

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 16/09/2021.

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

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA ISOFORMA A DO FATOR DE INÍCIO DE
TRADUÇÃO DE EUCARIOTOS 5A (eIF5A)**

KARINA DANIELLE PEREIRA-THOMAZ



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

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA ISOFORMA A DO FATOR DE INÍCIO DE
TRADUÇÃO DE EUCARIOTOS 5A (eIF5A)**

KARINA DANIELLE PEREIRA-THOMAZ

Orientador: Prof. Dr. Augusto Ducati Luchessi

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

✱

P436c

Pereira-Thomaz, Karina Danielle

Caracterização funcional da isoforma A do fator de início de tradução de eucariotos 5A (eIF5A) / Karina Danielle Pereira-Thomaz. -- Rio Claro, 2019
87 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientador: Augusto Ducati Luchessi

1. eIF5A1. 2. Isoforma A. 3. Mitocôndria. 4. Metabolismo oxidativo. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp.
Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA ISOFORMA A DO FATOR INÍCIO DE TRADUÇÃO DE EUCARIOTOS 5A (eIF5A)

AUTORA: KARINA DANIELLE PEREIRA THOMAZ

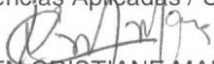
ORIENTADOR: AUGUSTO DUCATI LUCHESSI

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



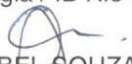
Prof. Dr. AUGUSTO DUCATI LUCHESSI

Faculdade de Ciências Aplicadas / Universidade Estadual de Campinas



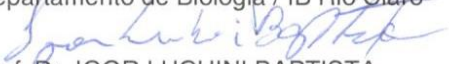
Profa. Dra. KAREN CRISTIANE MARTINEZ DE MORAES

Departamento de Biologia / IB Rio Claro



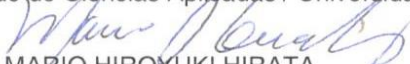
Profa. Dra. MARIA IZABEL SOUZA CAMARGO

Departamento de Biologia / IB Rio Claro



Prof. Dr. IGOR LUCHINI BAPTISTA

Faculdade de Ciências Aplicadas / Universidade Estadual de Campinas



Prof. Dr. MARIO HIROYUKI HIRATA

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas / Universidade de São Paulo

Rio Claro, 16 de setembro de 2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela minha vida, minha saúde e pelas pessoas ao meu redor, sem Ele nada disso seria possível, vêm Dele tudo o que sou o que tenho e o que espero.

Meus sinceros agradecimentos ao meu orientador Prof. Dr. Augusto Ducati Luchessi, grande responsável pela minha formação profissional. Obrigada pelos constantes ensinamentos e oportunidades concedidas, pela confiança depositada durante todos estes anos e pela amizade construída ao longo dessa jornada.

Ao meu marido Danilo Thomaz, meu amor da vida inteira, que sempre fez das minhas escolhas nossas prioridades, me apoiando em todas as decisões que tomei, fazendo dos meus sonhos os seus próprios sonhos. Obrigada pelo constante apoio, confiança, respeito, carinho e pela paciência.

Aos meus familiares, principalmente a minha mãe, por me ensinarem os valores da vida, por me dar apoio e acreditar na minha capacidade desde sempre.

A minha amiga de laboratório Leticia Tamborlin, agradeço pela amizade sempre presente durante esta trajetória. Obrigada pela ajuda, pelos ensinamentos, pelas caronas, por ter colaborado para que os anos fossem mais leves e por todos os bons momentos que vivemos.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia, André Proença, Letícia Meneguello e Mariana Artal, os quais estiveram comigo grande parte desta etapa e a todos aqueles que fizeram parte do laboratório. Obrigada pela ajuda e apoio oferecidos, os quais contribuíram diretamente para a execução deste trabalho e também pela ótima convivência, com muitos bons momentos e risadas dentro e fora do laboratório, que me proporcionaram momentos de descontração e alegria nesta jornada.

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

Agradeço a Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA - UNICAMP) pela estrutura cedida possibilitando a execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Leonardo Reis Silveira e Dr. Tanes Imamura de Lima pela colaboração com os experimentos envolvendo o metabolismo mitocondrial, pelas discussões e trocas de informações relevantes para o trabalho, e ao Prof. Dr. Silvio Consonni pela colaboração com o experimento de microscopia eletrônica de transmissão.

Ao Dr. André Marette da Université Laval - Québec - CA e aos pesquisadores associados do laboratório do Centre de Recherche de l'Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec, por ter possibilitado a realização do estágio de pesquisa, o qual contribuiu grandemente para minha formação profissional e também pessoal.

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

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de doutorado 2013/23620-4, pela bolsa BEPE 2017/11534-7 e pelo auxílio jovem pesquisador JP 2010/18095-0 cedido ao laboratório, o que possibilitou a aquisição de equipamentos e reagentes utilizados neste trabalho.

Por fim, agradeço a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho. A todos vocês o meu sincero agradecimento.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”

Marthin Luther King

RESUMO

O fator de início de tradução de eucariotos 5A (eIF5A) é uma proteína altamente conservada em archaeas e eucariotos. Caracteriza-se por ser a única proteína conhecida a apresentar o resíduo de aminoácido hipusina, produzido a partir de uma modificação pós-traducional denominada hipusinação, a qual é essencial para sua atividade. Atualmente eIF5A é correlacionada com o início, elongação e término da tradução, além disso, sua função têm sido associada com diferentes processos celulares, fisiológicos e patológicos. Em humanos, é predito que eIF5A seja gerada a partir de cinco variantes transcricionais (A, B, C, D e X5). As variantes B, C, D e X5 codificam a proteína canônica isoforma B de 17 kDa, a qual vêm sendo estudada nas últimas décadas. Entretanto, é previsto que a variante A codifique uma isoforma alternativa (isoforma A) de 20 kDa, que tem uma sequência adicional de 30 aminoácidos na extremidade N-terminal. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo caracterizar eventos moleculares inéditos envolvendo a isoforma A de eIF5A1 humana. Neste estudo, mostramos que a isoforma A é produzida em células HeLa, a qual foi mostrada ser passível de hipusinação. Análises de bioinformática mostraram que a isoforma A possui alta probabilidade de direcionamento para mitocôndria. Assim, técnicas de fracionamento subcelular mostraram que a isoforma A co-purifica com a mitocôndria, diferentemente da isoforma B. Análises de silenciamento gênico em células HeLa, utilizando moléculas de siRNA específicas para isoforma A de eIF5A1, mostraram que a depleção da proteína é capaz de causar apoptose, além de reduzir a viabilidade e causar alteração no ciclo celular. Ademais, análises moleculares evidenciaram que essa supressão causou disfunção mitocondrial, a qual foi evidenciada pela alteração na expressão de genes envolvidos no metabolismo oxidativo, e pelo aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROS). Análises de expressão gênica também mostraram que a isoforma A participa do *shift* metabólico (mudança de metabolismo glicolítico para oxidativo e *vice-versa*). Ainda, o aumento da capacidade respiratória pela supressão da isoforma A e alterações na morfofisiologia mitocondrial evidenciados pelo aumento da fissão mitocondrial e número de cristas, sugerem uma atividade desordenada da mitocôndria através de um mecanismo compensatório. Coletivamente, os resultados deste estudo indicam que a isoforma A de eIF5A1 é um componente fundamental no controle da função mitocondrial representando uma

interface promissora para o estudo do metabolismo oxidativo mitocondrial e associação com o processo de síntese proteica.

Palavras-chave: eIF5A1, Isoforma A, Mitocôndria, Metabolismo oxidativo.

