Eleonora Rodrigues Alves Ribeiro

Estudo da especificidade e toxicidade do inibidor de hipusinação GC7 utilizando o modelo de *Saccharomyces cerevisiae*

Araraquara

2014

Eleonora Rodrigues Alves Ribeiro

Estudo da especificidade e toxicidade do inibidor de hipusinação GC7 utilizando o modelo de *Saccharomyces cerevisiae*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do grau de Farmacêutica-Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli

Co-orientador: Fábio Carrilho Galvão

Araraquara

2014

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe que esteve sempre presente me incentivando e me dando todo suporte necessário. Meu exemplo de ser humano e de mulher, uma amiga de longa data!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família! Aos meu queridos irmãos Tela, Ziza e Xande e meus queridos pais, Gizela e José Alexandre pela paciência, o apoio, a compreensão e as alegrias. Pai e Mãe, obrigada por serem quem são, pois nos erros e nos acertos estiveram sempre comigo e sem vocês nada disso seria possível! Agradeço também aos meus queridos avós Lília e José Ramon, Maria Rita e José Brasil que construíram duas famílias com muito amor. Seus exemplos serviram para filhos, netos e para muitos que tiveram a oportunidade de conviver com vocês. Obrigada pelo suporte, pois são nos momentos de união proporcionados por vocês que me apoio hoje e sempre!

Agradeço aos professores Dr. Cleslei Fernando Zanelli e Dr. Sandro Roberto Valentini pela oportunidade única e fundamental ao meu desenvolvimento acadêmico.

Agradeço aos amigos da turma 79 e 81. Com certeza vocês fizeram a diferença! Ana Carolina, olho para trás e vejo o quanto você se dedicou para essa amizade que tenho certeza que será para a vida toda. Alessandra, Raquel, Letícia, Evelin e Carolina, sem vocês não me divertiria tanto e não me sentiria tão à vontade nesta turma nova. Alfredo, obrigada pelas conversas, espero que tenha aprendido comigo tanto quanto eu aprendi com você!

Obrigada ao grupo BiomolVZ por terem me recebido e contribuído para que este trabalho se realizasse, em especial o Fabio pela orientação e pela amizade!

Agradeço à FAPESP pelo apoio institucional e financeiro.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO..... 12

2. OBJETIVO..... 19

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 19

3. MATERIAIS E MÉTODOS..... 20

3.1 MATERIAIS..... 20

3.2 MÉTODOS..... 24

3.2.1. Preparo e utilização dos meios de cultura contendo diferentes compostos..... 24

3.2.2. Teste de diluição seriada..... 24

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES 26

4.1. Determinação da concentração inibitória de GC7 através da utilização de diferentes linhagens mutantes de *S. cerevisiae*..... 26

4.2. Determinação da concentração inibitória de GC7..... 29

4.3. Efeito do GC7 em diferentes mutantes de eIF5A..... 31

4.4. Efeitos do GC7 em mutantes de TPOs (*Transport of POlyamines*)..... 34

5. CONCLUSÕES..... 35

6. REFERÊNCIAS..... 36

RESUMO

O provável fator de início de tradução eIF5A é uma proteína altamente conservada de arqueas a mamíferos e essencial para a viabilidade celular. Esta proteína é a única conhecida que contém o resíduo do aminoácido incomum hipusina (hidroxiputrescina-lisina), formado através de uma modificação pós-traducional de um resíduo específico de lisina. Esta modificação, conhecida como hipusinação, ocorre através de uma reação dependente da poliamina espermidina em duas etapas. Inicialmente, a enzima desoxi-hipusina sintase (Dys1) catalisa a transferência do grupo aminobutil de uma poliamina espermidina para o grupo amino de um resíduo específico de lisina (K51 em *Saccharomyces cerevisiae*). Na segunda etapa ocorre uma reação de hidroxilação catalisada pela enzima desoxi-hipusina hidroxilase (Lia1), gerando eIF5A hipusinada. A primeira etapa desta modificação é essencial desde arqueas a mamíferos, enquanto que segunda etapa de hidroxilação é essencial apenas em eucariotos superiores. Curiosamente, um análogo estrutural da poliamina espermidina, conhecido como GC7 (N1-guanil-1,7-diamino-heptano), apresenta inibição do crescimento de diferentes linhagens de células eucarióticas e tumorais. Ainda, foi comprovada a atividade de inibição da hipusinação, e consequentemente da maturação de eIF5A, *in vitro* e *in vivo* por GC7. No entanto, apesar de inibir a função de eIF5A, o GC7 interfere com outros processos celulares, tais como, parada no início da tradução, ativação de respostas celulares de estresse, entre outras. Dessa forma, GC7 não possui especificidade e esta deve ser uma das razões para a toxicidade exibida por este composto. Portanto, como objetivo desse trabalho, seria de grande contribuição determinar os possíveis alvos de interação celular com o GC7 e assim, avaliar seu grau de especificidade à

hipusinação e as causas de sua toxicidade celular, utilizando diferente linhagens de *S. cerevisiae.*

Finalmente, após a determinação da concentração inibitória a ser utilizada e da confirmação da sensibilidade da família de transportadores ABC, foi possível confirmar a sensibilidade dos mutantes de eIF5A, enquanto que os TPOs não demonstraram resistência, em relação ao selvagem.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. **Esquema representativo da reação de hipusinação.....** 17

Figura 2. **Estrutura tridimensional de eIF5A e de EF-P.....** 18

Figura 3. **Determinação de linhagens sensíveis a diferentes compostos.....** 28

Figura 4. **Determinação da concentração de uso do GC7 utilizando mutantes da família ABC de transportadores.....** 30

Figura 5. **Avaliação do crescimento dos diferentes mutantes de eIF5A na presença de GC7.....** 32

Figura 6. **Avaliação da resistência ao GC7 dos TPOs em diferentes concentrações de GC7.....** 34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. **Linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas neste trabalho...** 20

Tabela 2. **Compostos utilizados neste trabalho.....** 23

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	micrograma
µL	microlitro
mL	mililitro
µM	micromolar
mM	milimolar
C-terminal	carboxi-terminal
N-terminal	amino-terminal
°C	graus Celsius
mRNA	RNA mensageiro
%	porcentagem
$D.O._{600nm}$	densidade óptica a 600nm
DTT	ditiotreitol
kDa	quilodalton
YPD	“yeast extract, peptone, dextrose” (meio rico para levedura)
eIF2	fator de início de tradução 2
eIF5A	fator de início de tradução 5A
eIF4	fator de início de tradução 4
4E-BP1	fator de início de tradução 4 binding proteins 1
Lys50	lisina 50
Lys51	lisina 51
K51	lisina 51
DHPS	desoxi-hipusina sintase em mamíferos
Dys1	desoxi-hipusina sintase em *S. cerevisiae*

DOHH	desoxi-hipusina hidroxilase em mamíferos
Lia1	desoxi-hipusina hidroxilase em *S. cerevisiae*
GC7	N1-guanil-1,7-diamino-heptano
EF-P	fator de elongação da tradução
G418	geneticina
SDS	dodecil sulfato de sódio
TIF51A	gene que codifica eIF5A em *S. cerevisiae*
TIF51B	gene que codifica eIF5A em *S. cerevisiae*
TPO	transport of polyamines
WT	wild type

