

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - CÂMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS E BIOTECNOLOGIAS
APLICADAS À FARMÁCIA

ANA CAROLINA SILVA PAIVA

**Efeitos celulares da hipusinação e do inibidor de hipusinação GC7 na
autofagia utilizando como modelo *Saccharomyces cerevisiae***

Araraquara – SP

2020

ANA CAROLINA SILVA PAIVA

Efeitos celulares da hipusinação e do inibidor de hipusinação GC7 na autofagia utilizando como modelo *Saccharomyces cerevisiae*

Dissertação apresentada a Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologias Aplicadas à Farmácia.

Área de concentração: Biologia Molecular

Orientador: Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli

Araraquara – SP

2020

P149e

Paiva, Ana Carolina Silva.

Efeitos celulares da hipusinação e do inibidor de hipusinação GC7 na autofagia utilizando como modelo *Saccharomyces cerevisiae* / Ana Carolina Silva Paiva. – Araraquara: [S.n.], 2020.
54 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de concentração: Biologia Molecular.

Orientador: Cleslei Fernando Zanelli.

1. eIF5A. 2. GC7. 3. Autofagia. 4. Mitofagia. 5. Atgs. 6. GFP-ATG8.
I. Zanelli, Cleslei Fernando, orient. II. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030081P7

Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Efeitos celulares da hipusinação e do inibidor de hipusinação GC7 na autofagia utilizando como modelo *Saccharomyces cerevisiae*

AUTORA: ANA CAROLINA SILVA PAIVA

ORIENTADOR: CLESLEI FERNANDO ZANELLI

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

Prof. Dr. CLESLEI FERNANDO ZANELLI

Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Cleslei F. Zanelli", is placed above the printed name of the professor.

Profa. Dra. RENATA CASTIGLIONI PASCON

Departamento de Ciências Biológicas / Universidade Federal de São Paulo

Profa. Dra. FLAVIA VILLAÇA MORAIS

Faculdade de Educação e Artes / Universidade do Vale do Paraíba

Araraquara, 31 de julho de 2020

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida. Aos meus pais, Maria Helena e Rogério, que sempre confiaram e acreditaram em mim. Dedico, também, aos meus irmãos, Natália e Caio, por todo apoio e carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me amparado nas minhas escolhas, ter me dado força para enfrentar e superar todas as dificuldades.

Aos meus pais, meus irmãos e ao meu noivo, Matheus, por todo amor, incentivo e apoio incondicional.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli, pela sua orientação e oportunidade de aprendizado.

Aos meus amigos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Microrganismos Angélica, Bianca, Fernanda, Marco Aurélio, Mariana, Maria Olívia, Suelén, Tatiana e Weslei pelo apoio e ensinamentos, e principalmente, pela amizade, suporte e incentivos que sempre foram presentes no laboratório.

À banca examinadora por ter se disponibilizado em ler e contribuir com o aprimoramento do meu trabalho.

À Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' pela oportunidade da realização do mestrado e apoio institucional de infraestrutura, ao corpo docente e aos colegas do programa.

Ao apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

O fator de tradução de eucariotos 5A (eIF5A) é uma proteína altamente conservada em eucariotos e arqueas, essencial para viabilidade celular, e está envolvido no controle da proliferação celular, e em processos tumorigênico e inflamatório. eIF5A possui um aminoácido exclusivo, chamado hipusina, formado por uma modificação pós-traducional. A biossíntese da hipusina é espermidina-dependente e envolve duas etapas enzimáticas. A primeira etapa, a enzima desoxi-hipusina sintase participa desse processo adicionando um grupo 4-aminobutil, oriundo da espermidina, para um resíduo altamente conservado de lisina presente em eIF5A. Em seguida ocorre uma hidroxilação pela enzima desoxi-hipusina hidroxilase, levando a maturação de eIF5A. A atividade de eIF5A é inibida pela molécula N1-Guanyl-1,7-diaminoheptane (GC7), um análogo estrutural da espermidina que compete pela ligação ao sítio ativo da enzima desoxi-hipusina sintase. eIF5A e GC7 foram relacionados ao processo de autofagia, que é um processo catabólico de degradação lisossomal/vacuolar essencial para reciclagem de componentes citoplasmáticos e organelas danificados ou desnecessários. Na literatura, há controvérsia a respeito do efeito de eIF5A e GC7 quanto à regulação da autofagia. No presente estudo, foi investigada a relação de eIF5A e GC7 na autofagia utilizando como modelo a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Analisamos os efeitos celulares de dois mutantes relacionados a via de hipusinação - *dys1-1* (mutação na desoxi-hipusina sintase) e *hyp2-3* (mutação em eIF5A) - e do tratamento celular com GC7 na autofagia, por meio de dados de rastreamento em larga escala e análises de *western blot*. Devido a importância de eIF5A na célula, uma disfunção nesta proteína leva a um efeito global e prejudicial à célula, porém, algumas vias serão mais afetadas e outras menos afetadas. No caso, a via de autofagia é afetada diante uma mutação em eIF5A. No entanto, este efeito pode ser brando e reversível, uma vez que ao analisarmos outro mutante da via *dys1-1* e o tratamento com GC7 indicam que há uma indução de autofagia, o que provavelmente ocorre por um efeito independente da inibição de hipusinação, que é o acúmulo de poliaminas.

Palavras-chave: eIF5A. GC7. Autofagia. Mitofagia. Atgs. GFP-ATG8.

ABSTRACT

The eukaryotic translation factor 5A (eIF5A) is a highly conserved protein in eukaryotes and archaea, essential for cellular viability and it is involved in the control of cell proliferation and inflammatory and tumorigenic processes. eIF5A contains a unique amino acid-specific for its activity: hypusine, which is formed by post-translational modification. The hypusine biosynthesis is spermidine-dependent and involves two enzymatic steps. In the first stage, the deoxyhypusine synthase enzyme catalyzes the transfer of the 4-aminobutyl portion of spermidine to a highly conserved and specific lysine residue on the eIF5A side chain. It is then hydroxylated by the enzyme deoxyhypusine hydroxylase, leading to the maturation of eIF5A. The activity of eIF5A is inhibited by N1-Guanyl-1,7-diaminoheptane (GC7), a structural analog of the polyamine spermidine which competes for binding to the active site of the deoxyhypusine synthase. eIF5A and GC7 appear to be related to the autophagy process, which is a lysosomal/vacuolar degradation catabolic process essential for recycling cytoplasmic components and damaged or unnecessary constituents. In the literature, there are controversies regarding the effect of eIF5A and GC7 on the regulation of autophagy. In the present study, the relationship of eIF5A and GC7 in autophagy was investigated using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model. We analyzed the cellular effects of two mutants related to the hypusination pathway - *dys1-1* (mutation in deoxyhypusine synthase) and *hyp2-3* (mutation in eIF5A) - and GC7 cell treatment in autophagy, using tracking data in large scale and western blot analyzes. Due to the importance of eIF5A in the cell, dysfunction of this protein leads to a global and harmful effect on the cell, but, some pathways will be more affected and others less affected. The autophagy pathway is affected by an eIF5A mutation. However, this effect can be mild and reversible, since when analyzing the *dys1-1* mutant and treatment with GC7, it indicates that there is an induction of autophagy, which probably occurs due to an effect independent of the inhibition of hypusination, which is the accumulation of polyamines.