ABSTRACT

The eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) is a highly conserved protein in archaeas and eukaryotes. It is characterized by being the only protein known to present the amino acid residue hypusine, produced from a post-translational modification called hypusination, which is essential for its activity. Currently eIF5A is correlated with the beginning, elongation and termination of translation, and its function has been associated with different cellular, physiological and pathological processes. In humans, eIF5A is predicted to be generated from five transcriptional variants (A, B, C, D and X5). Variants B, C, D and X5 encode the 17 kDa canonical protein B, which has been studied in recent decades. However, variant A is expected to encode an alternative 20 kDa isoform (A isoform), which has an additional 30 amino acid sequence in the N-terminal region. In this context, the present study aimed to characterize unpublished molecular events involving the human eIF5A1 isoform A. In this study, we showed that in HeLa cells, isoform A was detected, which was shown to be subject to hypusination. Bioinformatics analysis showed that isoform A has a high probability of targeting mitochondria. Thus, subcellular fractionation techniques have shown that isoform A co-purifies with mitochondria, unlike isoform B. Analysis of gene silencing in HeLa cells using eIF5A1 isoform A-specific siRNA molecules showed that protein depletion is capable of cause apoptosis in cells, as well as decrease viability and cause changes in the cell cycle. In addition, molecular analyzes have shown that this suppression caused mitochondrial dysfunction, which was evidenced by altered expression of genes involved in oxidative metabolism, and increased production of reactive oxygen species (ROS). Gene expression analyzes also showed that isoform A participates in metabolic shift (change from glycolytic to oxidative metabolism and vice versa). Moreover, the increase in respiratory capacity through suppression of isoform A and changes in mitochondrial morphophysiology evidenced by increased mitochondrial fission and number of ridges, suggest a disordered activity of mitochondria through a compensatory mechanism. Collectively, the results of this study indicate that the eIF5A1 isoform A is a key component in mitochondrial function control representing a promising interface for the study of mitochondrial oxidative metabolism and association with the protein synthesis process.

Keywords: eIF5A1, Isoform A, Mitochondria, Oxidative metabolism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – O gene <i>EIF5A1</i> humano, seus transcritos alternativos e as isoformas proteicas produzidas.....	19
Figura 2 – Modificação pós-traducional de eIF5A1: hipusinação.....	20
Figura 3 – Mapa dos vetores plasmidiais pFLAG-CMV5a e peYFP-N1 utilizados nas clonagens.....	31
Figura 4 – Detecção dos transcritos de <i>EIF5A1</i> e suas isoformas em células HeLa.....	46
Figura 5 – Análise da expressão das isoformas de eIF5A1 controlados por códons de iniciação alternativos.....	49
Figura 6 – Modificações pós traducionais de eIF5A1.....	51
Figura 7 – As características comuns entre a isoforma A de eIF5A1 e a proteína NIT1 isoforma 1.....	53
Figura 8 – Detecção da isoforma A de eIF5A1 em extrato mitocondrial expressa heterologamente.....	55
Figura 9 – A extensão N terminal da isoforma A de eIF5A1 direciona a proteína YFP para mitocôndrias.....	56
Figura 10 – Detecção da variante A de <i>EIF5A1</i> e isoforma A, e viabilidade em células HeLa após silenciamento.....	58
Figura 11 – Efeito da depleção de eIF5A1 isoforma A no perfil de ciclo celular e fragmentação.....	60
Figura 12 – Avaliação de fatores relacionados com biogênese mitocondrial após depleção de eIF5A1 isoforma A.....	62
Figura 13 – Análise da expressão de mRNA de genes envolvidos no metabolismo oxidativo após depleção de eIF5A1 isoforma A.....	64
Figura 14 – Avaliação do consumo de oxigênio e produção de EROS após depleção de eIF5A1 isoforma A.....	66
Figura 15 – Análise de microscopia eletrônica de transmissão após depleção de eIF5A1 isoforma A.....	68

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Oligonucleotídeos utilizados nas amplificações por PCR.....	29
Quadro 2 – Oligonucleotídeos utilizados nas amplificações por qPCR.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina trifosfato
CCCP	Protonóforo carbonil cianeto m-clorofenil hidrazona
cDNA	DNA complementar
C-terminal	Extremidade carboxi-terminal
DHS	Desoxihipusina sintase
DMEM	<i>Dulbecco's modification of Eagle's medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP)
DOOH	Desoxihipusina hidroxilase
EBOV	Vírus Ebola
eEF2	Fator de elongação de eucariotos 2
eIF1	Fator de início de tradução de eucariotos 1
eIF1A	Fator de início de tradução de eucariotos 1A
eIF3	Fator de início de tradução de eucariotos 3
eIF5	Fator de início de tradução de eucariotos 5
eIF5A	Fator de início de tradução de eucariotos 5A
eIF5B	Fator de início de tradução de eucariotos 5B
EF-P	Fator de elongação P
EROS	Espécies reativas de oxigênio
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
HDAC	Histona deacetilase
HIV-1	Vírus da Imunodeficiência Humana-1
IgG	Imunoglobulina G
IP	Imunoprecipitação
LC	Cromatografia líquida
mRNA	RNA mensageiro
MS	Espectrometria de massas
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NMD	<i>Nonsense mediated-decay</i>
NPC	Complexo do poro nuclear
N-terminal	Extremidade amino-terminal
OCR	Taxa de consumo de oxigênio

PBS	Tampão fosfato-salino
PCAF	Fator associado ao P300 / CBP
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PGC1 α	Coativador 1-alfa do receptor ativado
PI	Iodeto de propídio
PPAR β	Proliferador de peroxissoma por receptor beta ativado
PPG	Prolina-prolina-glicina
PPP	Prolina-prolina-prolina
PTC	Códon de terminação precoce
RACE	<i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>
REV	Regulador da transcrição do gene viral
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcription</i> - PCR
qPCR	PCR quantitativa
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Dodecil sulfato de sódio - Eletroforese gel de poli-acrilamida
SIRT2	Desacetilase dependente de NAD sirtuina 2
SFB	Soro fetal bovino
SH3	Domínio homólogo de Src 3
TIF51A	Fator de início de tradução de eucariotos 5A-1 isoforma A
TIF51B	Fator de início de tradução de eucariotos 5A-1 isoforma B
TFAM	Fator de transcrição mitocondrial A
Triton X-100	Polietilenoglicol-terc-octilfenil eter
Tween 20	Monolaurato de polietilenoglicol-sorbitana
UPLC	Cromatografia líquida de ultra performance
ZIKV	Virus Zika
YFP	<i>Yellow fluorescent protein</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
®	Marca registrada
™	Marca registrada
%	Percentual
°C	Graus Celsius
xg	Aceleração gravitacional
μL	Microlitro
μM	Micromolar
μg	Micrograma
A	Absorbância
CaCl_2	Cloreto de cálcio
cm^2	Centímetro quadrado
CO_2	Dióxido de carbono
DEPC	Dicarbonato de dietila
DMSO	Dimetilsufóxido
DO	Densidade óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
HCl	Ácido clorídrico
KCl	Cloreto de potássio
kDa	Quilodálton
KH_2PO_4	Fosfato monopotássico
L	Litro
M	Molar
MgCl_2	Cloreto de magnésio
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar

mm	Milímetro
m/z	Massa/carga
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Fosfato dissódico heptahidratado
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
pmol	Picomol
rpm	Rotação por minuto
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
U	Unidade de atividade enzimática
V	Volt

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVO	25
2.1 OBJETIVO GERAL	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1 Reagentes e anticorpos	26
3.2 Cultivo de células da linhagem de adenocarcinoma de colo de útero humano (HeLa).....	27
3.3 Extração de RNA total utilizando TRIzol®	27
3.4 Síntese de cDNA: Transcrição reversa (RT).....	28
3.5 Reação em cadeia pela polimerase (PCR).....	28
3.6 Clonagem de DNA utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	29
3.6.1 Preparação dos insertos	29
3.6.2. Defosforilação do vetor plasmidial.....	30
3.6.3. Reação de ligação do inserto	30
3.7 Preparo de <i>E. coli</i> competente.....	31
3.8 Transformação de <i>E. coli</i> competente	32
3.9 Preparação de DNA plasmidial de <i>E. coli</i> em pequena escala (Miniprep)	32
3.10 Preparação de DNA plasmidial de <i>E. coli</i> em média escala (Midiprep)	33
3.11 Transfecção celular.....	33
3.12 Silenciamento gênico por RNA de interferência	34
3.13 Reação em cadeia pela polimerase (PCR) em tempo real	34
3.14 Rapid amplification of 5' complementary DNA ends (RACE 5')	36
3.15 Preparação de extratos proteicos e quantificação de proteína total	36
3.16 SDS-PAGE seguido de <i>immunoblotting</i>	36
3.17 Preparação de concentrados mitocondriais.....	37
3.18 Avaliação da viabilidade celular	38
3.19 Análise de DNA fragmentado e ciclo celular por citometria de fluxo.....	38
3.20 Dosagem de lactato	38
3.21 Inibição da LD e indução de hipóxia	39
3.22 Análise de espécies reativas de oxigênio (EROS).....	39
3.23 Consumo de oxigênio celular (OCR)	39