1. INTRODUÇÃO

O provável fator de início de tradução de eucariotos 5A (eIF5A) é uma proteína altamente conservada ao longo da evolução, presente de arqueas a mamíferos, em especial uma região próxima ao resíduos alvo de uma modificação pós-traducional, Lys50 em mamíferos e Lys51 em *S. cerevisiae* (Schnier *et al.*, 1991; Chen e Liu, 1997). Esta modificação, denominada hipusinação devido à formação do aminoácido "hipusina" (hidroxiputrescina-lisina), utiliza a poliamina espermidina como fonte de um grupamento aminobutil, o qual é transferido para o grupo amino livre do resíduo específico de lisina em eIF5A (Schnier *et al.*, 1991; Chen e Liu, 1997). Esta primeira etapa da reação é catalisada pela enzima desoxi-hipusina sintase (DHPS em mamíferos e Dys1 em *S. cerevisiae*). Em seguida, em uma segunda etapa, não essencial em leveduras, eIF5A é hidroxilada pela enzima desoxi-hipusina hidroxilase (DOHH em mamíferos e Lia1 em *S. cerevisiae*) tornando-se ativa (Park, Wolff e Folk, 1993a; Park, Joe e Kang, 1998) (Figura 1). Além disso, a proteína humana substitui completamente a proteína de levedura, demonstrando que eIF5A não são conservadas apenas em sua sequência, mas também em sua função, apresentando 63% de identidade (Schnier *et al.*, 1991; Chen e Liu, 1997).

Identificado pela primeira vez em lisado de reticulócitos de coelho (BENNE e HERSHEY, 1978) o provável fator de início de tradução de eucariotos 5A possui aproximadamente 17 KDa e em *S. cerevisiae* é codificada por dois genes, *TIF51A* (*HYP2*) e *TIF51B* (*ANB1*), sendo *TIF51A* expresso em condições aeróbicas e *TIF51B* expresso em condições anaeróbicas (Schnier *et al.*, 1991; Kang,

Schwelberger e Hershey, 1993; Tome e Gerner, 1997). Ainda, foi demonstrado que este dois genes quando expressos apresentam funções intercambiáveis (Schwelberger, Kang e Hershey, 1993). Estruturalmente eIF5A apresenta dois domínios predominantemente compostos por folhas beta, e como mencionado anteriormente, apesar de eIF5A não estar presente em eubactérias, estas apresentam um homólogo estrutural, o provável fator de elongação da tradução EF-P, sendo os dois primeiros domínios de EF-P superponíveis à estrutura de eIF5A de arquea (Figura 2) (Hanawa-Suetsugu *et al.*, 2004).

Originalmente, a proteína eIF5A foi descrita como um fator de início de tradução de eucariotos devido a sua capacidade de estimular a síntese de metionil-puromicina *in vitro* (Benne e Hershey, 1978). Ainda, a depleção de eIF5A em *S. cerevisiae* apresentou uma redução de apenas 30% nos níveis de síntese protéica total, sugerindo não ser um fator essencial na síntese protéica de forma geral (Kang e Hershey, 1994; Zuk e Jacobson, 1998). Paralelamente, visto que sua depleção levava ao aumento no número de células paradas na fase G1 do ciclo celular (Kang e Hershey, 1994) foi proposto que eIF5A seria um fator envolvido na tradução de um grupo específico de mensageiros presentes na transição G1/S (Park, Wolff e Folk, 1993a; Park, Lee e Joe, 1997). Além disso, a formação de hipusina é intensificada em linfócitos estimulados por mitógenos e dificilmente detectada em G_0 aumentando as evidências de que este fator relaciona-se com a proliferação celular (COOPER, PARK e FOLK, 1982).

Embora a função de eIF5A como fator de início de tradução nunca ter sido claramente demonstrada, a comprovação recente de que eIF5A associa-se com ribossomos ativamente engajados na tradução e que mutantes condicionais de

eIF5A apresentam defeitos claros na síntese de proteínas, trouxeram eIF5A de volta ao cenário da tradução (Jao e Chen, 2006; Zanelli *et al.*, 2006; Dias *et al.*, 2008). Interessantemente, defeitos observados nos perfis polissomais de mutantes sensíveis à temperatura, sugeriram um papel para eIF5A na etapa da elongação da tradução ao invés do início (Zanelli *et al.*, 2006), o que recentemente foi confirmado com novos dados obtidos por nosso laboratório e por outro grupo (Gregio *et al.*, 2009; Saini *et al.*, 2009). Entretanto, o mecanismo crucial pelo qual eIF5A afeta a tradução e se este efeito ocorre na tradução global ou de um grupo específico de mRNAs são questões ainda em aberto.

É conhecido que ortólogos de eIF5A e da enzima desoxi-hipusina sintase estão presentes desde arqueas até mamíferos, porém arqueas parecem não possuir ortólogos para a enzima desoxi-hipusina hidroxilase. Enquanto isso, sob todas as condições já testadas até o momento o gene para desoxi-hipusina hidroxilase demonstrou não ser essencial ao crescimento em *S. cerevisiae* (Thompson, Cano e Valentini, 2003). Entretanto, o ortólogo da desoxi-hipusina hidroxilase de *Schizosaccharomyces pombe* demonstrou ser necessário para o crescimento em temperaturas acima de 37°C (Weir e Yaffe, 2004) assim como para o desenvolvimento tanto em *Drosophila melanogaster* como em *Caenorhabditis elegans* (Park *et al.*, 2010). Dessa forma, é possível especular que a primeira etapa da hipusinação é essencial em todas as espécies que possuem eIF5A, mas a segunda etapa parece se tornar mais importante funcionalmente ao longo da evolução. Além disso, eIF5A recombinante não hipusinada, não apresenta atividade no ensaio de síntese de metionil-puromicina, passando a apresentar atividade apenas após modificação *in vitro* pela desoxi-hipusina sintase (Park, 1989; Smit-

Mcbride *et al.*, 1989). Ainda, a substituição da lisina alvo da modificação pós-traducional em *S. cerevisiae,* (Gentz, Blatch e Dorrington), e, consequentemente não hipusinação de eIF5A impossibilita o crescimento celular quando esta é a única fonte na célula (Schnier *et al.*, 1991). Outro motivo pelo qual esta modificação pós-traducional demonstra ser essencial a célula é que a região flanqueadora do sítio de hipusinação, formada por uma sequência de doze aminoácidos, é extremamente conservada ao longo da evolução: STSKTG-HIPUSINA-HGHAK (Park, Wolff e Folk, 1993b; Magdolen *et al.*, 1994; Chen e Liu, 1997). Finalmente, o fato de eIF5A ser a única proteína eucariótica que sofre hipusinação reafirma a sua importância no metabolismo celular, bem como do processo de sua modificação.