Keywords: eIF5A. GC7. Autophagy. Mitophagy. Atgs. GFP-ATG8.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da síntese proteica em eucariotos.	11
Figura 2. Etapa de elongação. Esquema do movimento do tRNA através do ribossomo durante a elongação do polipeptídeo.	11
Figura 3. Modificação pós-traducional de eIF5A	12
Figura 4. Modelo de eIF5A promovendo a formação de sequências consecutivas de prolinas.	14
Figura 5. Papel expandido para eIF5A na tradução	15
Figura 6. Mecanismo de autofagia em <i>S. cerevisiae</i>	18
Figura 7. Regulação de autofagia em condições normais de nutrientes	22
Figura 8. Regulação de autofagia em condições de starvation de nutrientes	23
Figura 9. Complexo Atg1 sob condições ricas em nutriente ou ativação de TOR e em starvation de nutrientes ou inativação de TOR.	24
Figura 10. Modelo de reciclagem de Atg9 a partir do PAS/Autofagossomo	25
Figura 11. Esquema dos procedimentos realizados no ensaio de GFP-Atg8	31
Figura 12. Alinhamento múltiplo de sequências da proteína Atg3.	35
Figura 13. Análise dos níveis proteicos de Atg1 e Atg33 com tratamento de GC7. ...	41
Figura 14. Efeito do mutante hyp2-3 e de GC7 na autofagia basal por análises de Western blot utilizando como repórter GFP-Atg8, a uma temperatura de 30°C	44
Figura 15. Efeito do mutante hyp2-3 e de GC7 na autofagia basal por análises de Western blot utilizando como repórter GFP-Atg8, a uma temperatura de 37°C.	45

SUMÁRIO

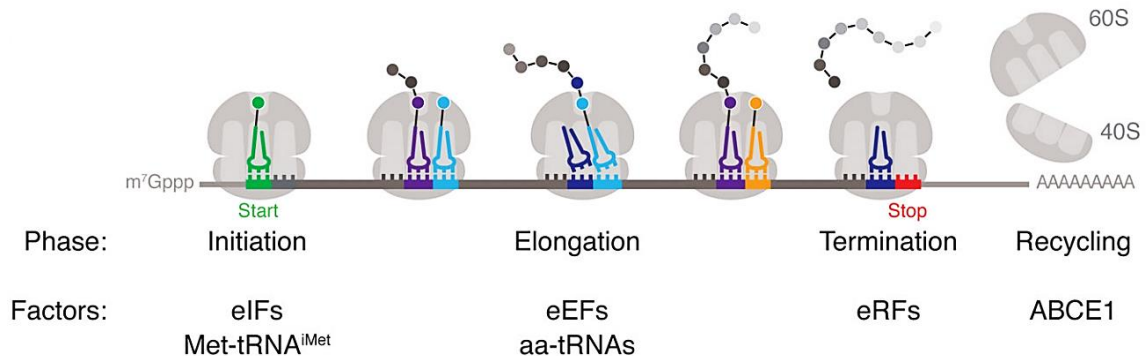
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. OBJETIVOS.....	26
2.1. Objetivos Específicos	26
2.1.1. Identificar os genes relacionados à autofagia nos dados de rastreamento em larga escala por RNA-seq	26
2.1.2. Verificar o impacto de GC7 e mutante de eIF5A na autofagia basal e induzida.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1. Linhagens de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas.....	27
3.2. Concentração de GC7	29
3.3. Análise dos dados de RNA-seq.....	29
3.4. Ensaio de GFP-Atg8.....	30
3.5. Lise celular mecânica	32
3.6. Quantificação pelo método de Lowry.....	33
3.7. <i>Western blot</i>	33
4. Resultados e Discussão	34
4.1. Avaliação dos <i>motifs</i> de <i>stalling</i> ribossomal descritos na literatura para a proteína Atg3.....	34
4.2. Análise do perfil transcricional e traducional de mutantes da via de hipusinação sob os fatores de transcrição e proteínas da via de autofagia	36
4.3. Efeitos da inibição da hipusinação no metabolismo celular.....	39
4.4. Efeito de eIF5A e GC7 em autofagia analisando o ensaio de GFP-Atg8	43
5. CONCLUSÕES.....	44
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

1. INTRODUÇÃO

A expressão gênica resulta na decodificação de um RNA mensageiro (mRNA) e, assim, na síntese de proteínas. Este processo é catalisado por ribossomos com a participação de aminoacil-tRNAs e fatores de tradução nas seguintes etapas: início, elongação, terminação e reciclagem dos ribossomos (Figura 1). Em eucariotos, a subunidade menor do ribossomo 40S e a subunidade maior 60S compõe o ribossomo 80S no qual o tRNA (RNA transportador) percorre três sítios de ligação: o sítio aminoacil (A), o peptidil (P), e o de saída (E). No início da tradução, fatores de iniciação (chamados de eIF's em eucariotos) orientam a montagem adequada do ribossomo 80S no códon de início (AUG) com o iniciador Met-tRNA^{iMet} ligado ao sítio P (Em bactérias, mitocôndrias e cloroplastos é o iniciador fMet-tRNA^{iMet} - N-formilmetionil-tRNA_i) (SCHULLER; GREEN, 2018; SHIROKIKH; PREISS, 2018).

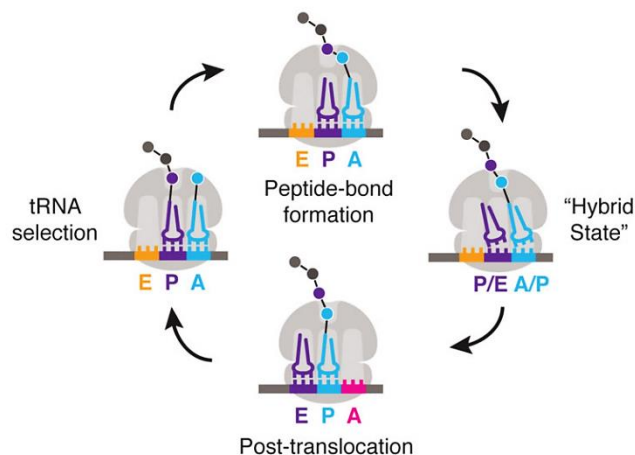
Seguindo para elongação do polipeptídeo, fatores de elongação (eEFs) facilitam a ligação do aminoacil-tRNA no sítio A, de maneira códon-dependente, enquanto o tRNA no sítio A é translocado para o sítio P formando um estado "híbrido" em relação as subunidades do ribossomo (Figura 2), e com concomitante translocação do ribossomo pelo mRNA. A tradução é finalizada quando o ribossomo encontra um códon de parada, e fatores de liberação (eRFs) induzem a hidrólise do polipeptídeo em formação do tRNA do sítio P. De forma associada ao fator de liberação do peptídeo (terminador da tradução) eRF1, em eucariotos, existe a ação da ATPase ABCE1 (Rli1 em *Saccharomyces cerevisiae*) , que interage e estabiliza eRF1, e assim, induzindo a separação das subunidades 40S e 60S (DEVER; KINZY; PAVITT, 2016; SCHULLER; GREEN, 2018).

Figura 1. Representação esquemática da síntese proteica em eucariotos.



Fonte: SCHULLER; GREEN, 2018 modificado.

Figura 2. Etapa de elongação. Esquema do movimento do tRNA através do ribossomo durante a elongação do polipeptídeo.

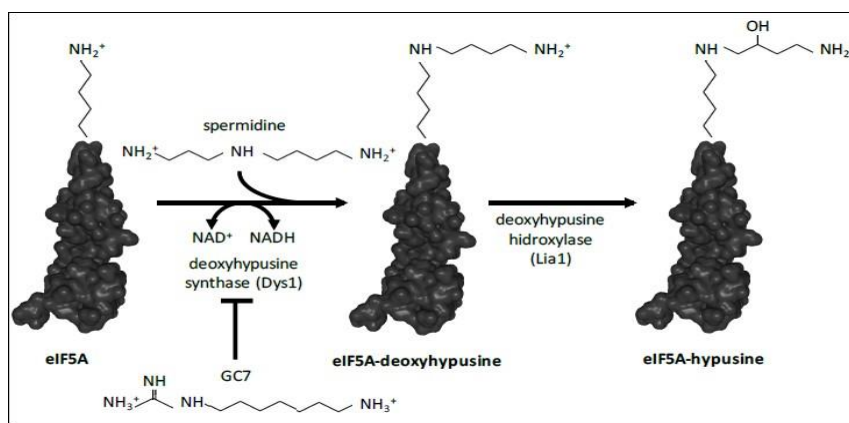


Fonte: SCHULLER; GREEN, 2018 modificado.