3.24 Ensaio de co-imunoprecipitação	40
3.25 Espectrometria de massas	41
3.26 Microscopia eletrônica de transmissão	42
3.27 Análise Estatística	43
4 RESULTADOS	44
4.1 CAPÍTULO 1: Códon de iniciação alternativo conecta eIF5A à mitocôndria....	44
4.1.1 O transcrito variante B de <i>EIF5A1</i> é expresso prioritariamente e o conteúdo de eIF5A1 isoforma B é maior do que o de isoforma A	45
4.1.2 O transcrito variante A codifica ambas as isoformas de eIF5A1, mas há uma maior produção da isoforma B em relação à isoforma A.....	47
4.1.3 O menor conteúdo de isoforma A em relação à isoforma B é causado pela diferença na eficiência de iniciação da tradução, exclusivamente devido à natureza dos nucleotídeos que flanqueiam os seus códons de iniciação	47
4.1.4 Modificação pós-traducional de eIF5A1 isoforma A	50
4.1.5 Análises in silico dos 30 resíduos de aminoácidos adicionais no N-terminal da isoforma A sugerem relação com as mitocôndrias.....	52
4.1.6 A proteína exógena eIF5A1 isoforma A-FLAG é co-purificada com mitocôndrias	54
4.2 CAPÍTULO 2: O silenciamento da isoforma A de eIF5A1 induz apoptose pela interferência do metabolismo oxidativo mitocondrial em células HeLa	57
4.2.1 A perda da viabilidade de células HeLa está associada ao conteúdo reduzido do transcrito variante A de <i>EIF5A1</i>	57
4.2.2 Inibição da variante A do <i>EIF5A1</i> interfere no perfil do ciclo celular	59
4.2.3 O silenciamento da variante A de <i>EIF5A1</i> modula o metabolismo energético na HeLa humana	61
4.2.4 A eIF5A1 isoforma A participa do shift metabólico	63
4.2.5 O silenciamento da variante A de <i>EIF5A1</i> estimula a taxa de consumo de oxigênio e aumenta a produção de EROS em células HeLa	65
4.2.6 Alteração da dinâmica mitocondrial após supressão de eIF5A1 isoforma A	67
5 DISCUSSÃO GERAL	70
6 CONCLUSÕES	75
REFERÊNCIAS.....	76
ANEXO I – Lista de Produção Bibliográfica	85

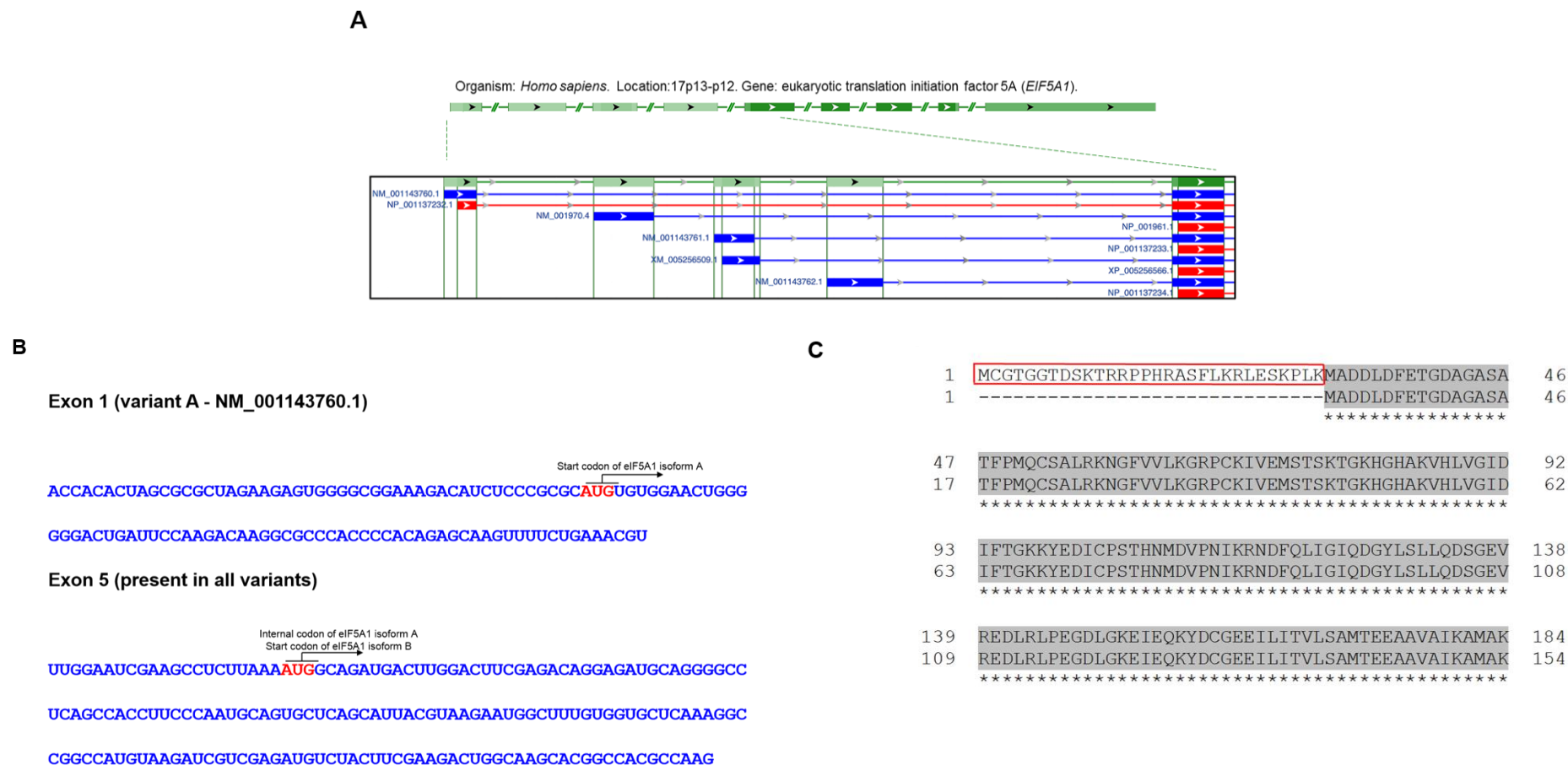
1 INTRODUÇÃO

O fator de início de tradução de eucariotos 5A (eIF5A) é uma proteína essencial de aproximadamente 17 kDa e altamente conservada em eucariotos e entre seus homólogos de arqueas (Klier *et al.*, 1993; Park *et al.*, 1993; Park *et al.*, 1997). As proteínas eIF5A da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e de humanos compartilham 63% de identidade, sendo que a proteína humana substitui a de levedura, indicando que eIF5A atua em processos celulares comuns nesses organismos (Schnier *et al.*, 1991; Chen e Liu, 1997).