Desta forma, as etapas da modificação pós-traducional de eIF5A, bem como as enzimas responsáveis por estas modificações são alvos de muitos estudos, pois representam uma estratégia muito importante na terapêutica e na elucidação da função biológica de eIF5A na célula. Nestes estudos, foram observados que inibidores da etapa de hidroxilação da desoxi-hipusina também causam a inibição da transição de G1/S no ciclo celular e o inibidor da desoxi-hipusina sintase GC7 (N1-guanil-1,7-diamino-heptano) impede o crescimento celular em culturas de células não transformadas e transformadas (Park, Lee e Joe, 1997). Ainda, foi observado que GC7 induz uma parada no início da tradução relacionada à fosforilação de eIF2 e eIF4E-binding proteins 1 (4E-BP1) (Landau *et al.*, 2010), bem como efeitos antiproliferativo em células de mamíferos, como linhagens de células tumorais (Park *et al.*, 1994a). Portanto, a inibição seletiva dessas enzimas representa uma estratégia importante para o estudo da hipusinação e da função biológica dessa modificação pós-traducional. Neste contexto, diferentes fatores se

tornam importantes para o estudo dos efeitos de GC7 na célula, como por exemplo, fatores relacionados à resistência celular a compostos, como é o caso da família ABC de transportadores transmembranicos, além de fatores responsáveis pelo transporte das poliaminas em leveduras, os TPOs (*Transport of POlyamines*), (Tomitori *et al.*, 1999; Rogers *et al.*, 2001). Por fim, foi observado que a depleção de múltiplos genes da família ABC (Rogers *et al.*, 2001) (*YOR1, SNQ2, PDR5, YCF1, PDR10, PDR11 e PDR15)* combinada a depleção de fatores de ativação de transcrição específicos (*PDR1* e *PDR3*) levam à um aumento significativo da sensibilidade de leveduras a diferentes compostos e se tornaram importantes fatores nos estudos de sensibilidade a novos compostos e/ou descoberta dos alvos (Rogers *et al.*, 2001). Dessa forma, o estudo da especificidade de GC7 a diferentes alvos celulares terá grande impacto na sua utilização terapêutica, bem como no entendimento da modificação pós-traducional de eIF5A.

.

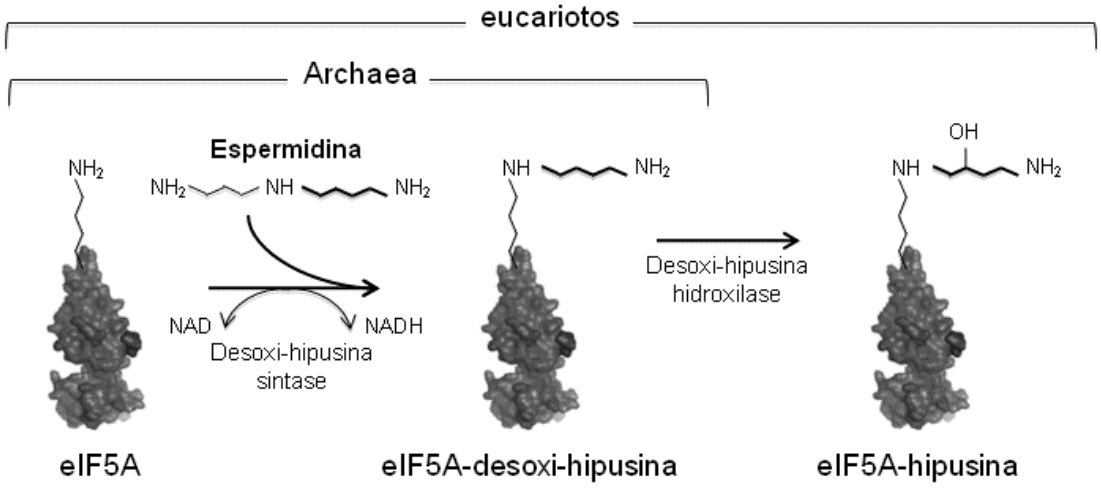

Figura1. Esquema representativo da reação de hipusinação. A porção 4-aminobutil da poliamina espermidina é transferida para o grupo amino livre do resíduo da lisina 51 em *S. cerevisiae* pela ação catalítica da enzima desoxi-hipusina sintase (Dys1). Em seguida, ocorre a hidroxilação da desoxi-hipusina pela desoxi-hipusina hidroxilase (Lia1) e formação de eIF5A ativa (Figura adaptada de Rossi *et al.*, 2014).

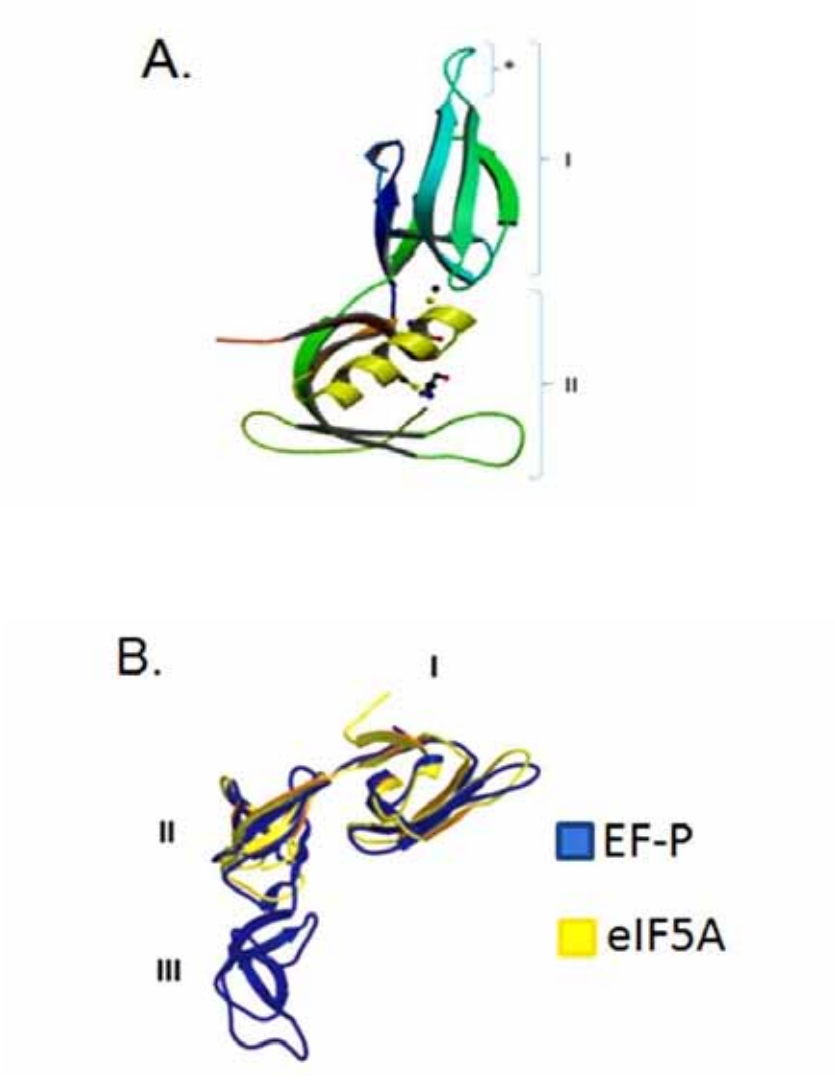

Figura 2. Estrutura tridimensional de eIF5A e de EF-P. (A) Estrutura cristalográfica de eIF5A de *Leishmania mexicana* (Protein Data Bank: 1XTD). I: Domínio N-terminal ("Translation protein SH3-like motif); *: alça de hipusinação e II: Domínio C-terminal ("Single-stranded oligonucleotide binding fold"). **(B)** Sobreposição dos dois primeiros domínios de EF-P na estrutura de eIF5A (Hanawa-Suetsugu *et al.*, 2004).