Os fatores proteicos requeridos medeiam e regulam a tradução. Ao longo da evolução, vários fatores foram conservados, principalmente aqueles da etapa de elongação da tradução. Um exemplo destes fatores é eIF5A (*eukaryotic translation initiation factor 5A*), uma proteína altamente conservada de arqueas a eucariotos. Embora tenha sido denominada como um fator de início de tradução, posteriormente, verificou-se que, na verdade, é um fator de elongação da tradução. Em bactérias, há um homólogo de eIF5A, chamado EF-P (*elongation factor P*), que apesar de ser menos conservado, possui a mesma função de eIF5A na tradução (ROSSI et al., 2014).

eIF5A possui um aminoácido único e exclusivo, chamado hipusina (hidroxi-putrescina-lisina). Ele é formado por uma modificação pós-traducional em que um resíduo de lisina conservado, da cadeia lateral de eIF5A, é transformado em hipusina por uma reação dependente da poliamina espermidina. A reação ocorre em duas etapas enzimáticas (Figura 3): a primeira pela enzima desoxi-hipusina sintase (Dys1 em *S. cerevisiae*), a qual transfere um resíduo 4-aminobutil da poliamina espermidina para o resíduo de lisina, formando o intermediário eIF5A-desoxi-hipusina (etapa NAD dependente). A segunda etapa é hidroxilação pela enzima desoxi-hipusina hidroxilase (Lia1 em *S. cerevisiae*), levando ao produto final: eIF5A hipusinada (MANDAL; MANDAL; PARK, 2014). A hipusinação é uma modificação que leva à maturação de eIF5A, em um processo irreversível, em que a eIF5A permanece modificada até a sua degradação (PARK et al., 2010; DE ALMEIDA et al., 2014).

Figura 3. Modificação pós-traducional de eIF5A. Esquema simplificado da biossíntese do resíduo de aminoácido hipusina em eIF5A. A enzima desoxi-hipusina sintase (Dys1 em levedura) catalisa a transferência da porção 4-aminobutil da poliamina espermidina para um resíduo de lisina altamente conservado da cadeia lateral de eIF5A formando o intermediário eIF5A-desoxi-hipusina (etapa NAD dependente). Posteriormente, este é hidroxilado pela enzima desoxi-hipusina hidroxilase (Lia1 em levedura), levando ao produto final: eIF5A hipusinada. Dys1 é inibida pelo composto N1-guanil-1,7-diamino-heptano (GC7).



Fonte: DE ALMEIDA et al., 2014 modificado.

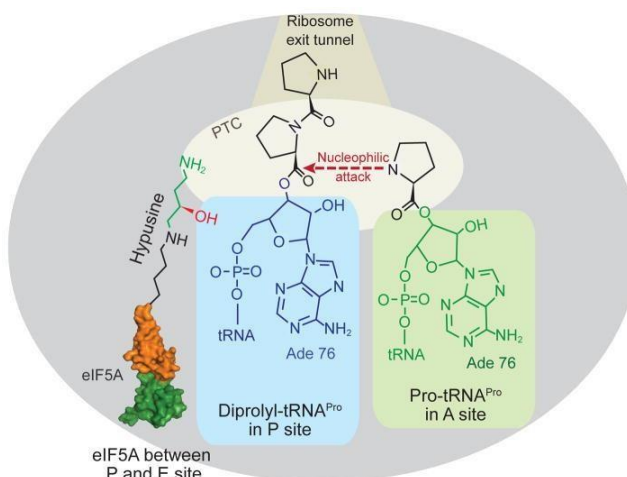
eIF5A tem aproximadamente 17 kDa, com dois domínios bem definidos, compostos principalmente por folha- β . Na região N-terminal está contido o sítio de hipusinação em uma longa alça bastante exposta. Em humanos, eIF5A possui duas isoformas geradas a partir de genes distintos, eIF5A-1 e eIF5A-2, expressas pelos genes EIF5A1 e EIF5A2, respectivamente. A isoforma eIF5A-1 é considerada constitutiva e predominantemente expressa na maioria dos tecidos; enquanto que eIF5A-2 possui uma expressão mais restrita e está presente em certos locais específicos como cérebro e testículos, por exemplo (PARK, 2006). eIF5A-2 tem sido apontada como um candidato a oncogene por ser altamente expresso em alguns tipos de cânceres, entretanto, a expressão elevada de ambas isoformas é utilizada como um marcador tumoral de diagnóstico e/ou prognóstico (MATHEWS; HERSHEY, 2015; NAKANISHI; CLEVELAND, 2016).

A respeito da função de eIF5A na célula, inicialmente, assim como EF-P, eIF5A foi caracterizado como um fator de início do processo de tradução, por estimular a síntese de metionil-puromicina em ensaios *in vitro* que avaliam a formação das primeiras ligações peptídicas. Neste ensaio, mede-se a metionina radiotiva proveniente do tRNA^{Met}, presente no sítio P do ribossomo, que é incorporada à puromicina pela catálise mediada pelo centro de peptidil transferase do ribossomo (PTC). Esta reação é análoga à síntese da primeira ligação peptídica, mas também, pode refletir a formação da primeira ligação peptídica durante a elongação da tradução (ROSSI et al., 2014). O estudo de Saini et al. (2009) evidenciaram a participação de eIF5A na etapa de elongação da tradução. Neste estudo, foram traçados os perfis polissomais, com e sem tratamento de cicloheximida (CHX – inibidor da elongação da tradução), para: um mutante do fator de início de tradução eIF3, um mutante de eIF5A e a linhagem selvagem. Como resultado, obtiveram que no perfil polissomal do mutante de eIF5A há um aumento das frações polissomais em relação a 80S, indicando *stalling* (paradas/atraso) do ribossomo durante a elongação, ao contrário do mutante de eIF3 e comparável a linhagem selvagem com CHX. Sendo assim, apesar de ter-se mantido o nome eIF5A, este é um fator que promove a elongação da tradução (GREGIO et al., 2009; SAINI et al., 2009).

Além disso, a demonstração do papel de eIF5A como um facilitador na

síntese de poliprolinas corroborou seu papel na elongação da tradução. É proposto que a rigidez estrutural das prolinas dificulta sua adição consecutiva aos polipeptídeos, o que seria facilitado pela interação física de EF-P (em bactérias) e de eIF5A (em eucariotos) com o ribossomo, ajudando no correto posicionamento do peptidil-tRNA no PTC (GUTIERREZ et al., 2013) (Figura 4).

Figura 4. Modelo de eIF5A promovendo a formação de sequências consecutivas de prolinas. A sequência de di-prolina causa uma parada ribossomal com o diprolil-tRNA^{Pro} no sítio P e o Pro-tRNA^{Pro} no sítio A. eIF5A liga-se entre o sítio P e E posicionando a alça de hipusina próxima ao diprolil-tRNA^{Pro} no centro peptidil transferase (PTC) do ribossomo facilitando a formação da ligação peptídica de poliprolinas.