Em *S. cerevisiae*, eIF5A é codificado pelos genes *TIF51A* (*HYP2*) e *TIF51B* (*ANB1*), os quais produzem eIF5A com 90% de identidade. Estes genes são regulados transcricionalmente pelos níveis de oxigênio, sendo expressos em condições aeróbicas (*TIF51A*) e anaeróbicas (*TIF51B*) (Schnier *et al.*, 1991; Klier *et al.*, 1993). Estudos utilizando linhagens expressando *TIF51A* ou *TIF51B*, sob o controle de um promotor induzível, mostraram que a expressão de ambos os genes é suficiente para manter o crescimento celular nas situações de aerobiose ou anaerobiose, indicando que as proteínas codificadas por estes genes apresentam funções redundantes (Schwelberger *et al.*, 1993). Em humanos, eIF5A também é codificado por diferentes genes, *EIF5A1* e *EIF5A2*, os quais são filogeneticamente conservados e presentes nos vertebrados (Jenkins *et al.*, 2001).

Em *Homo sapiens* o gene *EIF5A1* codifica eIF5A1, a proteína que tem sido investigada na maioria dos estudos desde sua identificação, enquanto o gene *EIF5A2* codifica eIF5A2, a qual se mostrou altamente associado com processo de tumorigênese (Wang *et al.*, 2013). O gene *EIF5A1* está localizado no cromossomo 17 (17p13-12) e contém 5 éxons. Cinco variantes transcricionais codificadas a partir de *EIF5A1* (variantes A, B, C, D, e X5) estão registradas nas bases de dados (Figura 1A). O papel biológico dos éxons alternativos é desconhecido, no entanto, neste trabalho encontra-se validado que a variante A codifica uma isoforma alternativa (eIF5A1 isoforma A), enquanto que todas as outras variantes codificam a mesma isoforma canônica (eIF5A1 isoforma B). De fato, a variante A possui um códon de iniciação alternativo anterior ao códon de iniciação das outras variantes (Figura 1B). Como consequência, a isoforma A possui uma sequência adicional de 30 aminoácidos no seu N-terminal (MCGTGGTDSKTRRPPHRASFLKRLESKPLK) quando comparada com a isoforma B (Figura 1C).

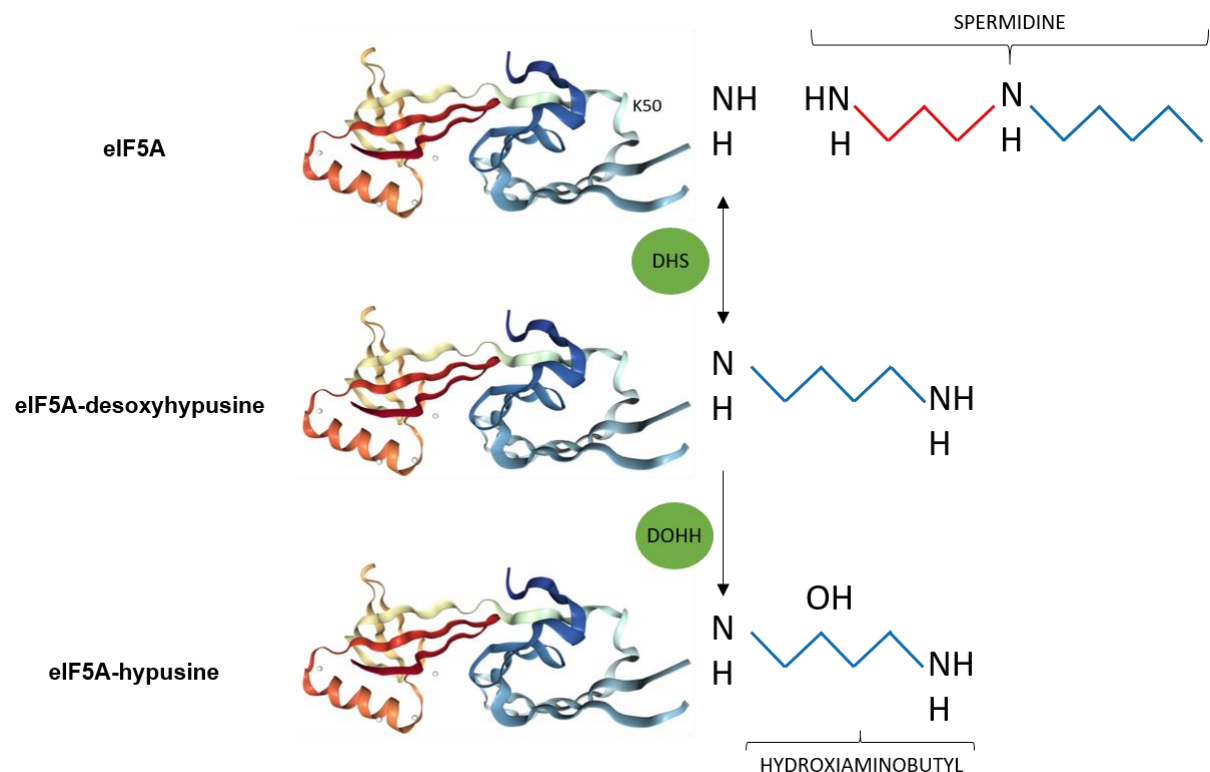
Figura 1 – O gene *EIF5A1* humano, seus transcritos alternativos e as isoformas proteicas produzidas.



(A) Representação esquemática do cromossomo humano 17 do segmento (7.306.999- 7.312.463) correspondente ao gene *EIF5A1* (NC_000017.11). Os éxons e introns estão representados com os segmentos cinzas largos e estreitos, respectivamente. Os transcritos variante A (NM_001143760.1), B (NM_001970.4), C (NM_001143761.1), X5 (XM_005256509.1) e D (NM_001143762.1) estão representados com os grandes segmentos pretos. As sequências de codificação para eIF5A1 isoformas A e B estão representadas com os segmentos brancos e largos. (B) Sequência correspondente ao éxon 1 (pertencente ao transcrito variante A) e ao éxon 5 (comum a todas as variantes transcricionais). Os códons de iniciação para eIF5A1 isoformas A e B estão destacados em negrito. (C) Alinhamento da sequência de aminoácidos de eIF5A1 isoformas A e B. Os 30 resíduos de aminoácidos adicionais no N-terminal da eIF5A1 isoforma A estão destacados na caixa cinza. Fonte: (Pereira *et al.*, 2016).

eIF5A apresenta um resíduo de aminoácido, ainda não encontrado em outra proteína, denominado hipusina [Nε-(4-amino-2-hidroxibutil)-lisina]. A hipusina é formada a partir de uma modificação pós-traducional denominada hipusinação (Chen e Liu, 1997; Park *et al.*, 1997). A hipusinação de eIF5A inicia-se com a transferência do radical 4-aminobutil da espermidina para o grupo ε-amino de um resíduo de lisina específica de EIF5A (Lys50, em humanos) por meio de uma reação reversível catalisada pela enzima desoxihipusina sintase (DHS). Ao término da reação, o resíduo de lisina é modificado em desoxihipusina. A seguir, o resíduo desoxihipusina é hidroxilado, por meio de uma reação irreversível mediada pela enzima desoxihipusina hidroxilase (DOHH), produzindo o resíduo hipusina (Figura 2) (Park, 2006; Park *et al.*, 2010).

Figura 2 – Modificação pós-traducional de eIF5A1: hipusinação.



O grupo aminobutil da espermidina é transferido para o grupo amino do resíduo específico de lisina (50 em eIF5A de humanos) pela enzima desoxihipusina sintase (DHS). Em seguida, o intermediário de eIF5A é hidroxilado, pela desoxihipusina hidroxilase (DOHH), formando assim eIF5A hipusinado. Fonte: Elaborado pela autora.