2. OBJETIVOS

Como descrito acima, o papel, bem como o mecanismo específico do GC7 ainda não estão totalmente descritos, apesar de sua comprovada atividade de inibição da desoxi-hipusina sintase (Dys1). Portanto, este estudo tem como objetivo descrever possíveis alvos de GC7 utilizando diferentes linhagens de *S. cerevisiae*.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o perfil de sensibilidade de diferentes linhagens de *S. cerevisiae* com diferentes compostos;
- Determinar a concentração inibitória do GC7;
- Testar os efeitos do GC7 em diferentes mutantes de eIF5A;
- Testar o efeito do GC7 utilizando diferentes linhagens da coleção de nocautes

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

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

Linhagens	Outros Nomes	Genótipo	Origem
SVL1229	Δ pdr5	*MATa ura3 his3 leu2 met15 pdr5::kanMX4*	Coleção do laboratório
SVL1226	Δyor1	*MATa ura3 his3 leu2 met15 yor1::kanMX4*	Coleção do laboratório
SVL1225	Δsnq2	*MATa ura3 his3 leu2 met15 snq2::kanMX4*	Coleção do laboratório
SVL1232	Δ pdr15	*MATa ura3 his3 leu2 met15 pdr15::kanMX4*	Coleção do laboratório
SVL1231	Δ pdr11	*MATa ura3 his3 leu2 met15 pdr11::kanMX4*	Coleção do laboratório
SVL1228	Δpdr3	*MATa ura3 his3 leu2 met15 pdr3::kanMX4*	Coleção do laboratório
SVL1227	Δycf1	*MATa ura3 his3 leu2 met15 ycf1::kanMX4*	Coleção do laboratório
SVL1230	Δ pdr10	*MATa ura3 his3 leu2 met15 pdr10::kanMX4*	Coleção do laboratório
SVL272	acy402	*MATa his3 Δ1 leu 2 Δ0 met15 Δ0 ura3 Δ0*	Anita Corbett
SVL1295	US-50	*MATα pdr1-3 ura3 his1*	Rogers et al., 2001
SVL1293	AD1-7	*MATα Δyor1::hisG Δsnq2::hisG pdr5- Δ 2::hisG Δ pdr10::hisG Δpdr11::hisG Δycf1::hisG pdr3-Δ2::hisG*	Rogers et al., 2001
SVL1294	AD1-9	*MATα Δyor1::hisG Δsnq2::hisG Pdr5- Δ 2::hisG Δ pdr10::hisG Δpdr11::hisG Δycf1::hisG pdr3 Δ2::hisG Δ pdr15::hisG pdr1-Δ3::hisG*	Rogers et al., 2001
SVL725	*tif51A^{S149P}*	*MATα trp1 his3 leu2 ura3 tif51A::HIS3 [tif51A^{S149P}/LEU2/CEN]*	Coleção do laboratório

SVL529	*tif51A-3*	*MATa leu2-3 ade2 ade3 ura3 trp1 his3 tif51A::HIS3 [TIF51A-3/LEU2/CEN]*	Coleção do laboratório
SVL670	*TIF51A* (WT)	*MATα trp1 his3 leu2 ura3 tif51A::HIS3 [TIF51A/LEU2/CEN]*	Coleção do laboratório
SVL838	*TIF51A* (WT)	*MATα leu2 trp1 ura3 his3 tif51A::HIS3 tif51B::kanMX4 [TIF51A/TRP/CEN]*	Coleção do laboratório
SVL987	*tif51A^{K56A}*	*MATα leu2 trp1 ura3 his3 tif51A::HIS3 tif51B::kanMX4 [tif51A^{K56A}/TRP/CEN]*	Coleção do laboratório
SVL821	*tif51A$^{Q22H/L93F}$*	*MATα leu2 trp1 ura3 his3 tif51A::HIS3 tif51B::kanMX4 [tif51A$^{Q22H/L93F}$/TRP1/CEN]*	Coleção do laboratório
TPO1	Δtpo1	*MATa ura3 his3 leu2 met15 tpo1::kanMX4*	Coleção do laboratório
TPO2	Δtpo2	*MATa ura3 his3 leu2 met15 tpo2::kanMX4*	Coleção do laboratório
TPO3	Δtpo3	*MATa ura3 his3 leu2 met15 tpo3::kanMX4*	Coleção do laboratório
TPO4	Δtpo4	*MATa ura3 his3 leu2 met15 tpo4::kanMX4*	Coleção do laboratório
TPO5	Δtpo5	*MATa ura3 his3 leu2 met15 tpo5::kanMX4*	Coleção do laboratório
SVL530	*TIF51A* (WT)	*MATa leu2-3 ade2 ade3 ura3 trp1 his3 tif51A::HIS3 [TIF51A/LEU2/CEN]*	Coleção do laboratório
SVL82	psy626	*MATa trp1 leu2 ade2 his3 ura3 TIF51A*	Coleção do laboratório
SVL14	svy144	*MATa ade2 trp1 ura3 leu2 his3 tif51A-1*	Coleção do laboratório
SVL32	svy170	*MATa ade2 trp1 ura3 leu2 his3 can1-100 tif51A-3*	Coleção do laboratório
SVL1256	*TIF51A* (WT)	*MATα can1::STE2pr-sp his5 lyp1 his3 leu2 ura3 met15 TIF51A::natMX4*	Coleção do laboratório
SVL1257	*tif51A-1*	*MATα can1::STE2pr-sp his5 lyp1 his3 leu2 ura3 met15 tif51A-1::natMX4*	Coleção do laboratório
SVL1258	*tif51A-3*	*MATα can1::STE2pr-sp his5 lyp1 his3 leu2 ura3 met15 tif51A-*	Coleção do laboratório

		3::natMX4	
SVL1259	*tif51A*^{K56A}	*MAT*α *can1::STE2pr-sp his5 lyp1 his3 leu2 ura3 met15 tif51A*^{K56A}*::natMX4*	Coleção do laboratório
SVL1260	*tif51A*$^{Q22H/L93F}$	*MAT*α *can1::STE2pr-sp his5 lyp1 his3 leu2 ura3 met15 tif51A*$^{Q22H/L93F}$*::natMX4*	Coleção do laboratório

Tabela 2. Compostos utilizados neste trabalho.