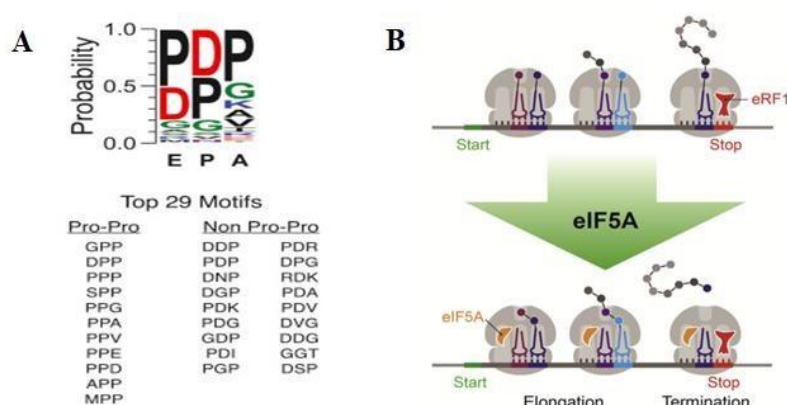


Fonte: DEVER; GUTIERREZ; SHIN, 2014.

Por outro lado, o estudo de Schuller et al. (2017) mostra também que a depleção de eIF5A gera defeitos de elongação não apenas em prolinas consecutivas (Figura 5A). Durante a elongação, eIF5A atua também para aumentar a eficiência de formação de ligação peptídica pelo ribossomo em determinadas sequências de três ou mais resíduos que formam *motifs* peptídicos que tendem a induzir *stalling* ribossomais, entre eles sequências consecutivas de prolinas, mas não apenas. Estas sequências podem causar uma conformação estrutural do polipeptídeo em crescimento (ligado ao peptidil-tRNA) que é desfavorável para sua liberação do complexo ribossomal causado pela rigidez estrutural do aminoácido ou por outros motivos ainda não elucidados (SHIN et al., 2017). No término da tradução, também

há auxílio de eIF5A ao estimular a hidrólise da ligação peptidil-tRNA mediada por eRF1 (Figura 5B). Esses papéis expandidos para eIF5A ajudariam a explicar sua natureza essencial e grande abundância em eucariotos (PELECHANO; ALEPUZ, 2017; SCHULLER et al., 2017). No entanto, ainda não está claro exatamente quais proteínas requerem mais eIF5A para sua tradução, uma vez que apenas a presença de *motifs* descritos na Figura 5A, não é fator determinante para a parada ribossomal, como discutiremos posteriormente a respeito do estudo que avaliou o efeito de eIF5A sob a tradução da proteína relacionada a autofagia ATG3.

Figura 5. Papel expandido para eIF5A na tradução. (A) Os 29 principais *motifs* associados a *stalling* do ribossomos em células com depleção de eIF5A. Além dos *motifs* peptídicos de poliprolinas, há outros em que a presença de eIF5A alivia a parada ribossomal. **(B)** Além de eIF5A aliviar *stalling* ribossomais também estimula a hidrólise de peptidil-tRNA mediada por eRF1 na terminação da tradução.



Fonte: SCHULLER et al., 2017.

Diversas estratégias foram exploradas para elucidar as funções celulares de eIF5A, como: silenciamento de eIF5A via RNA de interferência (siRNA) em célula de mamíferos; geração de mutantes de eIF5A ou das enzimas da via de hipusinação em *S. Cerevisiae*; ou utilização de inibidores de uma das etapas enzimáticas da biossíntese da hipusina. A inibição de Dys1-1 tem sido apontada em diversos estudos como uma estratégia promissora para o desenvolvimento de alternativas terapêuticas, principalmente em relação a desordens de proliferação celular e a processos inflamatórios (KAISER et al., 2007; CHAWLA et al., 2010). Um dos mais

citados e potente inibidor descrito é o N1-guanil-1,7-diaminoheptano (GC7 - Figura 1). GC7 é um composto sintético e um análogo estrutural da espermidina que inibe a desoxi-hipusina sintase ao competir com o substrato espermidina pela ligação ao sítio ativo (KAISER et al., 2007).

Os estudos de Lou et al. (2013) e Fang et al. (2018) indicaram que, uma vez que eIF5A-2 é um potencial alvo terapêutico, por ser um oncogene e associado a quimiorresistência, combinar terapias com GC7 pode ser uma alternativa terapêutica eficiente e segura para o tratamento de pacientes com câncer.

Interessantemente a via de poliaminas, que está interligada à hipusinação devido ao requerimento de espermidina na formação da hipusina, pode ser um indicativo de câncer, pois, foi notado que os níveis de poliaminas estão muito elevados em pacientes com câncer. Estudos apontam que o circuito de poliamina-hipusina é um alvo de alta prioridade para a terapêutica do câncer (NAKANISHI; CLEVELAND, 2016).

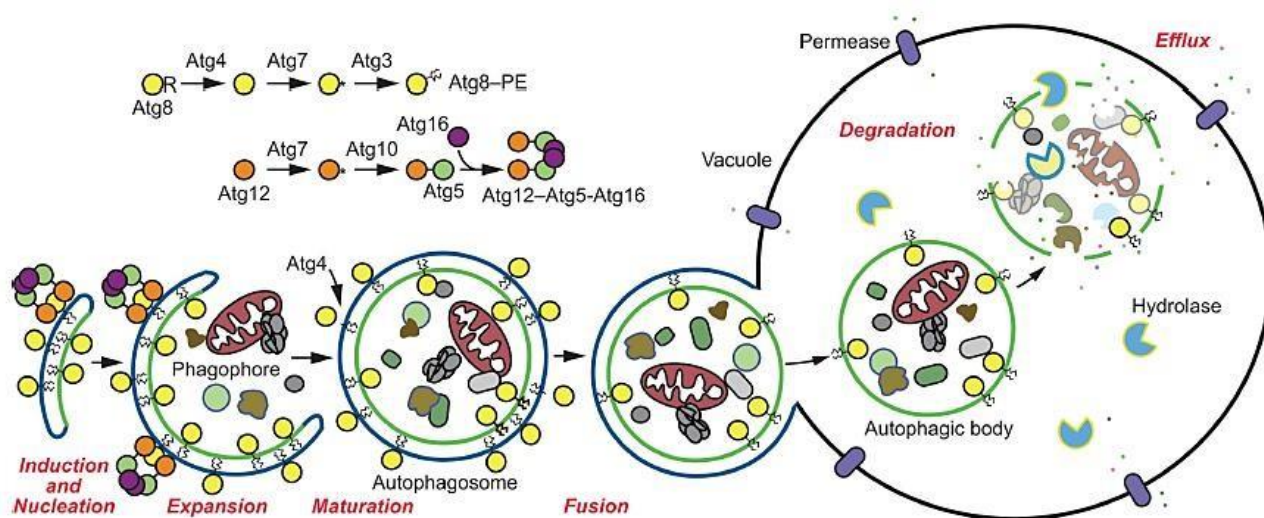
As poliaminas são pequenos polímeros orgânicos que desempenham funções básicas essenciais na célula, relacionadas à proliferação e sobrevivência celular. A espermidina, molécula precursora da hipusina, compõe a classe das poliaminas que regulam a expressão gênica. Assim como a espermidina está envolvida na regulação da tradução por atuar na modificação pós-traducional de eIF5A, 25 poliaminas atuam na tradução contribuindo para a eficiência e fidelidade da síntese proteica (DEVER; IVANOV, 2018; IVANOV et al., 2018).

Os níveis intracelulares de poliaminas são altamente regulados, por meio de sua biossíntese, catabolismo e/ou transporte, também, há a regulação traducional das principais enzimas da biossíntese de poliaminas, a fim de que seja mantida a homeostase de poliaminas na célula. Uma vez havendo um desequilíbrio intracelular de poliaminas, processos celulares como transcrição, tradução, regulação da expressão gênica, autofagia e resistência ao estresse são afetados (MILLER-FLEMING et al., 2015; DEVER; IVANOV, 2018). No estudo de Ivanov e colaboradores (2018), foi observado que, em células de mamíferos, a redução de hipusinação mimetiza um efeito de acúmulo de poliaminas (IVANOV et al., 2018).