Uma modificação pós-traducional correlacionada com a hipusinação ocorre em um ortólogo de *EIF5A* encontrado em bactérias, o fator de elongação P (EF-P), em que apresenta no resíduo de aminoácido correspondente uma modificação de lisinação (Rossi *et al.*, 2014). Sabe-se que o processo de hipusinação é essencial para a viabilidade celular, pois células nas quais ela foi bloqueada, se tornaram inviáveis (Schnier *et al.*, 1991; Sasaki *et al.*, 1996; Park *et al.*, 1997). O fato de eIF5A ser a única proteína eucariótica que sofre hipusinação evidencia uma atividade biológica fundamental para este fator. A importância da hipusinação para a atividade de eIF5A no processo de tradução foi mostrada a partir da observação de que eIF5A humana recombinante, não hipusinada, foi incapaz de estimular a síntese *in vitro* de metionil-puromicina. Entretanto, quando este precursor foi modificado *in vitro* para a forma hipusinada, a proteína resultante tornou-se ativa neste ensaio (Park, 1989; Smit-Mcbride *et al.*, 1989).

Além da hipusinação, eIF5A também sofre acetilação, mas o papel desta modificação ainda não é totalmente conhecido. Em células HEK 293T foi observado que a supressão de PCAF (coativador transcricional associado à p53) reduziu significativamente a acetilação de eIF5A, sugerindo que a PCAF é uma importante acetiltransferase de eIF5A. Além disso, as mesmas células foram tratadas com inibidores de histonas deacetilase (HDACs) para identificar quais estavam envolvidas com a desacetilação de eIF5A, o que apontou HDAC6 e SIRT2 (sirtuina deacetilase 2) como suas principais desacetilases (Ishfaq *et al.*, 2012). Em outro estudo, que investigou o efeito da modificação da hipusina e acetilação na localização subcelular da proteína constatou que eIF5A exógeno superexpresso é pobremente modificado por DHS e DOHH endógenos (Lee *et al.*, 2009).

A inibição das desacetilases de eIF5A ou a hipusinação prejudicada gera o aumento da acetilação de EIF5A, ocasionando seu acúmulo no núcleo. Como eIF5A é constitutivamente hipusinado em condições fisiológicas, foi demonstrado que a acetilação reversível desempenha um papel importante no controle de sua localização subcelular (Ishfaq *et al.*, 2012). Outro estudo, realizado em células HeLa demonstrou, por meio de técnicas de fluorescência, que a forma não hipusinada de GFP-eIF5A está localizada principalmente no núcleo, enquanto que a forma hipusinada localiza-se preferencialmente no citoplasma, sugerindo que a hipusinação determina a distribuição subcelular de eIF5A (Lee *et al.*, 2009).

As estruturas tridimensionais de homólogos de eIF5A de três espécies de arqueas (Kim *et al.*, 1998; Peat *et al.*, 1998; Yao *et al.*, 2003), de dois protozoários (1XTD e 1X6O), de *S. cerevisiae* (3ER0) e de humanos (3CPF) foram determinadas e revelaram várias características comuns. eIF5A apresenta dois domínios predominantemente compostos por folhas beta. A comparação destes domínios com outras proteínas de estruturas tridimensionais conhecidas revela que o domínio N-terminal, o qual contém a hipusina, possui um dobramento classificado como *translation protein SH3-like motif*, o qual também está presente em algumas proteínas ribossomais. O domínio C-terminal, por sua vez, é similar ao dobramento presente em proteínas que se ligam a ácidos nucleicos de fita simples (*single-stranded oligonucleotide binding fold*), e desempenham diferentes funções celulares (Gough *et al.*, 2001). De fato, dois estudos tentam correlacionar a função de eIF5A com a ligação a mRNAs, porém estes ainda necessitam ser ampliados para se estabelecer um papel de eIF5A na interação física direta com mRNAs (Xu e Chen, 2001; Xu *et al.*, 2004).

eIF5A foi inicialmente considerado um fator de início da tradução em eucariotos por estimular a síntese *in vitro* de metionil-puromicina (Benne e Hershey, 1978). Apesar disso, a supressão de EIF5A na reação não alterou o padrão de síntese de globina *in vitro*, divergindo, assim, de resultados obtidos na ausência dos outros fatores de início de tradução também avaliados: eIF1, eIF1A, eIF3, eIF5B e eIF5 (Benne e Hershey, 1978). Assim, apesar de EIF5A ter sido denominado inicialmente um fator de início de tradução, a sua função como tal não foi claramente demonstrada.

Para investigar se eIF5A está realmente envolvido na síntese de proteínas *in vivo*, os efeitos na síntese proteica de células de *S. cerevisiae* depletadas de eIF5A foram analisados. Para isso, o gene codificador de eIF5A de leveduras (*TIF51A*) foi clonado em um sistema de expressão condicional utilizando o promotor *GAL* em combinação com elementos desestabilizadores de proteína. Quando a expressão do gene *TIF51A* foi inibida, pela transferência da cultura para meio contendo glicose, as proteínas de fusão pré-existentes contendo os elementos desestabilizadores foram eliminadas durante a primeira geração. A análise de perfil polissomal e taxa de síntese proteica, durante a depleção rápida de eIF5A, revelaram que as células conseguem manter a síntese proteica geral numa taxa de 70% (Kang e Hershey, 1994). Esses resultados são indicativos de que o EIF5A não está envolvido com a

síntese proteica geral e, dessa forma, passou a não ser considerado um fator geral de início de tradução geral. Entretanto, como a síntese proteica diminuiu em torno de 30% nas células depletadas de eIF5A, foi proposto seu envolvimento na tradução de um subgrupo de mRNAs (Kang and Hershey 1994). Outros estudos que demonstraram a associação de eIF5A com ribossomos ativamente engajados na tradução fortalecem o envolvimento desta proteína na síntese proteica (Jao e Chen, 2006).

Ensaio de co-purificação seguidos de identificação por espectrometria de massas revelaram que eIF5A interage com as proteínas ribossômicas P0, S5 e L11 e com eEF2, componentes da maquinaria de tradução (Zanelli *et al.*, 2006). Além disso, defeitos observados em mutantes sensíveis a temperatura, quando cultivados na temperatura não permissiva, sugerem um papel para eIF5A na elongação da tradução por apresentarem defeitos claros na síntese de proteínas (Dias *et al.*, 2008) e um aumento nas frações polissômicas, em relação às frações de 80S (Gregio *et al.*, 2009; Saini *et al.*, 2009), semelhante ao que ocorre para um mutante dominante negativo de eEF2 (Gregio *et al.*, 2009). Nestes estudos foi ainda verificado que os mesmos mutantes apresentam um atraso significativo no tempo de trânsito ribossômico. Adicionalmente, mutantes de eIF5A não apresentaram formação de *P-bodies* (agregados de mRNA e proteínas, onde também ocorre a degradação do mRNA) na temperatura não permissiva, característica semelhante à observada para células tratadas com ciclo-heximida, um inibidor da elongação da tradução. Este efeito sobre os *P-bodies* também é consistente com a função de eIF5A na fase de elongação de tradução (Gregio *et al.*, 2009). Além desses resultados, um mutante condicional de eIF5A teve seus defeitos de crescimento, síntese proteica e perfil polissômico suprimidos pelo aumento da expressão de eEF2, revelando uma relação funcional próxima entre estes fatores (Dias *et al.*, 2012).

Em 2013 foi demonstrado que eIF5A atua na tradução de sequências ricas em poliprolina (Doerfel *et al.*, 2013; Gutierrez *et al.*, 2013). Isto se deve ao fato de eIF5A ser capaz de causar um alívio da estagnação ribossômica que ocorre durante a tradução de sequências PPG ou PPP. O mesmo fato foi observado em seu ortólogo bacteriano, o fator de elongação P (EF-P), que também promove a formação da ligação peptídica e estabiliza o RNA transportador (tRNA) presente no centro catalítico do ribossomo (Doerfel e Rodnina, 2013; Doerfel *et al.*, 2013).