Drogas	Concentração de Uso
Cicloheximida	0,05 µg/mL
Ditiotreitol (DTT)	32 mM
N1-guanil-1,7-diamino-heptano (GC7)	descrito nas figuras
Geneticina (G418)	200 µg/mL
Dodecil sulfato de Sódio (SDS)	0,05 %

3.2 MÉTODOS

A manutenção, o cultivo das linhagens de *S. cerevisiae*, a composição e o preparo dos meios de cultura e soluções e os protocolos das técnicas utilizados neste trabalho seguiram procedimentos padrão descritos nos manuais de laboratório: (Guthrie e Fink, 1991; Ausubel, 2004; Amberg, 2005).

3.2.1. Preparo e utilização dos meios de cultura contendo diferentes compostos

Os compostos descritos na tabela 2 foram preparados de acordo com o descrito pelo fabricante e adicionados ao meio de cultura após resfriamento. Aos meios de cultura contendo as diferentes concentrações de GC7 foi adicionado 1 mM de aminoguanidina. Este composto foi adicionado devido a sua atividade inibitória de amino oxidases, as quais são relacionadas à degradação do GC7 (Park *et al.*, 1994b).

3.2.2. Teste de diluição seriada

As linhagens utilizadas foram crescidas a 25ºC em 10 mL de meio seletivo até aproximadamente 1-2x10^7 células/mL ($D.O._{600nm}$= 0,6 a 0,9). Após centrifugação a e remoção do meio de cultura, as células serão suspensas na concentração de 2,5x10^8 células/mL. Em seguida, 200 µL da suspensão foram transferidas para um poço de microplaca e a suspensão diluída seriadamente (1:10) em meio líquido apropriado. Utilizando um micropipetador multicanal, 4 µL da suspensão original e das diluições foram aplicados nos meios de cultura de interesse. A seguir, as placas

foram incubadas nas temperaturas e condições adequadas até a observação de crescimento.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Determinação da concentração inibitória de GC7 através da utilização de diferentes linhagens mutantes de *S. cerevisiae.*

Anteriormente em nosso laboratório foram realizados ensaios de teste de sensibilidade ao GC7 utilizando o mutante condicional do gene que codifica Dys1, enzima responsável pela primeira e essencial etapa da hipusinação. Este mutante, denominado *dys1-1*, foi utilizado uma vez que apresenta redução nos níveis de Dys1 e consequente redução na hipusinação de eIF5A (Galvão *et al.*, 2013). Porém, não foi possível observar nenhuma atividade do GC7 nesta linhagem no que diz respeito a redução nos níveis de crescimento (dados não mostrados). Devido a isso, decidimos utilizar mutantes já descritos na literatura por apresentarem sensibilidade a diferentes composto. Especialmente, em *S. cerevisiae,* esses são conhecidos como pertencentes à família de transportadores ABC. Em um estudo, múltiplas deleções tanto de genes que expressem esses transportadores (Rogers *et al.*, 2001) (*YOR1, SNQ2, PDR5*, *YCF1,PDR10, PDR11 e PDR15)* como em genes dos fatores de ativação de transcrição dos mesmos *(PDR1* e *PDR3*) resultaram em linhagens mais sensíveis à múltiplos compostos (Rogers *et al.*, 2001). Desta forma, foram utilizadas linhagens nocautes de genes pertencentes à família ABC de transportadores nos testes com os diferentes compostos, descritos na tabela 2, a fim de definirmos as linhagens mais sensíveis, confirmando os dados já apresentados da literatura, para então iniciarmos os testes utilizando o GC7. Isso foi necessário, pois como mencionado anteriormente, não foi possível definirmos a concentração do GC7 a ser utilizado em ensaios realizado por nosso grupo (dados não mostrados).

Neste ensaio, pudemos observar que algumas das linhagens foram mais sensíveis aos compostos testados (Figura 3) e com isso iniciamos os primeiros testes com GC7 em *S. cerevisiae*. Como podemos observar na Figura 3, as linhagens *pdr15*, *AD1-9, yor1, pdr5, snq2 e US-50* foram as que se mostraram mais sensíveis à cicloheximida, um conhecido inibidor da síntese protéica em eucariotos que atua interferindo na atividade da peptidil transferase da subunidade 60S do ribossomo. Ainda, podemos observar que as linhagens AD1-9 e US-50 apresentaram maior sensibilidade ao DTT, o qual possui a característica de ser um potente redutor, capaz desestabilizar as condições de redução e oxidação, necessário para formação de pontes dissulfeto nas proteínas, causando um estresse no retículo endoplasmático (Ausubel). Já a linhagem AD1-9 foi a única que se mostrou sensível ao dodecil sulfato de sódio (SDS), um composto conhecido pelos seus efeitos desestabilizantes na membrana celular. Cabe ressaltar que a depleção isolada de *pdr1* ou *pdr3* (fatores de ativação de transcrição) conferem pouca sensibilidade aos mutantes se comparado a depleção de genes que expressem os transportadores transmembranicos (Rogers *et al.*, 2001), como pode ser observado na figura 3C. A determinação dessas linhagens mais sensíveis nos possibilitou definir a concentração de GC7 a ser utilizada nos demais testes.