Assim como um desequilíbrio que leva o aumento dos níveis de poliaminas na célula relaciona-se com autofagia (ZHANG et al., 2019), a inativação da atividade de eIF5A e o tratamento células com GC7 também foram relacionados ao processo

de autofagia. A autofagia é um processo catabólico de degradação lisossomal (em mamíferos) ou vacuolar (em leveduras e plantas) o qual é essencial por promover a reciclagem de componentes citoplasmáticos e de constituintes danificados ou desnecessários, mantendo a síntese macromolecular e homeostase da energia durante condições estressantes, como privação de nutrientes ou de oxigênio, e baixo *status* energético celular (FRANKEL; LUBAS; LUND, 2017). Em células eucarióticas, é um processo altamente conservado desde eucariotos simples, como *S. cerevisiae*, à células de mamíferos, por exemplo. Células de levedura induzem autofagia em condições de escassez de nutrientes (*starvation*), por exemplo. A fase inicial consiste na formação de estruturas de dupla camada de membrana chamadas de fagóforos, os quais sequestram componentes intracelulares até formar uma estrutura fechada e esférica, o autofagossomo, o qual se funde com o vacúolo para hidrólise ácida da carga capturada. A formação e maturação adequada do autofagossomo são mediadas por um grupo de proteínas relacionadas à autofagia (nomeadas de Atg), a maioria inicialmente identificada em leveduras (OLIVERIO et al., 2014; LUBAS et al., 2018). Em *S. cerevisiae*, a autofagia é iniciada proximamente ao vacúolo, local de montagem da estrutura pré-autofagossomal (PAS). A elongação da membrana do fagóforo envolve a regulação por duas reações similares a de ubiquitinação: a proteína Atg12 é conjugada a Atg5 por Atg7, que atua como a enzima de ativação de ubiquitina E1, e pela Atg10, que atua de forma similar a enzima de conjugação de ubiquitina E2. Formado o complexo Atg5-Atg12, então, este interage de maneira não covalente com Atg16, resultando em um complexo ternário associado ao fagóforo, mas que é dissociado no autofagossomo completo. A segunda reação envolve um sistema de conjugação de Atg8, que é requerido para expansão e fechamento da membrana do fagóforo. Atg8 é convertida na forma lipídica Atg8-fosfatidil-etanolamina (Atg8-PE) através da proteólise na região C-terminal por Atg4, ativação dependente de Atg7, e conjugação mediada por Atg3. Atg8-PE associa-se em ambos os lados da superfície do fagóforo, seguindo para formação e maturação do autofagossomo, Atg8 na superfície externa é removida pela desconjugação catalisada por Atg4. O autofagossomo formado funde-se ao vacúolo, o que leva à degradação do conteúdo, gerando um efluxo de nutrientes para o citoplasma (Figura 6) (CARLSSON; SIMONSEN, 2015; DELORME-AXFORD et al., 2015).

Figura 6. Mecanismo de autofagia em *S. cerevisiae*. Este esquema envolve os principais estágios de autofagia: Indução e nucleação, expansão, maturação, fusão ao vacúolo, degradação e efluxo de nutrientes.



Fonte: DELORME-AXFORD et al., 2015.

Há dois tipos de autofagia: autofagia não seletiva e autofagia seletiva. Esta última tem como alvo mitocôndrias (mitofagia), retículo endoplasmático (RE-fagia), núcleo (núcleofagia), e ribossomo (ribofagia) (TATEHASHI; WATANABE; TAKAGI, 2016).

Na literatura, há controvérsias a respeito do efeito de eIF5A e GC7 com relação à autofagia. No estudo de Patel et al. (2009) é apontado que a mutação no homólogo de desoxi-hipusina hidroxilase de *Drosophila* (nero) e *knockdown* de eIF5A via RNA de interferência (siRNA) causam fenótipos celulares similares, em particular, na autofagia, em que aumentam a sua indução. Enquanto o trabalho de Oliverio et al. (2014) descreve que o efeito na indução de autofagia basal celular não aparece em células com depleção de eIF5A (também via siRNA), mas que o tratamento com o inibidor de hipusinação GC7 resulta nesta indução, o que sugere ser um efeito do GC7 independente de eIF5A.

Em um trabalho mais recente, de Lubas et al. (2018), os pesquisadores realizaram um rastreamento de siRNA para identificar proteínas que afetam o processo de autofagia basal ou induzida pelo composto Torin-1, em cultura de célula de tumor de mama MCF-7. O fator eIF5A foi identificado como um efector necessário

para a autofagia em ambas condições. Foi demonstrado que a ausência de eIF5A inibe a formação de autofagossomo, uma vez que eIF5A é necessária para a tradução eficiente da proteína ATG3. Mais especificamente, foi identificado que Atg3 possui 2 *motifs* previamente identificados em *S. cerevisiae* como dependentes de eIF5A: DDG e PPPP. Curiosamente, foi demonstrado que o *motif* DDG é determinante para a dependência da tradução de Atg3 por eIF5A, enquanto que o PPPP não se mostrou determinante para esta dependência (LUBAS et al., 2018).

Outro fator importante é que um defeito ou ausência da atuação de eIF5A pode estar interferindo de maneira global na célula, por exemplo, *upstream* a formação do autofagossomo em mecanismos de regulação da via de autofagia. A autofagia é regulada tanto por modos regulatórios transcricionais quanto pós-traducionais. Um dos componentes essenciais de regulação da via, em levedura, é o complexo TORC1 (*target of rapamycin complex 1*). Este é um complexo formado por três subunidades: Tor (target of rapamycin), Lst8 e Raptor (Kog1). Tor é uma quinase evolutivamente conservada que atua como controle central do crescimento celular, ativando processos anabólicos como síntese de proteínas, biogênese de ribossomo e inibindo processos catabólicos como autofagia. Então, nutrientes são importantes reguladores da atividade de TORC1 em células eucarióticas. Para a ativação da atividade catalítica de TORC1 é necessária a ligação de Lst8 no domínio quinase de Tor e Kog1 é um essencial *scaffold* para essa ligação (HARA et al., 2002; MAEGAWA et al., 2015; COUSO et al., 2019).

Além da regulação de TORC1, a sinalização pela via de RAS/cAMP-dependente da proteína quinase A (PKA - Protein kinase A) também regula a autofagia. A via RAS/PKA é importante para regulação do crescimento em resposta a nutrientes extracelulares e compreende duas pequenas GTPases, Ras1 e Ras2, e três subunidades catalíticas, Tpk1, Tpk2 e Tpk3. Ao ocorrer a ligação do cAMP à subunidades catalíticas, ativa PKA que é um regulador negativo da via de autofagia (YORIMITSU et al., 2007).

Sch9 pertence a uma família de quinases AGC que é fosforilada em múltiplos sítios por TORC1. Em condições normais da célula o complexo TORC1 permanece ativo, atuando como regulador de autofagia em diferentes pontos da via.

Por exemplo, o complexo ao fosforilar Sch9, torna-a ativa. Interessantemente, estudos mostram que a autofagia é regulada cooperativamente via Sch9 e PKA, isto é, a autofagia é induzida pela inativação simultânea de ambas Sch9 e PKA, pois estas possuem um papel paralelo na célula, e também a regulação desses dependem de TORC1 (YORIMITSU et al., 2007). Sch9 inibe a proteína quinase ativada por mitógeno Slt2, a qual, quando ativada, inibe PKA por fosforilação (CHEN; KLIONSKY, 2011). A inativação de Sch9 induz, também, a autofagia pela regulação da proteína quinase Rim15 (um regulador positivo de autofagia) e os fatores de transcrição Msn2/Msn4. Rim15 ativado, sob condições escassas de nutrientes, inibe por fosforilação o fator de transcrição Ume6, permitindo a transcrição e tradução de Atg8 (REGGIORI; KLIONSKY, 2013).