Atualmente, eIF5A é mostrado estar envolvido na etapa de iniciação da tradução, além de participar nos processos de elongação e término da tradução (Schuller *et al.*, 2017), além de ser correlacionada com diferentes processos celulares, tais como: diferenciação e proliferação celular (Kang e Hershey, 1994; Park *et al.*, 1997; Luchessi *et al.*, 2009; Parreiras-E-Silva *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2019), e decaimento de mRNAs (Zuk e Jacobson, 1998; Hoque *et al.*, 2017). O eIF5A também foi correlacionado com diferentes processos fisiológicos, inflamação (De Almeida *et al.*, 2014), progressão do diabetes (Imam *et al.*, 2014; Imam *et al.*, 2019), tumorigênese e metástase (Rigger *et al.*; Memin *et al.*, 2014; Fujimura *et al.*, 2015; Mathews e Hershey, 2015; Wang *et al.*, 2019), além de ter sido envolvido com o trânsito de macromoléculas pelo complexo do poro nuclear (NPC), destacando-se sua participação como cofator da proteína REV do vírus HIV-1 (Ruhl *et al.*, 1993; Shi *et al.*, 1996; Shi *et al.*, 1997; Schatz *et al.*, 1998; Rosorius *et al.*, 1999; Lipowsky *et al.*, 2000; Hofmann *et al.*, 2001). Também foi demonstrada a atividade antirretroviral de fármacos que induzem a apoptose preferencial de células infectadas por HIV-1, através da inibição da reação de hidroxilação associada ao processo de hipusinação de eIF5A (Hanauske-Abel *et al.*, 2013). Além disso, sugere-se que a inibição da hipusinação e redução do conteúdo de poliaminas pode ser utilizado como terapia antiviral contra HIV-1, ebola (EBOV) e flavovírus (Olsen e Connor, 2017; Olsen *et al.*, 2018).

O estudo de eIF5A em mamíferos vem sendo estudado pelo grupo do Dr. Augusto Luchessi. Inicialmente foi demonstrado que a inibição da hipusinação afeta o crescimento tumoral em camundongos (Jasiulionis *et al.*, 2007). Experimentos utilizando encéfalos de ratos revelaram associação de eIF5A com o processo de tradução dendrítica, desenvolvimento e envelhecimento encefálico (Luchessi *et al.*, 2008). A seguir, foi demonstrado que eIF5A é essencial no processo de diferenciação de células-tronco presentes na musculatura esquelética de ratos e que participa do processo de embriogênese de camundongos (Luchessi *et al.*, 2009; Parreiras-E-Silva *et al.*, 2010).

Desde sua descoberta, os trabalhos envolvendo eIF5A1 focam no estudo da isoforma B sendo sua função atribuída ao fato de ser hipusinada. Todavia, validamos que a variante A de EIF5A1 apresenta um códon alternativo estando associado à produção de isoforma proteica alternativa (isoforma A), a qual poderia apresentar funções ainda não caracterizadas.

6 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados aqui mostram que um códon de iniciação alternativo é utilizado para produzir a isoforma A de eIF5A1, caracterizada por possuir 30 resíduos de aminoácidos adicionais na extremidade N-terminal. Os resultados também indicam que a variante A está envolvida com a produção de ambas as isoformas, diferentemente do que registrado na base de dados do NCBI. Apesar disso, foi demonstrado que as células HeLa expressam a isoforma A, porém o requerimento da isoforma B é superior. Ainda, a isoforma A também é passível de hipusinação, indicando que sua atividade poderia ser regulada pelo processo de hipusinação. Análises de co-purificação e *in silico* fundamentaram a hipótese desta isoforma estar envolvida em atividades mitocondriais, revelando que o uso dos códons de iniciação alternativos de EIF5A1, poderia representar uma estratégia interessante para sincronizar o metabolismo citosólico e mitocondrial em função de sua atividade.

Ademais, é mostrado que a isoforma A participa do *shift* metabólico e que sua supressão é capaz de impactar na viabilidade celular. Notadamente, a respiração mitocondrial foi fortemente estimulada após a supressão da isoforma A. Adicionalmente, a geração mitocondrial de espécies reativas de oxigênio foi também aumentada nessas células. As análises de microscopia eletrônica de transmissão mostraram que a depleção da isoforma A leva a um aumento do número de cristas mitocondriais, além de aumentar a fissão mitocondrial, demonstrando que provavelmente a supressão da isoforma A leva ao comprometimento do metabolismo oxidativo mitocondrial levando as células à apoptose.

Finalmente, é possível constatar que há um número relevante de dados experimentais anteriores envolvendo EIF5A1 humana, sem considerar a isoforma A, assim, os resultados apresentados neste trabalho mostram pela primeira vez a importância da isoforma A no metabolismo energético, o que torna de extrema relevância os dados obtidos aqui, mostrando a importância de novos estudos acerca dessa isoforma.

REFERÊNCIAS

BENNE, R.; HERSHEY, J. W. The mechanism of action of protein synthesis initiation factors from rabbit reticulocytes. *J Biol Chem*, v. 253, n. 9, p. 3078-87, May 10 1978. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258.

BRAND, M. D. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp Gerontol*, v. 45, n. 7-8, p. 466-72, Aug 2010. ISSN 0531-5565.

CHEN, K. Y.; LIU, A. Y. Biochemistry and function of hypusine formation on eukaryotic initiation factor 5A. *Biol Signals*, v. 6, n. 3, p. 105-9, 1997 May-Jun 1997. ISSN 1016-0922. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9285092> >.

COOPER, H. L. et al. Identification of the hypusine-containing protein hy⁺ as translation initiation factor eIF-4D. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 80, n. 7, p. 1854-7, Apr 1983. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6403941> >.

DE ALMEIDA, O. P., JR. 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*, v. 20, n. 2, p. 284-92, 2014. ISSN 1381-6128.

DIAS, C. A. et al. 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*, v. 275, n. 8, p. 1874-88, Apr 2008. ISSN 1742-464X (Print) 1742-464x.

DIAS, C. A. et al. eIF5A interacts functionally with eEF2. *Amino Acids*, v. 42, n. 2-3, p. 697-702, Feb 2012. ISSN 0939-4451.

DOERFEL, L. K.; RODNINA, M. V. Elongation factor P: Function and effects on bacterial fitness. *Biopolymers*, v. 99, n. 11, p. 837-45, Nov 2013. ISSN 0006-3525.

DOERFEL, L. K. et al. EF-P is essential for rapid synthesis of proteins containing consecutive proline residues. *Science*, v. 339, n. 6115, p. 85-8, Jan 4 2013. ISSN 0036-8075.

FUJIMURA, K. et al. Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A (EIF5A) Regulates Pancreatic Cancer Metastasis by Modulating RhoA and Rho-associated Kinase (ROCK) Protein Expression Levels. *J Biol Chem*, v. 290, n. 50, p. 29907-19, Dec 11 2015. ISSN 0021-9258.

GOUGH, J. et al. Assignment of homology to genome sequences using a library of hidden Markov models that represent all proteins of known structure. *J Mol Biol*, v. 313, n. 4, p. 903-19, Nov 2 2001. ISSN 0022-2836 (Print) 0022-2836.

GREGIO, A. P. et al. eIF5A has a function in the elongation step of translation in yeast. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 380, n. 4, p. 785-90, Mar 20 2009. ISSN 0006-291x.

GUTIERREZ, E. et al. eIF5A promotes translation of polyproline motifs. *Mol Cell*, v. 51, n. 1, p. 35-45, Jul 11 2013. ISSN 1097-4164 (Electronic) 1097-2765 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23727016> >.

HAGENBUCHNER, J. et al. FOXO3-induced reactive oxygen species are regulated by BCL2L11 (Bim) and SESN3. *J Cell Sci*, v. 125, n. Pt 5, p. 1191-203, Mar 1 2012. ISSN 0021-9533.

HANAUSKE-ABEL, H. M. et al. Drug-induced reactivation of apoptosis abrogates HIV-1 infection. *PLoS One*, v. 8, n. 9, p. e74414, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24086341> >.

HANAUSKE-ABEL, H. M. et al. Detection of a sub-set of polysomal mRNAs associated with modulation of hypusine formation at the G1-S boundary. Proposal of a role for eIF-5A in onset of DNA replication. *FEBS Lett*, v. 366, n. 2-3, p. 92-8, Jun 12 1995. ISSN 0014-5793 (Print) 0014-5793.