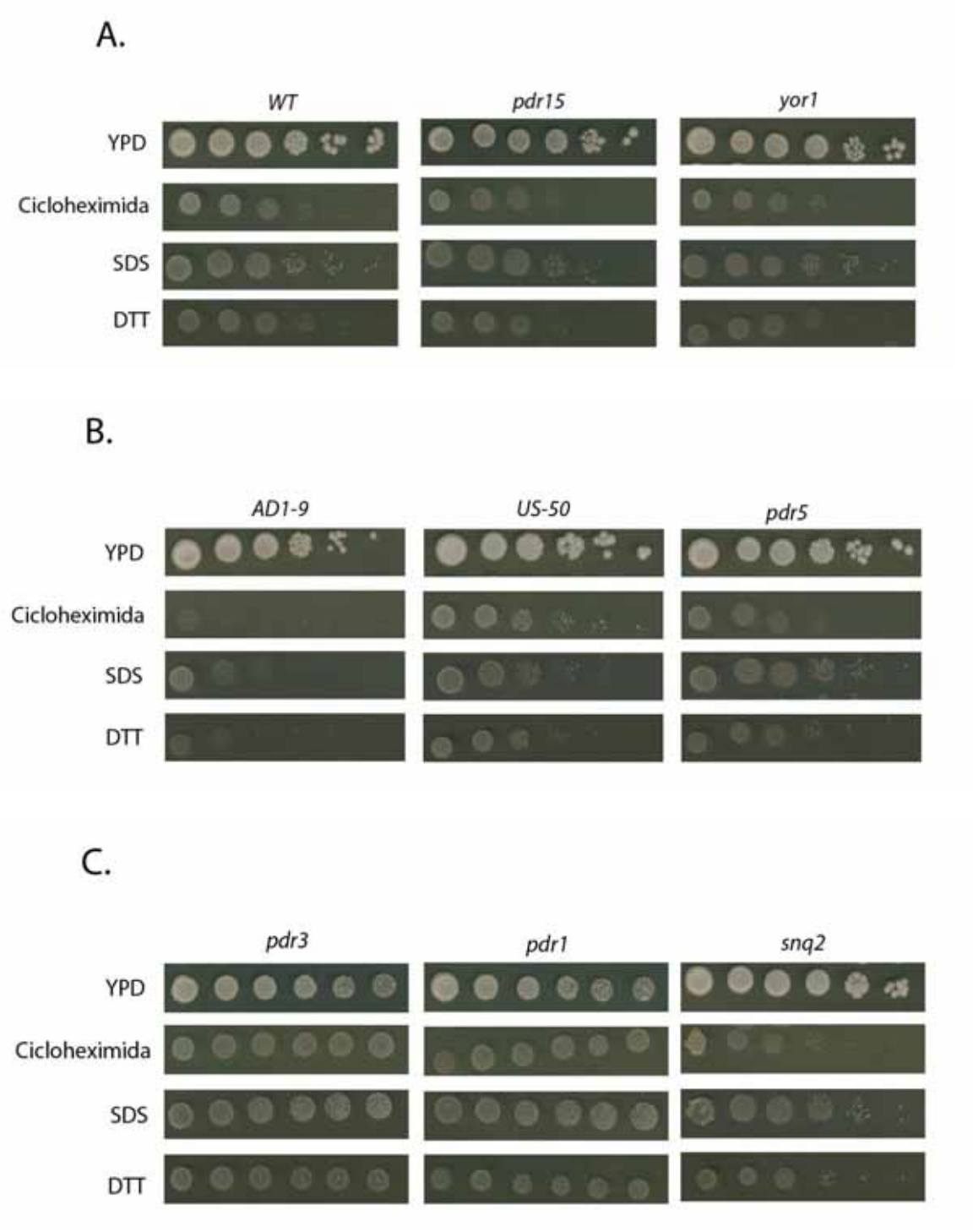

Figura 3. Determinação de linhagens sensíveis a diferentes compostos. As linhagens indicadas foram crescidas, diluídas seriadamente e plaqueadas em YPD (controle positivo) e em YPD na presença dos compostos descritos na figura, e incubadas à 25 °C por 3 dias.

4.2. Determinação da concentração inibitória de GC7.

Como mencionado anteriormente, devido à problemática encontrada em outro trabalho, fez-se necessário a utilização de linhagens sensíveis a diferentes compostos para definição da concentração inibitória do GC7. Dessa forma, as linhagens que se apresentaram sensíveis aos compostos testados anteriormente (Figura 3) foram utilizadas nos testes com o GC7. Como podemos observar na Figura 4, as linhagens AD 1-9 e US-50, as quais apresentam um maior número de deleções dos genes pertencentes a família ABC de transportadores foram as que se apresentaram mais sensíveis ao GC7. Ainda, podemos observar que o aumento das concentrações de GC7 para com os mutantes da família ABC de transportadores não afetaram de maneira significativa/gradativa o defeito de crescimento observado. Nestes ensaios, utilizamos a concentração de 50µM, 100µM e 300µM, onde já foi possível detectar um padrão de sensibilidade em relação ao controle positivo (YPD) e em relação a linhagem selvagem (Figura 4). Por fim, como descrito na literatura, a dupla deleção dos fatores de ativação de transcrição que regulam a resposta à drogas (*PDR1* e *PDR3*) geram linhagens mais sensíveis em mutantes da família ABC de transportadores, como observado para AD1-9 e US-50 (Rogers *et al.*, 2001). Dessa forma, foi possível definirmos a concentração de 300µM como a concentração de partida para os ensaios seguintes, uma vez que esta concentração afetou linhagens sensíveis sem nenhum efeito sobre a linhagem selvagem, além de descrevermos as linhagens AD1-9 e US-50 como mais sensíveis ao GC7, em comparação com as demais linhagens nocautes de genes pertencentes a família ABC de transportadores.

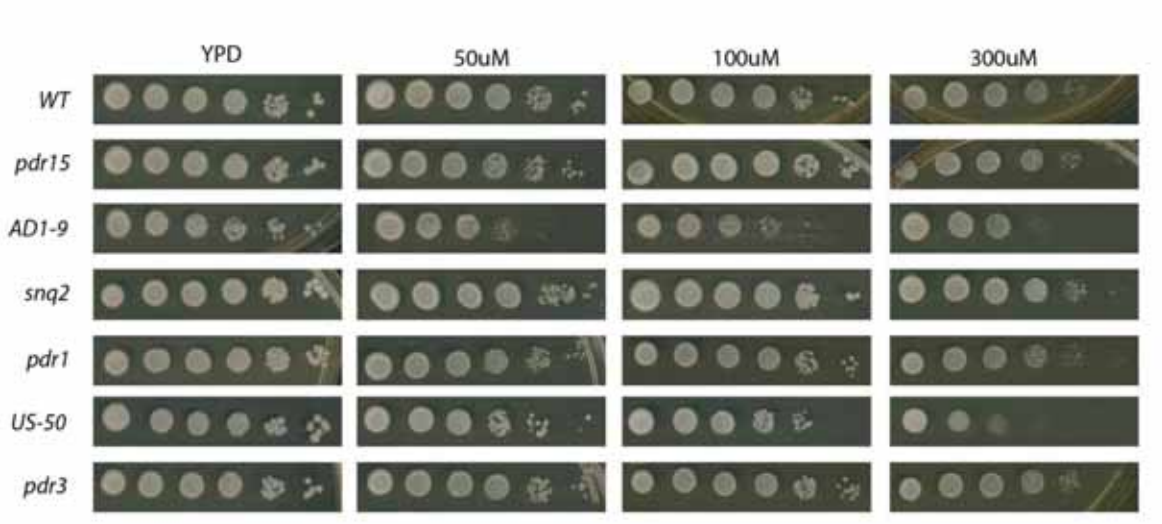

Figura 4. Determinação da concentração de uso do GC7 utilizando mutantes da família ABC de transportadores. As linhagens indicadas foram crescidas, diluídas seriadamente e plaqueadas em YPD (controle positivo) e em YPD na presença de diferentes concentrações do GC7,e incubadas à 25 °C por 3 dias.

4.3. Efeito do GC7 em diferentes mutantes de eIF5A.

O GC7 é um análogo estrutural da poliamina espermidina que inibe a enzima desoxi-hipusina sintase tanto em culturas de células transformadas quanto não transformadas (Park, Lee e Joe, 1997). Por isso, de acordo com os resultados anteriores utilizamos a concentração previamente definida de 300µM para os ensaios com os mutantes de eIF5A. Como mostra a Figura 5, foi possível observar que as linhagens mutantes de eIF5A apresentaram sensibilidade em relação às respectivas linhagens selvagens (WT). Curiosamente, o mutante *tif51A*^{K56A} foi o mutante que mais se mostrou sensível ao GC7. Isto era esperado e corrobora com o dado da literatura que mostra que este mutante apresenta diminuição nos níveis de hipusinação (Dias *et al.*, 2008). Para verificar se esta concentração seria a ideal para estes mutantes, outras concentrações foram testadas, porém foi possível observar que estas não demonstraram um defeito significativamente superior à concentração de 300µM, e por isso não acreditamos ser viável a manutenção de ensaios com concentrações tão elevadas (dados não mostrados). Dessa forma, o resultado obtido pode ser considerado satisfatório visto que quando na presença do GC7 os diferentes mutantes de eIF5A apresentaram diminuição no crescimento celular possivelmente devido ao defeito na modificação pós-traducional deste fator corroborando com os dados referentes a essencialidade desta modificação e permitindo a utilização do tratamento com GC7 nos estudos da função desempenhada por eIF5A na célula.