O “controle geral de via de nutrientes” (GCN) regula a biossíntese de aminoácidos e também modula a autofagia. A proteína quinase Gcn2 está envolvida na detecção dos níveis de aminoácidos intracelulares, sob condições de *starvation* de nutrientes, Gcn2 encontra-se desfosforilada (CHERKASOVA; HINNEBUSCH, 2003), ativando por fosforilação o fator de tradução eIF2 α , que regula a tradução do fator de transcrição Gcn4, resultando na ativação transcricional de genes envolvidos na síntese de aminoácidos e no aumento da transcrição de genes específicos de ATG. Outro ponto é uma regulação negativa de Gcn4 que ocorre através de sua degradação mediada pela fosforilação dependente do complexo Pho85-Pcl5 (Pho85 é uma quinase dependente de ciclina que quando complexada com a ciclina Pcl5 regula negativamente a autofagia) (REGGIORI; KLIONSKY, 2013).

Sabe-se também que a proteína Snf1 (*Sucrose NonFermenting 1*) é uma proteína quinase requerida para manter a homeostase energética, principalmente para adaptação celular de *S. cerevisiae* em condições de estresse por deprivação de fontes de carbono. Por outro lado, em condições de limitação de nitrogênio sua atividade é basal. Snf1 é regulada negativamente por TORC1 em condições normais de nutrientes. Mas, quando há limitações nutricionais, Snf1 atua como regulador positivo de autofagia, após ser fosforilada por um complexo de três quinases Sak1, Tos3 e Elm1. Entretanto, o mecanismo pelo qual Snf1 atua, demonstrado até hoje, é referente a uma autofagia específica, a mitofagia. Em condições de *starvation* (privação) de glicose, Snf1 medeia a fosforilação de Mec1, a qual recruta Atg1 para

a modulação sobre a superfície da mitocôndria, durante a indução de mitofagia (CHEN; KLIONSKY, 2011; YI et al., 2017).

O complexo TORC1 pode regular diretamente a autofagia pelo complexo Atg1, ou também por uma regulação em cascata de Tap42, em que Tap42 é um efetor de TOR que está complexada com a proteína fosfatase do tipo 2 Pph21/Pph22. Na literatura, tem-se que a superexpressão de Pph21 ou Pph22 inibe a autofagia, pois estas desfosforilam Atg1. A inativação de Tap42, em linhagem mutante de Tap42 sensível a temperatura, induz a autofagia, sem que fosse necessária a inibição de TORC1. A superexpressão da proteína Tip41, que inibe Tap42, resulta numa indução de autofagia (YORIMITSU et al., 2009; REGGIORI; KLIONSKY, 2013). Para resumir essas informações, as Figuras 7 e 8 contêm um esquema da regulação sob condições normais celulares e condições de *starvation* de nutrientes.

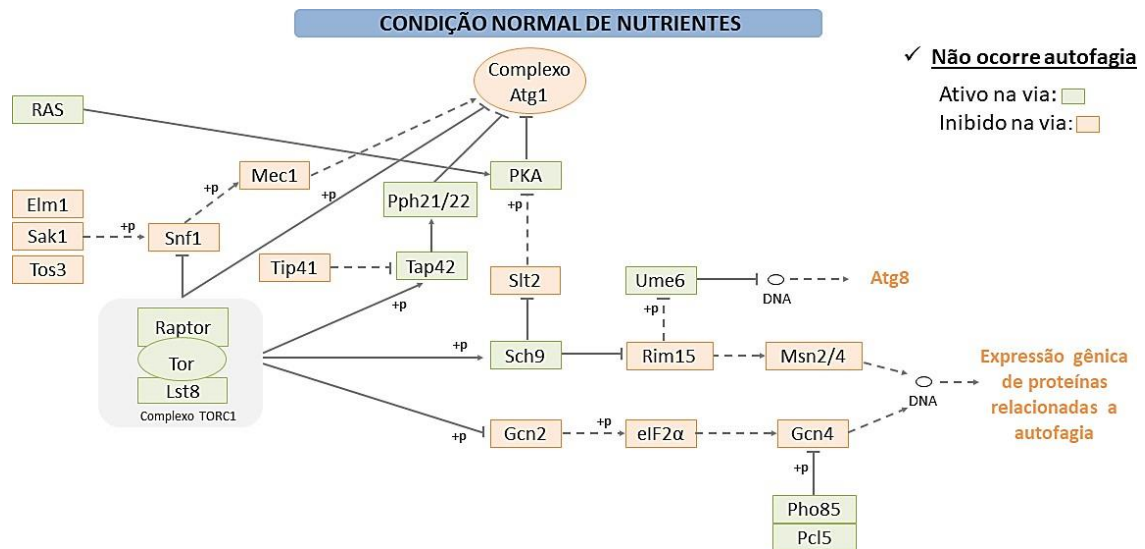
Outro ponto interessante a ser discutido é como os fatores de transcrição e a maquinaria citosólica coopera para determinar o tamanho e o número de autofagossomos, sendo esses dois fatores essenciais para a atividade de autofagia. Por exemplo, a transcrição de Atg8 é reprimida por Ume6, e a de Atg9 por Pho23.

Quando as quantidades de Atg8 e Atg9 são limitantes, o autofagossomo formado é menor e a taxa de formação é mais lenta, respectivamente.

A regulação citoplasmática de autofagia engloba várias proteínas Atgs, por exemplo, o complexo quinase Atg1 que inclui a proteína Atg1, Atg13 e um subcomplexo ternário Atg17-Atg31-Atg29, o qual também se encontra nas Figuras 7 e 8. Como se pode notar, há muitos fatores que atuam sobre o complexo Atg1 numa regulação *upstream*, tais como fatores que participam da regulação de fosforilação da proteína Atg13, a qual é essencial para ativação do complexo. Em condições ricas de nutrientes, via TORC1, Sch9 ou PKA (as duas últimas vias também são influenciadas pela regulação por TORC1), a proteína Atg13 é hiperfosforilada e o complexo Atg1 é inativado, pois, há baixa afinidade entre Atg13 e Atg1, não ocorrendo à interação de Atg1 com Atg13-Atg17-Atg31-Atg29, consequentemente, não há indução de autofagia. Sob a condição de *starvation*, Atg13 é rapidamente

