affect the kinase domain, it is already expected that S6K2ΔPro can also be able to phosphorylate RPS6. In addition, the overexpression of the S6Ks proteins, known as translational stimulators, does not influence the endogenous content of the translation factor eIF5A (Figure 2B). This equality is important to the proper analyses of eIF5A role in the translation of S6K2.

eIF5A is a highly conserved protein among eukaryotes,³⁶ and it has been proposed that it elongates the translation of proteins containing PPP-PPG regions or more consecutive proline residues.¹⁵⁻¹⁷ In this context, a study in sensitive strains of *S. cerevisiae* demonstrated that eIF5A is essential for Bni1 translation.³⁷ Furthermore, some cytoskeletal proteins with polyproline domains (AKAP13, TJP1, TRIP10, and PEAK1) had their content affected due to eIF5A silencing in pancreatic cells.²² However, it does important to note that not only polyproline-proteins were affected by eIF5A depletion.²²

Controversially, an opposite effect has been shown, since mutated VPX, an HIV-2 protein, with a deletion in its polyproline sequence were not translated, thus contributing positively to its translation.³¹ In HeLa cells, most of the polyproline-containing proteins had not their relative content altered by eIF5A depletion for 72 and 96 hours.³⁸ Conversely, the content of some proteins was increased after eIF5A depletion, such as SF3B2, which contains seven consecutive prolines, zyxin, and CKAP4.³⁸ Therefore, a positive and a negative effect on levels of polyproline proteins after the eIF5A depletion has been observed by different studies.

To determine if eIF5A acts on the S6K2 synthesis, eIF5A was silenced using siRNA molecules in HeLa cells (Figure 3A, 3C, and 3E). The eIF5A silencing was considered efficient since the half-life of the protein is relatively high (about 20 hours).^{39,40} Moreover, eIF5A is one of the most abundant proteins in HeLa cells.⁴¹ The combination of these two characteristics can hamper the depletion of eIF5A by siRNA molecules.

In addition, we also sought to evaluate whether eIF5A is important for induced production of S6K2 and S6K2ΔPro conditions, using a haploid yeast strain model which the *TIF51A* gene is produced from a TET-OFF repressible promoter (Figure 4). We observed the

reduction of eIF5A protein impairs cells to produce S6K2 as efficient as when eIF5A is present in standard amounts (Figure 4A-C), in agreement with the previous observation of eIF5A dependence on polyproline proteins in yeasts.¹⁵

However, differences in S6K2 total content in HeLa cells depleted of eIF5A was not observed, even after 96 hours of gene silencing and after reaching low amounts of eIF5A (Figure 3A and 3B). In an attempt to observe a possible compensatory regulation due to eIF5A depletion, mRNA of S6K2 content was evaluated, but no changes have been observed (Figure 3D).

Therefore, we may conclude that eIF5A depletion does not affect S6K2 protein in HeLa cells. Although apparent discrepancy with data obtained from yeasts, the HeLa data are in agreement with Mandal et al,³⁸ whom also did not observe obvious influences on polyproline proteins in HeLa cells after eIF5A depletion. Indeed, the protein synthesis in both systems, although similar, might contain key differences that may account for the results observed. Alternatively, a possible mechanism could exist allowing translation of S6K2 protein in HeLa cells.

Shin et al,¹⁷ using in vitro assays, recently showed that eIF5A greatly favors translation of polyproline-containing proteins. However, translation of those is still occurring at a lower rate in the absence of eIF5A.¹⁷ Considering this scenario, it is possible that the degradation rate of S6K2 could be lower than its synthesis rate, even at low amounts of eIF5A. Besides, the S6K degradation are controlled by proteasome,⁴² and acetylation could increase its half-life to about 15 hours.⁴³

Nonetheless, this does not exclude the observation that even after extreme reduction of eIF5A, the endogenous S6K2 protein content in HeLa did not change in our experimental condition and remained at regular content level. This observation is particularly important since it is well known that eIF5A depletion results in several phenotypes changes, influencing cell cycle,⁴⁴ apoptosis⁴⁵ and especially growth arrest and modulation of protein synthesis in HeLa cells.^{20,38} In addition, depletion of eIF5A has also been proposed as a strategy for cancer prevention and treatment.⁴⁶ These effects observed after eIF5A depletion probably cannot be correlated with reductions in S6K2 expression, an important modulator of protein synthesis.