HOFMANN, W. et al. Cofactor requirements for nuclear export of Rev response element (RRE)- and constitutive transport element (CTE)-containing retroviral RNAs. An unexpected role for actin. *J Cell Biol*, v. 152, n. 5, p. 895-910, Mar 5 2001. ISSN 0021-9525 (Print) 0021-9525.

HOQUE, M. et al. Regulation of gene expression by translation factor eIF5A: Hypusine-modified eIF5A enhances nonsense-mediated mRNA decay in human cells. *Translation (Austin)*, v. 5, n. 2, p. e1366294, 2017. ISSN 2169-074X (Print) 2169-0731.

IMAM, S.; MIRMIRA, R. G.; JAUME, J. C. Eukaryotic translation initiation factor 5A inhibition alters physiopathology and immune responses in a "humanized" transgenic mouse model of type 1 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 306, n. 7, p. E791-8, Apr 2014. ISSN 1522-1555. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24496311> >.

IMAM, S. et al. eIF5A inhibition influences T cell dynamics in the pancreatic microenvironment of the humanized mouse model of Type 1 Diabetes. v. 9, n. 1, p. 1533, Feb 7 2019. ISSN 2045-2322.

ISHFAQ, M. et al. Acetylation regulates subcellular localization of eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A). *FEBS Lett*, v. 586, n. 19, p. 3236-41, Sep 21 2012. ISSN 0014-5793.

JAO, D. L.; CHEN, K. Y. Tandem affinity purification revealed the hypusine-dependent binding of eukaryotic initiation factor 5A to the translating 80S ribosomal complex. *J Cell Biochem*, v. 97, n. 3, p. 583-98, Feb 15 2006. ISSN 0730-2312 (Print) 0730-2312 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16215987> >.

JASIULIONIS, M. G. et al. Inhibition of eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) hypusination impairs melanoma growth. *Cell Biochem Funct*, v. 25, n. 1, p. 109-14, Jan-Feb 2007. ISSN 0263-6484 (Print) 0263-6484 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16850525> >.

JENKINS, Z. A.; HAAG, P. G.; JOHANSSON, H. E. Human eIF5A2 on chromosome 3q25-q27 is a phylogenetically conserved vertebrate variant of eukaryotic translation initiation factor 5A with tissue-specific expression. *Genomics*, v. 71, n. 1, p. 101-9, Jan 1 2001. ISSN 0888-7543 (Print) 0888-7543.

KANG, H. A.; HERSHEY, J. W. Effect of initiation factor eIF-5A depletion on protein synthesis and proliferation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, v. 269, n. 6, p. 3934-40, Feb 11 1994. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258.

KEMPER, W. M.; BERRY, K. W.; MERRICK, W. C. Purification and properties of rabbit reticulocyte protein synthesis initiation factors M2Balpha and M2Bbeta. *J Biol Chem*, v. 251, n. 18, p. 5551-7, Sep 25 1976. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/965377> >.

KHAWAJA, N. R. et al. Patupilone-induced apoptosis is mediated by mitochondrial reactive oxygen species through Bim relocalization to mitochondria. *Mol Pharmacol*, v. 74, n. 4, p. 1072-83, Oct 2008. ISSN 0026-895x.

KIM, K. K. et al. Crystal structures of eukaryotic translation initiation factor 5A from *Methanococcus jannaschii* at 1.8 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 95, n. 18, p. 10419-24, Sep 1 1998. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424.

KLIER, H. et al. Determination and mutational analysis of the phosphorylation site in the hypusine-containing protein Hyp2p. *FEBS Lett*, v. 334, n. 3, p. 360-4, Nov 22 1993. ISSN 0014-5793 (Print) 0014-5793 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8243648> >.

KOZAK, M. How do eucaryotic ribosomes select initiation regions in messenger RNA? *Cell*, v. 15, n. 4, p. 1109-23, Dec 1978. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674.

LEE, S. B. et al. The effect of hypusine modification on the intracellular localization of eIF5A. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 383, n. 4, p. 497-502, Jun 12 2009. ISSN 0006-291x.

LIPOWSKY, G. et al. Exportin 4: a mediator of a novel nuclear export pathway in higher eukaryotes. *EMBO J*, v. 19, n. 16, p. 4362-71, Aug 15 2000. ISSN 0261-4189 (Print) 0261-4189 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10944119> >.

LUCHESSI, A. D. et al. Insights on eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) in the brain and aging. *Brain Res*, v. 1228, p. 6-13, Sep 4 2008. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993.

LUCHESSI, A. D. et al. Involvement of eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) in skeletal muscle stem cell differentiation. *J Cell Physiol*, v. 218, n. 3, p. 480-9, Mar 2009. ISSN 1097-4652 (Electronic) 0021-9541 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19006180> >.

MANDAL, A.; MANDAL, S.; PARK, M. H. Genome-wide analyses and functional classification of proline repeat-rich proteins: potential role of eIF5A in eukaryotic evolution. *PLoS One*, v. 9, n. 11, p. e111800, 2014. ISSN 1932-6203.

MATHEWS, M. B.; HERSHEY, J. W. The translation factor eIF5A and human cancer. *Biochim Biophys Acta*, v. 1849, n. 7, p. 836-44, Jul 2015. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002.

MELIS, N. et al. Targeting eIF5A Hypusination Prevents Anoxic Cell Death through Mitochondrial Silencing and Improves Kidney Transplant Outcome. *J Am Soc Nephrol*, v. 28, n. 3, p. 811-822, Mar 2017. ISSN 1046-6673.

MEMIN, E. et al. Blocking eIF5A modification in cervical cancer cells alters the expression of cancer-related genes and suppresses cell proliferation. *Cancer Res*, v. 74, n. 2, p. 552-62, Jan 15 2014. ISSN 0008-5472.

MISHRA, P.; CHAN, D. C. Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *J Cell Biol*, v. 212, n. 4, p. 379-87, Feb 15 2016. ISSN 0021-9525.

MITRA, K. et al. A hyperfused mitochondrial state achieved at G1-S regulates cyclin E buildup and entry into S phase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 106, n. 29, p. 11960-5, Jul 21 2009. ISSN 0027-8424.

MIYAKE, T. et al. XPO1/CRM1 Inhibition Causes Antitumor Effects by Mitochondrial Accumulation of eIF5A. *Clin Cancer Res*, v. 21, n. 14, p. 3286-97, Jul 15 2015. ISSN 1078-0432 (Print) 1078-0432.

MOULI, P. K.; TWIG, G.; SHIRIHAI, O. S. Frequency and selectivity of mitochondrial fusion are key to its quality maintenance function. *Biophys J*, v. 96, n. 9, p. 3509-18, May 6 2009. ISSN 0006-3495.

NOBLE, J. E.; BAILEY, M. J. Quantitation of protein. *Methods Enzymol*, v. 463, p. 73-95, 2009. ISSN 1557-7988. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19892168> >.

OLSEN, M. E.; CONNOR, J. H. Hypusination of eIF5A as a Target for Antiviral Therapy. *DNA Cell Biol*, v. 36, n. 3, p. 198-201, Mar 2017. ISSN 1044-5498.

OLSEN, M. E. et al. Differential Mechanisms for the Involvement of Polyamines and Hypusinated eIF5A in Ebola Virus Gene Expression. v. 92, n. 20, Oct 15 2018. ISSN 0022-538x.

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*, v. 264, n. 31, p. 18531-5, Nov 5 1989. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258.

PARK, M. H. The post-translational synthesis of a polyamine-derived amino acid, hypusine, in the eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A). *J Biochem*, v. 139, n. 2, p. 161-9, Feb 2006. ISSN 0021-924X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16452303> >.

PARK, M. H.; LEE, Y. B.; JOE, Y. A. Hypusine is essential for eukaryotic cell proliferation. *Biol Signals*, v. 6, n. 3, p. 115-23, May-Jun 1997. ISSN 1016-0922 (Print) 1016-0922 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9285094> >.