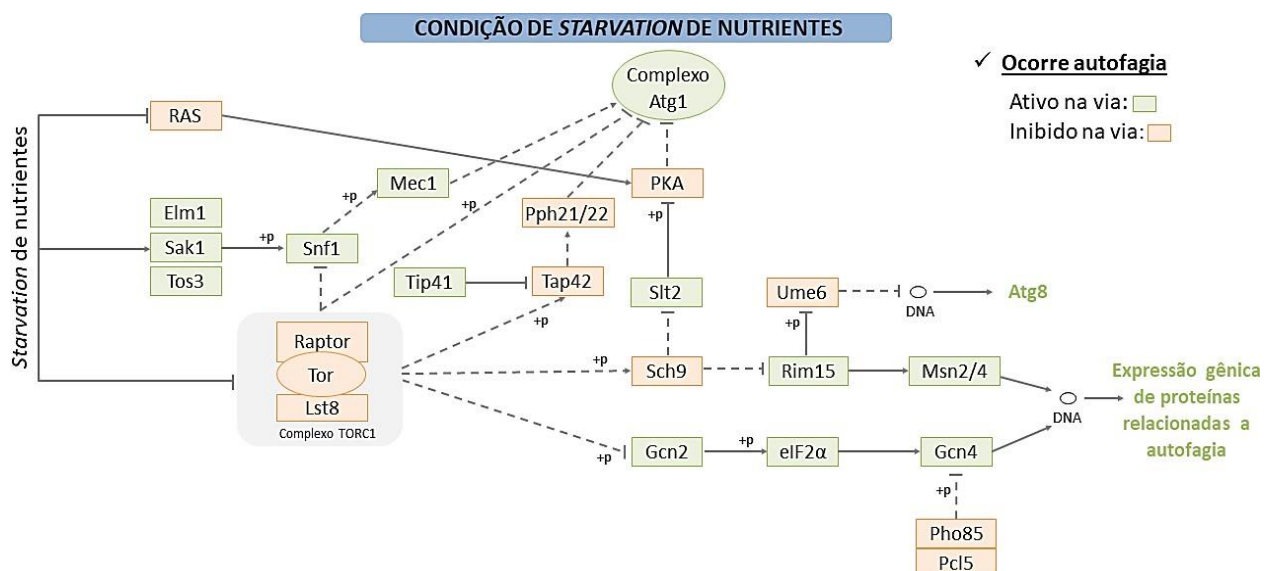
desfosforilada, resultando numa alta afinidade por Atg1, o que modula a atividade de quinase de Atg1. Assim, a interação entre as Atgs desse complexo forma-se, Atg1 é autofosforilada, seguindo com a indução de autofagia. Atg17 liga-se diretamente a Atg13, interagindo também com Atg31 e Atg29. Assim, formam um arcabouço proteico que é necessário para máxima atividade de quinase de Atg1. Atg17 também tem um papel importante em regular o recrutamento de proteínas para a formação da estrutura pré-autofagossomal (PAS), em condições de *starvation*. Assim como, Atg1 é necessária para recrutar Atg2 para o PAS e, também, para esse recrutamento é necessária Atg8. Atg1 e Atg2 são requeridas para que ocorra a interação de Atg9 e Atg18 (REGGIORI et al., 2004; CHEN; KLIONSKY, 2011; REGGIORI; KLIONSKY, 2013). Foi proposto que Atg17 é uma das primeiras a serem recrutadas para PAS em condição de indução de autofagia. Atg29 é uma fosfoproteína que contém um domínio C-terminal inibitório, o qual precisa ser fosforilado para interromper a inibição. Atg1 autofosforila-se em Thr266 no *loop* de ativação, sendo necessária essa modificação para sua atividade. Atg9 tem sido identificada como um dos alvos diretos de Atg1 em levedura.

Figura 7. Regulação de autofagia em condições normais de nutrientes. O esquema mostra como estão os reguladores de autofagia em uma condição normal de nutrientes. Em verde encontram-se as proteínas ativas na via; em laranja as que estão inibidas na via. As setas tracejadas indicam ações de ativação/inibição que não ocorrem sob essa condição.



Fonte: Adaptada pela autora a partir de dados do banco de dados KEGG Pathway.

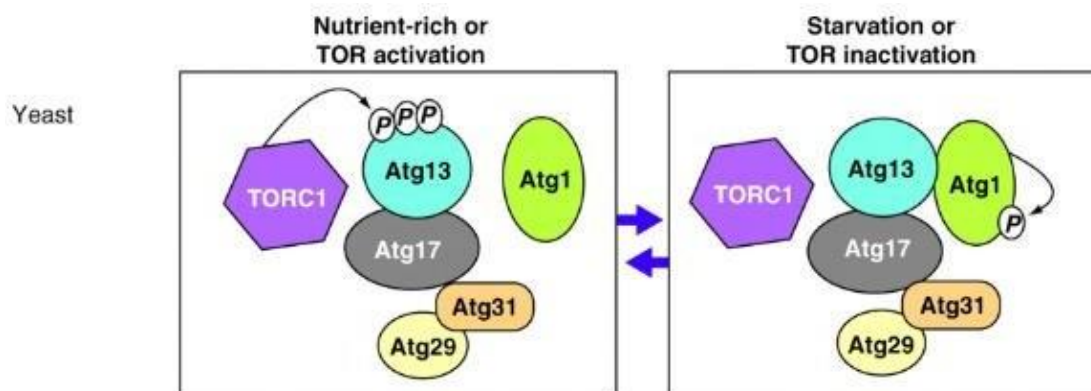
Figura 8. Regulação de autofagia em condições de starvation de nutrientes. O esquema mostra como estão os reguladores de autofagia em uma condição de *starvation* de nutrientes. Em verde encontram-se as proteínas ativas na via; em laranja as que estão inibidas na via. As setas tracejadas indicam ações de ativação/inibição que não ocorrem sob essa condição.



Fonte: Adaptada pela autora a partir de dados do banco de dados KEGG Pathway.

Outro complexo auxiliar da nucleação no PAS é o PI3K. Formado por Vps34, que é uma fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) em levedura, Vps15 (quinase regulatória), Atg6, Atg14 e Atg38. Poucas proteínas Atgs interagem com PI3K, sugerindo que sua principal função é no recrutamento de proteínas para a formação do fagóforo e autofagossomo ao gerar fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P) no PAS recrutando proteínas de ligação à PI3P, como Atg18 (REGGIORI; KLIONSKY, 2013; JIN; KLIONSKY, 2014).

Figura 9. Complexo Atg1 sob condições ricas em nutriente ou ativação de TOR e em *starvation* de nutrientes ou inativação de TOR. O complexo Atg1 é ativado em condições de *starvation* de nutriente sob a modulação de TORC1 o qual leva a hiperfosforilação de Atg13, logo, impede a interação de Atg13 e Atg1. Em condições que Atg13 está desfosforilada, interage com Atg1, assim, podendo induzir a autofagia. O subcomplexo Atg17-Atg31-Atg29 atua como arcabouço para a interação entre Atg13 e Atg1.

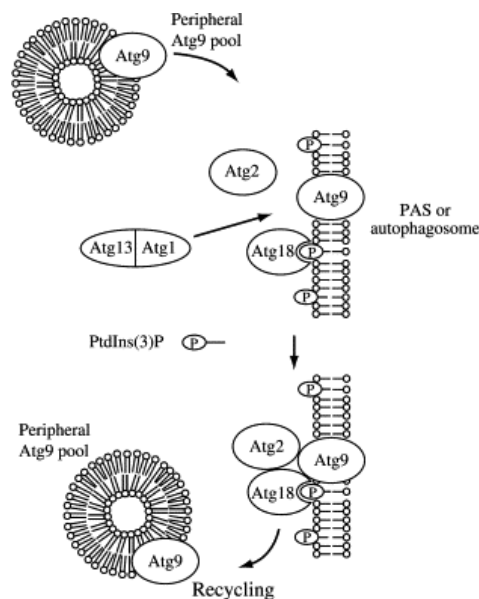


Fonte: CHEN; KLIONSKY, 2011 modificado.

Outro ponto interessante da via é Atg9, uma proteína transmembrana que possui um padrão de localização único. Diferente das outras proteínas Atgs que ou estão difusas no citosol ou estão no PAS, Atg9 está, curiosamente, presente em várias estruturas, uma delas é o PAS, mas os outros locais estão próximos a mitocôndria em forma de aglomerados tubulovesiculares, sendo o movimento entre essas localizações acopladas a vesículas. O movimento de Atg9 da região proximal

a mitocôndria para o PAS depende de Atg11, Atg23, Atg27 e do complexo Arp2/3. O complexo Atg17-Atg31- Atg29 recruta as vesículas de Atg9 para a formação e organização do fagóforo inicial. A função de Atg9 ainda não foi estabelecida, mas propõe-se uma participação na entrega da membrana ao PAS e na direção desse processo (REGGIORI et al., 2004; JIN; KLIONSKY, 2014). O tráfego retrógrado de Atg9 para a região periférica, para sua reciclagem, depende de Atg2-Atg18, e Atg1-Atg13, como no modelo proposto da Figura 9.