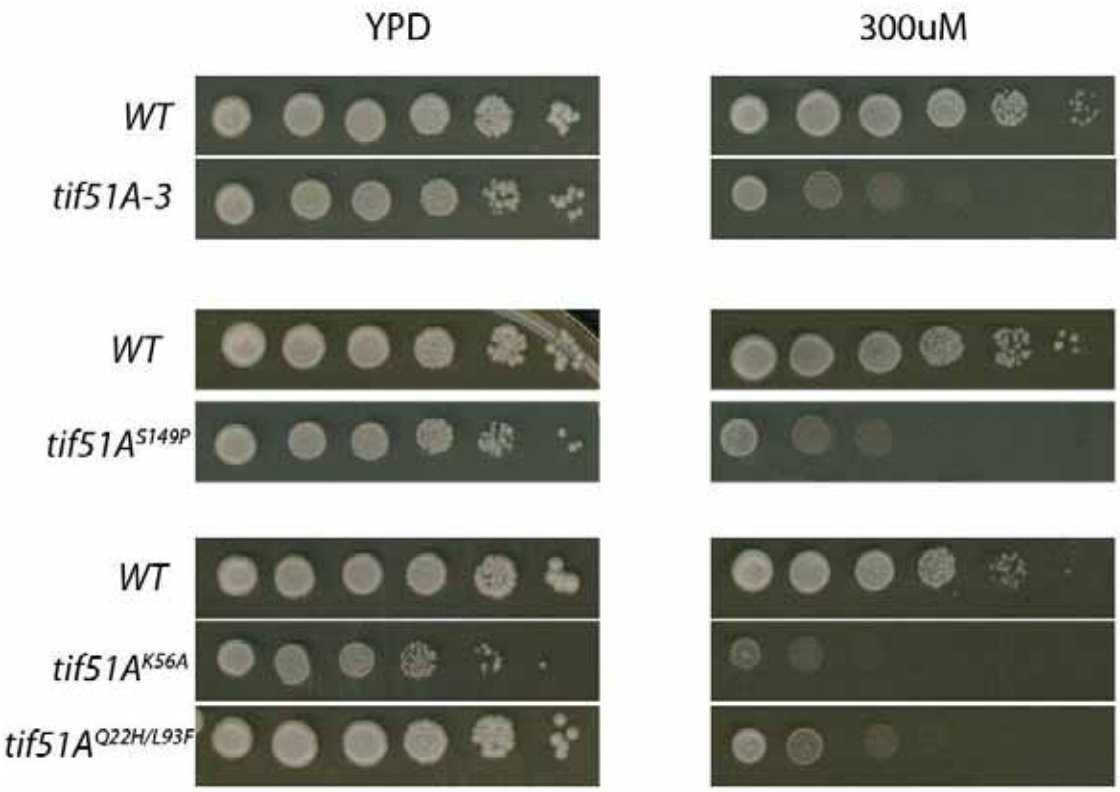

Figura 5. Avaliação do crescimento dos diferentes mutantes de eIF5A na presença de GC7. Os diferentes mutantes de eIF5A, indicados na figura, foram crescidos, diluídos seriadamente e plaqueados em YPD (controle positivo) e em YPD na presença de 300 µM do GC7, e incubadas à 25 °C por 3 dias.

4.4. Efeitos do GC7 em mutantes de TPOs (*Transport of POlyamines*).

Seguindo a linha de pensamento dos transportadores transmembranicos, achamos interessante incluir uma nova classe destas proteínas, as TPOs, visto que estas já foram relacionadas ao transporte de poliaminas pela membrana de leveduras e podem ser as responsáveis pelo transporte do GC7 para o interior da célula. Neste aspecto, esperava-se que as deleções para alguns fatores responsáveis por este transporte pudesse tornar o mutante mais resistente a altas concentrações de GC7. Para isso, foram utilizados os nocautes dos genes *TPO1*, *TPO2*, *TPO3*, *TPO4* e *TPO5* com a respectiva linhagem selvagem. Enfim, como podemos observar na figura 6 os mutantes não se apresentaram resistentes, mesmo utilizando de concentrações muito superiores à definida anteriormente (300µM). Ainda, podemos observar que a linhagem selvagem não se mostrou sensível ao grande aumento nas concentrações de GC7 (2000µM), o que tornaria possível a utilização desta concentração, mas por ser uma concentração muito alta fica inviável a realização dos demais ensaios na concentração de 2000µM.

Dessa forma, fica evidenciado que se faz necessário um estudo mais aprofundado sobre os TPOs para futuramente melhor descrever como e se este transporte funciona de maneira dependente deste fatores e de que forma o GC7 poderia estar envolvido.

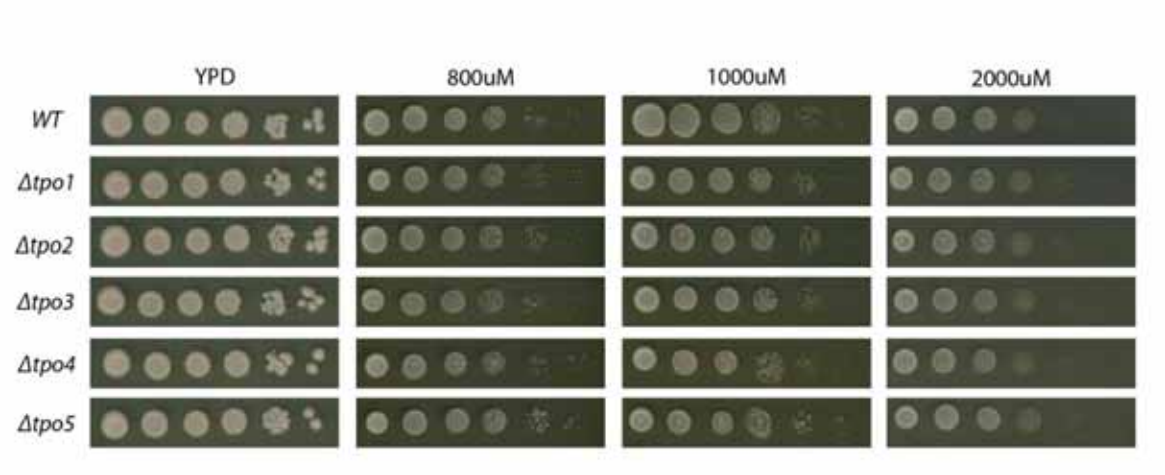

Figura 6. Avaliação da resistência ao GC7 dos TPOs em diferentes concentrações de GC7. Os diferentes mutantes de *TPO*, indicados na figura, foram crescidos, diluídos seriadamente e plaqueados em YPD (controle positivo) e em YPD na presença das diferentes concentrações de GC7, e incubadas à 25 °C por 3 dias.