4.2 | Removing the polyproline stretch influences the S6K2 interaction with RPS6 protein

The comparison between mutant S6K2 Δ Pro and wild-type S6K2 coimmunoprecipitation assays has shown that the polyproline motif of S6K2 protein is relevant for its

interaction with the ribosomal protein S6 (Figure 5A). To our knowledge, this is the first report that shows the importance of the polyproline stretch of S6K2 for RPS6 interaction, highlighting its importance for the conservation of this motif in eukaryotes (Figure 1B) and differences between S6K1 and S6K2 roles in the cell. In fact, by evaluating the interaction between S6K1 and S6K2 with RPS6 protein, Pavan et al²⁹ observed that S6K2, unlike S6K1, may strongly interact with the S6 protein, as evaluated by coimmunoprecipitation assays followed by immunoblotting analysis.²⁹ This data supports our results, since S6K1 does not have the polyproline stretch at the C-terminus, and by removing it from S6K2 protein and replacing it by the homologous sequence present in S6K1 (mutant S6K2 Δ Pro; Figure 2A), its interaction has been diminished (Figure 5A). Besides that, although S6K1 does not seem to strongly interact with RPS6,²⁹ S6K1 phosphorylates RPS6, as well as S6K2 Δ Pro was able to do (Figure 2).

The differential interaction of S6K2 with RPS6, influenced by the polyproline stretch, and possibly other components of the translational machinery as ribosomal proteins, may also explain the major role of S6K2 in protein synthesis when compared with S6K1 protein.⁶

The loss of protein-protein interaction partners of the S6K2 Δ Pro supports previous predictions showing that the polyproline stretch of S6K2 might influence the protein-protein interactions.^{2,14} However, such interaction could occur directly through the PPPPP site, or due to conformational changes in the tertiary protein structure promoted by the polyproline stretch. Finally, the validation of the S6K2-RPL7a interaction was successfully demonstrated for the first time, and although appears to be independent of polyproline motif, this information could be further explored to evaluate the role of the S6Ks in ribosomal biogenesis or its function on nucleolus.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Wirla Tamashiro (UNICAMP, Brazil) for providing HeLa cells. This study was supported by grants 2010/18095-0, 2012/13558-7, and 2013/07467-1 from the São Paulo Research Foundation (FAPESP). LM, NMB, ARGP, KDP, and LT are recipients of FAPESP fellowships 2014/27154-0, 2015/23203-0, 2013/20504-3, 2013/23620-4, and 2017/21914-1, respectively.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

ADL conceived of and supervised the study; LM, NMB, LKI, FMS, CFZ, SRV, and ADL planned the experiments; LM, NMB, KDP, ARGP, LT, and LKI performed experiments; LM, NMB, and ADL wrote the manuscript. All authors reviewed the manuscript and agree with the final version.