PARK, M. H. et al. Functional significance of eIF5A and its hypusine modification in eukaryotes. *Amino Acids*, v. 38, n. 2, p. 491-500, Feb 2010. ISSN 0939-4451.

PARK, M. H.; WOLFF, E. C.; FOLK, J. E. Hypusine: its post-translational formation in eukaryotic initiation factor 5A and its potential role in cellular regulation. *Biofactors*, v. 4, n.

2, p. 95-104, May 1993. ISSN 0951-6433 (Print) 0951-6433 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8347280> >.

PARREIRAS-E-SILVA, L. T. et al. Evidences of a role for eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) in mouse embryogenesis and cell differentiation. *J Cell Physiol*, v. 225, n. 2, p. 500-5, Nov 2010. ISSN 1097-4652 (Electronic) 0021-9541 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20458750> >.

PARREIRAS, E. S. L. T. et al. The N-terminal region of eukaryotic translation initiation factor 5A signals to nuclear localization of the protein. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 362, n. 2, p. 393-8, Oct 19 2007. ISSN 0006-291X (Print) 0006-291x.

PEAT, T. S. et al. Structure of translation initiation factor 5A from *Pyrobaculum aerophilum* at 1.75 Å resolution. *Structure*, v. 6, n. 9, p. 1207-14, Sep 15 1998. ISSN 0969-2126 (Print) 0969-2126.

PEREIRA, K. D. et al. Alternative Start Codon Connects eIF5A to Mitochondria. *J Cell Physiol*, v. 231, n. 12, p. 2682-9, Dec 2016. ISSN 0021-9541.

PULESTON, D. J. et al. Polyamines and eIF5A Hypusination Modulate Mitochondrial Respiration and Macrophage Activation. *Cell Metab*, v. 30, n. 2, p. 352-363.e8, Aug 6 2019. ISSN 1550-4131.

RIGGER, L. et al. *EMBO Rep*,

ROSORIOUS, O. et al. Nuclear pore localization and nucleocytoplasmic transport of eIF-5A: evidence for direct interaction with the export receptor CRM1. *J Cell Sci*, v. 112 (Pt 14), p. 2369-80, Jul 1999. ISSN 0021-9533 (Print) 0021-9533 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10381392> >.

ROSSI, D. et al. eIF5A and EF-P: two unique translation factors are now traveling the same road. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, v. 5, n. 2, p. 209-22, Mar-Apr 2014. ISSN 1757-7004.

RUHL, M. et al. Eukaryotic initiation factor 5A is a cellular target of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain mediating trans-activation. *J Cell Biol*, v. 123, n. 6 Pt 1, p. 1309-20, Dec 1993. ISSN 0021-9525 (Print) 0021-9525.

SAINI, P. et al. Hypusine-containing protein eIF5A promotes translation elongation. *Nature*, v. 459, n. 7243, p. 118-21, May 7 2009. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19424157> >.

SASAKI, K.; ABID, M. R.; MIYAZAKI, M. Deoxyhypusine synthase gene is essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, v. 384, n. 2, p. 151-4, Apr 1996. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8612813> >.

SCHATZ, O. et al. Interaction of the HIV-1 rev cofactor eukaryotic initiation factor 5A with ribosomal protein L5. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 95, n. 4, p. 1607-12, Feb 17 1998. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424.

SCHIEKE, S. M.; MCCOY, J. P., JR.; FINKEL, T. Coordination of mitochondrial bioenergetics with G1 phase cell cycle progression. *Cell Cycle*, v. 7, n. 12, p. 1782-7, Jun 15 2008. ISSN 1551-4005.

SCHNIER, J. et al. Translation initiation factor 5A and its hypusine modification are essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, v. 11, n. 6, p. 3105-14, Jun 1991. ISSN 0270-7306. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1903841> >.

SCHULLER, A. P. et al. eIF5A Functions Globally in Translation Elongation and Termination. *Mol Cell*, v. 66, n. 2, p. 194-205.e5, Apr 20 2017. ISSN 1097-2765.

SCHULZ, T. J. et al. Induction of oxidative metabolism by mitochondrial frataxin inhibits cancer growth: Otto Warburg revisited. *J Biol Chem*, v. 281, n. 2, p. 977-81, Jan 13 2006. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258.

SCHWELBERGER, H. G.; KANG, H. A.; HERSHEY, J. W. Translation initiation factor eIF-5A expressed from either of two yeast genes or from human cDNA. Functional identity under aerobic and anaerobic conditions. *J Biol Chem*, v. 268, n. 19, p. 14018-25, Jul 1993. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8314769> >.

SHI, X. P. et al. Effects of N1-guanyl-1,7-diaminoheptane, an inhibitor of deoxyhypusine synthase, on the growth of tumorigenic cell lines in culture. *Biochim Biophys Acta*, v. 1310, n. 1, p. 119-26, Jan 1996. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9244184> >.

SHI, X. P.; YIN, K. C.; WAXMAN, L. Effects of inhibitors of RNA and protein synthesis on the subcellular distribution of the eukaryotic translation initiation factor, eIF-5A, and the HIV-1 Rev protein. *Biol Signals*, v. 6, n. 3, p. 143-9, May-Jun 1997. ISSN 1016-0922 (Print) 1016-0922.

SMIT-MCBRIDE, Z. et al. Protein synthesis initiation factor eIF-4D. Functional comparison of native and unhyposinated forms of the protein. *J Biol Chem*, v. 264, n. 31, p. 18527-30, Nov 5 1989. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2509460> >.

SUN, Z. et al. Apoptosis induction by eIF5A1 involves activation of the intrinsic mitochondrial pathway. *J Cell Physiol*, v. 223, n. 3, p. 798-809, Jun 2010. ISSN 0021-9541.

TAN, X. et al. Doxorubicin induces apoptosis in H9c2 cardiomyocytes: role of overexpressed eukaryotic translation initiation factor 5A. *Biol Pharm Bull*, v. 33, n. 10, p. 1666-72, 2010. ISSN 0918-6158.

WANG, F. W.; GUAN, X. Y.; XIE, D. Roles of eukaryotic initiation factor 5A2 in human cancer. *Int J Biol Sci*, v. 9, n. 10, p. 1013-20, 2013. ISSN 1449-2288.

WANG, Z. et al. EIF5A regulates proliferation and chemoresistance in pancreatic cancer through the SHH signalling pathway. v. 23, n. 4, p. 2678-2688, Apr 2019. ISSN 1582-1838.

XU, A.; CHEN, K. Y. Hypusine is required for a sequence-specific interaction of eukaryotic initiation factor 5A with posttranslational modification of ligands by exponential enrichment RNA. *J Biol Chem*, v. 276, n. 4, p. 2555-61, Jan 26 2001. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258.

XU, A.; JAO, D. L.; CHEN, K. Y. Identification of mRNA that binds to eukaryotic initiation factor 5A by affinity co-purification and differential display. *Biochem J*, v. 384, n. Pt 3, p. 585-90, Dec 15 2004. ISSN 0264-6021.

YAO, M. et al. Crystal structure of hyperthermophilic archaeal initiation factor 5A: a homologue of eukaryotic initiation factor 5A (eIF-5A). *J Biochem*, v. 133, n. 1, p. 75-81, Jan 2003. ISSN 0021-924X (Print) 0021-924x.

YOULE, R. J.; VAN DER BLIEK, A. M. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science*, v. 337, n. 6098, p. 1062-5, Aug 31 2012. ISSN 0036-8075.

ZANELLI, C. F. et al. eIF5A binds to translational machinery components and affects translation in yeast. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 348, n. 4, p. 1358-66, Oct 6 2006. ISSN 0006-291X (Print) 0006-291X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16914118> >.

ZUK, D.; JACOBSON, A. A single amino acid substitution in yeast eIF-5A results in mRNA stabilization. *EMBO J*, v. 17, n. 10, p. 2914-25, May 15 1998. ISSN 0261-4189 (Print)

0261-4189 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9582285> >.