5. CONCLUSÕES

- Foi confirmado o fenótipo de sensibilidade dos mutantes da família de transportadores ABC com diferentes compostos.
- A concentração de uso para o teste de sensibilidade com GC7 foi definida, sendo 300µM.
- Os mutantes AD1-9 e US-50 foram os que apresentaram maior sensibilidade tanto no teste com múltiplos compostos quanto para o GC7, corroborando com os dados da literatura.
- Os diferentes mutantes de eIF5A se mostraram sensíveis à concentração de GC7 utilizada.

- Curiosamente, o *tif51A*^{K56A} foi o mutante com mais sensível ao GC7.

- Os *TPO*s, mesmo em altas concentrações, não mostraram resistência ao GC7, em relação ao selvagem.

6. REFERÊNCIAS

AMBERG, D. **Methods in yeast genetics, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press**. BURKE, D. e JN, S. 2005.

AUSUBEL, F. **Current protocols in molecular biology, New York**. BRENT, R.;KINGSTON, R., *et al* 2004.

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, 1978. Acesso em: May 10.

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. Acesso em: May-Jun.

COOPER, H. L.; PARK, M. H.; FOLK, J. E. Posttranslational formation of hypusine in a single major protein occurs generally in growing cells and is associated with activation of lymphocyte growth. **Cell,** v. 29, n. 3, p. 791-7, Jul 1982. ISSN 0092-8674 (Print)0092-8674. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

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, 2008. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18341589 >. Acesso em: Mar 13.

GALVÃO, F. C. et al. The deoxyhypusine synthase mutant dys1-1 reveals the association of eIF5A and Asc1 with cell wall integrity. **PLoS One,** v. 8, n. 4, p. e60140, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23573236 >.

GENTZ, P. M.; BLATCH, G. L.; DORRINGTON, R. A. Dimerization of the yeast eukaryotic translation initiation factor 5A requires hypusine and is RNA dependent. **FEBS J,** v. 276, n. 3, p. 695-706, Feb 2009. ISSN 1742-4658. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19120453 >.

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, 2009. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19338753 >. Acesso em: Mar 20.

GUTHRIE, C.; FINK, G. R. E. Guide to Yeast Genetics. **Academic Press, New York, NY**, 1991.

HANAWA-SUETSUGU, K. et al. Crystal structure of elongation factor P from Thermus thermophilus HB8. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 101, n. 26, p. 9595-600, 2004. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15210970 >. Acesso em: Jun 29.

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, 2006. Acesso em: Feb 15.

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, 1994. Acesso em: Feb 11.

KANG, H. A.; SCHWELBERGER, H. G.; HERSHEY, J. W. Translation initiation factor eIF-5A, the hypusine-containing protein, is phosphorylated on serine in Saccharomyces cerevisiae. **J Biol Chem,** v. 268, n. 20, p. 14750-6, 1993. Acesso em: Jul 15.

LANDAU, G. et al. The Role of Polyamines in Supporting Growth of Mammalian Cells Is Mediated through Their Requirement for Translation Initiation and Elongation. **Journal of Biological Chemistry,** v. 285, n. 17, p. 12474-12481, Apr 23 2010. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000276787800003 >.

LEE, N. P. et al. Prognostic significance and therapeutic potential of eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) in hepatocellular carcinoma. **Int J Cancer,** v. 127, n. 4, p. 968-76, Aug 2010. ISSN 1097-0215. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19998337 >.

LEE, S. K. et al. N(1)-guanyl-1,7,-diamineoheptane, an inhibitor of deoxyhypusine synthase, suppresses differentiation and induces apoptosis via mitochondrial and AMPK pathways in immortalized and malignant human oral keratinocytes. **J Oral Pathol Med,** v. 38, n. 10, p. 792-800, Nov 2009. ISSN 1600-0714. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19656269 >.

MAGDOLEN, V. et al. The function of the hypusine-containing proteins of yeast and other eukaryotes is well conserved. **Mol Gen Genet,** v. 244, n. 6, p. 646-52, 1994. Acesso em: Sep 28.

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 1989. ISSN 0021-9258. 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,** v. 273, n. 3, p. 1677-83, Jan 1998. ISSN 0021-9258. 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. **Biol Signals,** v. 6, n. 3, p. 115-23, May-Jun 1997. ISSN 1016-0922 (Print)1016-0922. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

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 1438-2199. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19997760 >.

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, 1993a. Acesso em: May.

PARK, M. H., E. C. WOLFF and J. E. FOLK. Is hypusine essential for eukaryotic cell proliferation? **Trends Biochem Sci,** v. 18, n. 12, p. 475-9, 1993b. Acesso em: Dec.

PARK, M. H. et al. ANTIPROLIFERATIVE EFFECTS OF INHIBITORS OF DEOXYHYPUSINE SYNTHASE - INHIBITION OF GROWTH OF CHINESE-HAMSTER OVARY CELLS BY GUANYL DIAMINES. **Journal of Biological Chemistry,** v. 269, n. 45, p. 27827-27832, Nov 11 1994. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1994PV77200012 >.

PREUKSCHAS, M. et al. Expression of eukaryotic initiation factor 5A and hypusine forming enzymes in glioblastoma patient samples: implications for new targeted therapies. **PLoS One,** v. 7, n. 8, p. e43468, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22927971 >.

ROGERS, B. et al. The pleitropic drug ABC transporters from Saccharomyces cerevisiae. **J Mol Microbiol Biotechnol,** v. 3, n. 2, p. 207-14, Apr 2001. ISSN 1464-1801. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11321575 >.

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, 2014 Mar-Apr 2014. ISSN 1757-7012. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24402910 >.

SAINI, P. et al. Hypusine-containing protein eIF5A promotes translation elongation. **Nature,** v. 459, n. 7243, p. 118-21, 2009. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19424157 >. Acesso em: May 7.

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, 1991. Acesso em: Jun.

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, 1993. Acesso em: Jul 5.

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

THOMPSON, G. M.; CANO, V. S.; VALENTINI, S. R. Mapping eIF5A binding sites for Dys1 and Lia1: in vivo evidence for regulation of eIF5A hypusination. **FEBS Lett,** v. 555, n. 3, p. 464-8, 2003. Acesso em: Dec 18.

TOME, M. E.; GERNER, E. W. Cellular eukaryotic initiation factor 5A content as a mediator of polyamine effects on growth and apoptosis. **Biol Signals,** v. 6, n. 3, p. 150-6, 1997 May-Jun 1997. ISSN 1016-0922. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9285098 >.

TOMITORI, H. et al. Identification of a gene for a polyamine transport protein in yeast. **J Biol Chem,** v. 274, n. 6, p. 3265-7, Feb 1999. ISSN 0021-9258. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9920864 >.

WEIR, B. A.; YAFFE, M. P. Mmd1p, a novel, conserved protein essential for normal mitochondrial morphology and distribution in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe. **Mol Biol Cell,** v. 15, n. 4, p. 1656-65, 2004. Acesso em: Apr.

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, 2006. Acesso em: Oct 6.

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, 1998. Acesso em: May 15.

DADOS FINAIS

De acordo,

_____

Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli

Orientador

_____

Eleonora Rodrigues Alves Ribeiro

Aluna do curso de Farmácia-Bioquímica

Araraquara, 08 de Janeiro de 2015