ORCID

Fernando M. Simabuco  <http://orcid.org/0000-0002-1672-9686>

Augusto D. Luchessi  <http://orcid.org/0000-0003-2080-3524>

REFERENCES

- Tavares MR, Pavan ICB, Amaral CL, Meneguello L, Luchessi AD, Simabuco FM. The S6K protein family in health and disease. *Life Sci.* 2015;131:1-10.
- Pardo OE, Seckl MJ. S6K2: The neglected S6 kinase family member. *Front Oncol.* 2013;3:191.
- Pullen N, Dennis PB, Andjelkovic M, et al. Phosphorylation and activation of p70s6k by PDK1. *Science.* 1998;279(5351):707-710.
- Eisenberg-Lerner A, Bialik S, Simon HU, Kimchi A. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ.* 2009;16(7):966-975.
- Hall MN. mTOR-what does it do? *Transplant Proc.* 2008;40(10 Suppl):S5-S8.
- Pende M, Um SH, Mieulet V, et al. 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.* 2004;24(8):3112-3124.
- Chauvin C, Koka V, Nouschi A, et al. Ribosomal protein S6 kinase activity controls the ribosome biogenesis transcriptional program. *Oncogene.* 2014;33(4):474-483.
- Koh PO. Ferulic acid attenuates focal cerebral ischemia-induced decreases in p70S6 kinase and S6 phosphorylation. *Neurosci Lett.* 2013;555:7-11.
- Magnuson B, Ekim B, Fingar DC. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *Biochem J.* 2012;441(1):1-21.
- Wang X, Li W, Williams M, Terada N, Alessi DR, Proud CG. Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase. *EMBO J.* 2001;20(16):4370-4379.
- Fenton TR, Gout IT. Functions and regulation of the 70kDa ribosomal S6 kinases. *Int J Biochem Cell Biol.* 2011;43(1):47-59.
- Sridharan S, Basu A. S6 kinase 2 promotes breast cancer cell survival via Akt. *Cancer Res.* 2011;71(7):2590-2599.
- Lee-Fruman KK, Kuo CJ, Lippincott J, Terada N, Blenis J. Characterization of S6K2, a novel kinase homologous to S6K1. *Oncogene.* 1999;18(36):5108-5114.
- Gout I, Minami T, Hara K, et al. Molecular cloning and characterization of a novel p70 S6 kinase, p70 S6 kinase beta containing a proline-rich region. *J Biol Chem.* 1998;273(46):30061-30064.
- Gutierrez E, Shin BS, Woolstenhulme CJ, et al. eIF5A promotes translation of polyproline motifs. *Mol Cell.* 2013;51(1):35-45.
- Pelechano V, Alepuz P. eIF5A facilitates translation termination globally and promotes the elongation of many non polyproline-specific tripeptide sequences. *Nucleic Acids Res.* 2017;45:7326-7338.
- Shin BS, Katoh T, Gutierrez E, Kim JR, Suga H, Dever TE. Amino acid substrates impose polyamine, eIF5A, or hypusine requirement for peptide synthesis. *Nucleic Acids Res.* 2017;45:8392-8402.
- Schuller AP, Wu CC, Dever TE, Buskirk AR, Green R. eIF5A functions globally in translation elongation and termination. *Mol Cell.* 2017;66(2):194-205.e5.
- Melnikov S, Mailliot J, Rigger L, et al. Molecular insights into protein synthesis with proline residues. *EMBO Rep.* 2016;17(12):1776-1784.
- Mémin E, Hoque M, Jain MR, et al. Blocking eIF5A modification in cervical cancer cells alters the expression of cancer-related genes and suppresses cell proliferation. *Cancer Res.* 2014;74(2):552-562.
- Mathews MB, Hershey JWB. The translation factor eIF5A and human cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1849(7):836-844.
- Fujimura K, Choi S, Wyse M, Strnadel J, Wright T, Klemke R. Eukaryotic translation initiation factor 5A (EIF5A) regulates pancreatic cancer metastasis by modulating RhoA and Rho-associated Kinase (ROCK) protein expression levels. *J Biol Chem.* 2015;290:29907-29919.
- Kaiser A. Translational control of eIF5A in various diseases. *Amino Acids.* 2012;42(2-3):679-684.
- Bevec D, Jaksche H, Oft M, et al. Inhibition of HIV-1 replication in lymphocytes by mutants of the Rev cofactor eIF-5A. *Science.* 1996;271(5257):1858-1860.
- Hanauske-Abel HM, Saxena D, Palumbo PE, et al. Drug-induced reactivation of apoptosis abrogates HIV-1 infection. *PLOS One.* 2013;8(9):e74414.
- Luchessi AD, Cambiaghi TD, Hirabara SM, et al. Involvement of eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) in skeletal muscle stem cell differentiation. *J Cell Physiol.* 2009;218(3):480-489.
- Parreiras-e-Silva LT, Luchessi AD, Reis RI, et al. Evidences of a role for eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) in mouse embryogenesis and cell differentiation. *J Cell Physiol.* 2010;225(2):500-505.
- Barbosa NM, Boldrin PE, Rossi D, et al. Mapping surface residues of eIF5A that are important for binding to the ribosome using alanine scanning mutagenesis. *Amino Acids.* 2016;48(10):2363-2374.
- Pavan IC, Yokoo S, Granato DC, et al. Different interactomes for p70-S6K1 and p54-S6K2 revealed by proteomic analysis. *Proteomics.* 2016;16:2650-2666.
- Mellacheruvu D, Wright Z, Couzens AL, et al. The CRAPome: a contaminant repository for affinity purification-mass spectrometry data. *Nat Methods.* 2013;10(8):730-736.
- Miyake A, Fujita M, Fujino H, et al. Poly-proline motif in HIV-2 Vpx is critical for its efficient translation. *J Gen Virol.* 2014;95(Pt 1):179-189.
- Russo G, Ricciardelli G, Pietropaolo C. Different domains cooperate to target the human ribosomal L7a protein to the nucleus and to the nucleoli. *J Biol Chem.* 1997;272(8):5229-5235.

33. Kazyken D, Kaz Y, Kiyan V, et al. The nuclear import of ribosomal proteins is regulated by mTOR. *Oncotarget*. 2014; 5(20):9577-9593.
34. Phin S, Kupferwasser D, Lam J, Lee-Fruman KK. Mutational analysis of ribosomal S6 kinase 2 shows differential regulation of its kinase activity from that of ribosomal S6 kinase 1. *Biochem J*. 2003;373(Pt 2):583-591.
35. Saitoh M, Pullen N, Brennan P, Cantrell D, Dennis PB, Thomas G. Regulation of an activated S6 kinase 1 variant reveals a novel mammalian target of rapamycin phosphorylation site. *J Biol Chem*. 2002;277(22):20104-20112.
36. Rossi D, Kuroshu R, Zanelli CF, Valentini SR. eIF5A and EF-P: two unique translation factors are now traveling the same road. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2014;5(2):209-222.
37. Li T, Belda-Palazón B, Ferrando A, Alepuz P. Fertility and polarized cell growth depends on eif5a for translation of polyproline-rich formins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 2014;197:1191-1200.
38. Mandal A, Mandal S, Park MH. Global quantitative proteomics reveal up-regulation of endoplasmic reticulum stress response proteins upon depletion of eIF5A in HeLa cells. *Sci Rep*. 2016;6:25795.
39. Gerner EW, Mamont PS, Bernhardt A, Siat M. Post-translational modification of the protein-synthesis initiation factor eIF-4D by spermidine in rat hepatoma cells. *Biochem J*. 1986;239(2):379-386.
40. de Almeida O, Toledo T, Rossi D, et al. Hypusine modification of the ribosome-binding protein eIF5A, a target for new anti-inflammatory drugs: understanding the action of the inhibitor GC7 on a murine macrophage cell line. *Curr Pharm Des*. 2014;20(2):284-292.
41. Duncan RF, Hershey JW. Changes in eIF-4D hypusine modification or abundance are not correlated with translational repression in HeLa cells. *J Biol Chem*. 1986;261(27):12903-12906.
42. Wang ML, Panasyuk G, Gwalter J, et al. Regulation of ribosomal protein S6 kinases by ubiquitination. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;369(2):382-387.
43. Fenton TR, Gwalter J, Ericsson J, Gout IT. Histone acetyltransferases interact with and acetylate p70 ribosomal S6 kinases in vitro and in vivo. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010; 42(2):359-366.
44. Hanauske-Abel HM, Park MH, Hanauske AR, Popowicz AM, Lalande M, Folk JE. Inhibition of the G1-S transition of the cell cycle by inhibitors of deoxyhypusine hydroxylation. *Biochim Biophys Acta*. 1994;1221(2):115-124.
45. Caraglia M, Marra M, Giuberti G, et al. The eukaryotic initiation factor 5A is involved in the regulation of proliferation and apoptosis induced by interferon-alpha and EGF in human cancer cells. *J Biochem*. 2003;133(6):757-765.
46. Nakanishi S, Cleveland JL. Targeting the polyamine-hypusine circuit for the prevention and treatment of cancer. *Amino Acids*. 2016;48(10):2353-2362.
47. Maere S, Heymans K, Kuiper M. BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. *Bioinformatics*. 2005;21(16):3448-3449.
48. Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res*. 2003;13(11):2498-2504.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

How to cite this article: Meneguello L, Barbosa NM, Pereira KD, et al. The polyproline-motif of S6K2: eIF5A translational dependence and importance for protein-protein interactions. *J Cell Biochem*. 2019;120:6015-6025.
<https://doi.org/10.1002/jcb.27888>