Figura 10. Modelo de reciclagem de Atg9 a partir do PAS/Autofagossomo. O complexo Atg1-Atg13 promove a associação de Atg2 e a proteína Atg18 (ligada a PI3P), com Atg9. Uma vez que a função de Atg9 estiver concluída, forma-se esse complexo para recuperação de Atg9.



Fonte: REGGIORI et al., 2004 modificado.

2. OBJETIVOS

Investigar a atuação de eIF5A e de GC7 na autofagia, utilizando como modelo *S. cerevisiae*, visando encontrar sobre quais pontos da via de autofagia há alterações na ausência de eIF5A funcional, tanto em linhagens mutantes quanto no tratamento com GC7.

2.1. Objetivos Específicos

2.1.1. Identificar os genes relacionados à autofagia nos dados de rastreamento em larga escala por RNA-seq

A partir dos dados em larga escala, de expressão gênica relativa, gerados por RNA-seq pode ser avaliado dentre os genes diferencialmente expressos quais estão relacionados à autofagia e averiguar qual o perfil destes genes na linhagem mutante de eIF5A em relação a linhagem selvagem.

2.1.2. Verificar o impacto de GC7 e mutante de eIF5A na autofagia basal e induzida

A medida do fluxo autofágico é ponto importante para entender o mecanismo e a regulação de autofagia. Neste trabalho, avaliaremos o efeito de mutação em eIF5A e do GC7 na autofagia por meio do ensaio denominado GFP-Atg8 (NAIR et al., 2011).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas

A manutenção e cultivo das linhagens de *S. cerevisiae*, bem como a composição e o preparo dos meios de cultura e das soluções, e os protocolos das técnicas que foram utilizados neste trabalho seguirão os procedimentos padrões descritos nos manuais de laboratório: (AUSUBEL et al., 2012).

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

Linhagem	Genótipo ¹	Origem
VZL1417 (BY) (Selvagem - WT)	<i>MATα can1pr::TDH3pr- E2Crimson::HphMx::can1Δ::STE2pr- LEU2. lyp1. his3. leu2. ura3 met15. HYP2::natMX4 [GFP- ATG8/URA3]</i>	Coleção do laboratório
VZL1418 (BY) (Mutante - <i>hyp2-3</i>)	<i>MATα can1pr::TDH3pr- E2Crimson::HphMx::can1Δ::STE2pr- LEU2. lyp1. his3. leu2. ura3 met15 hyp2-3^{C39Y,G118D}::natMX4 [GFP-ATG8/URA3]</i>	Coleção do laboratório
SVL613 (FY) (Selvagem - WT)	<i>MATα leu2 trp1 ura3 his3 dys1::HIS3 [DYS1/TRP1/CEN - pSV520]</i>	Coleção do laboratório
SVL614 (FY) (Mutante - <i>dys1-1</i>)	<i>MATα leu2 trp1 ura3 his3 dys1::HIS3 [dys1^{W75R,T118A,A147T}/TRP1/CEN - pSV730]</i>	Coleção do laboratório

Coleção TAP	<i>MATa can1pr::TDH3pr- E2Crimson::Hph::can1Δ::STE2pr- LEU2** lyp1 his3 leu2 ura3 met15 HYP2::natMX4 ATG1-TAP::HIS3</i>	Coleção do laboratório
-------------	---	---------------------------

Coleção TAP	<i>MATa can1pr::TDH3pr- E2Crimson::Hph::can1Δ::STE2pr- LEU2** lyp1 his3 leu2 ura3 met15 HYP2::natMX4 ATG33-TAP::HIS3</i>	Coleção do laboratório
-------------	--	---------------------------

Fonte: Da Autora

¹*STE2pr-LEU2* corresponde ao gene selvagem *LEU2* de *S. cerevisiae*, controlado pelo promotor do gene *STE2* de *S. cerevisiae*, que é ativo apenas em linhagens do tipo *MATa*; *HphMX* corresponde ao cassete contendo o gene *hph* de *Klebsiella pneumonia*, que confere resistência para higromicina B em *S. cerevisiae*; *NatMX4* corresponde ao cassete contendo o gene *nat1* de *Streptomyces noursei*, que confere resistência para nourseotricina (GOLDSTEIN; MCCUSKER, 1999; COSTANZO; BOONE, 2009; KAINTH et al., 2009).

*[GFP-ATG8/URA3] corresponde ao plasmídeo depositado no *Addgene* identificação 49425; cedido pelo Dr. Agustín Hernandez Lopez.

A linhagem VZL1418 possui a mutação *hyp2-3*, caracterizada anteriormente em nosso grupo de pesquisa, no trabalho de Valentini e colaboradores (VALENTINI et al., 2002). Neste mutante foram feitas duas substituições de resíduos de aminoácidos em eIF5A, uma cisteína por uma tirosina na posição 39, e uma glicina por um aspartato na posição 118. Estas modificações resultaram em uma linhagem mutante sensível a temperatura, em que eIF5A é depletada conforme o aumento da temperatura. Então, é importante ressaltar que o efeito da mutação *hyp2-3* sob a função de eIF5A é gradativo com o aumento da temperatura a partir de 25°C e que mesmo a 25°C são observados efeitos da mutação em comparação com o selvagem (VALENTINI et al., 2002; DIAS et al., 2008) (dados não mostrados). Além disso, o perfil sempre observado, em ensaio de *western blot*, caracterizado pelo trabalho de Valentini e colaboradores (VALENTINI et al., 2002) é diferente da linhagem selvagem, em que a banda fica correspondente de eIF5A fica levemente mais alta.

A linhagem mutante SVL614 foi caracterizada por Galvão et al., (2013), sendo

denominada de *dys1-1*, a qual é possui três substituições de aminoácidos em relação à proteína selvagem Dys1: um triptofano por uma arginina, na posição 75; uma treonina por uma alanina, na posição 118; e, uma alanina por uma treonina, na posição 147. Este mutante mostrou uma forte depleção da proteína Dys1, o que levou a uma alta diminuição da hipusinação. O grupo caracterizou que no mutante *dys1-1*, houve uma diminuição de aproximadamente 60% da hipusinação.

3.2. Concentração de GC7

A concentração de GC7 (Biosearchtech G-1000-100), foi padronizada, em todos os ensaios para 1 mM, baseado nos ensaios desenvolvidos previamente em nosso laboratório (Luís Camacho Iglesias, acesso em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/76982>). Para os ensaios de GC7, foi feito um controle com ácido acético 0,1 mM, que é o veículo no qual GC7 está disperso. Também, ao utilizar GC7, foi adicionado aminoguanidina (AG) 1 mM, a qual previne a degradação de GC7 por amina oxidases.

3.3. Análise dos dados de RNA-seq

O ensaio de RNA-seq foi realizado pelo grupo, com as seguintes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*: SVL613 e SVL614, as quais foram descritas no trabalho de Galvão et al., (2013), e o genótipo apresentado na tabela 1. Os dados brutos foram analisados na dissertação de mestrado de Fernanda Manaia Demarqui, disponível em <http://hdl.handle.net/11449/191901>, em que foi utilizado uma plataforma pública, *Galaxy* (<https://usegalaxy.org/>). A partir das ferramentas disponíveis na plataforma, foi feita a confirmação da qualidade das *reads*, a quantificação, e a contagem das *reads* foi convertida em RPM (*reads per million*). Foram mantidos somente os genes que tiveram a mediana da contagem das *reads* das três replicas maior do que 10 em todas as condições, a partir disso, a tabela de contagens filtrada para esse quesito continha dados de 5.334 genes. Para normalização dos dados e identificação dos genes diferencialmente expressos foi utilizado o pacote *anota2seq* do *software R* (OERTLIN et al., 2017), determinou-se um limite de p-value ajustado de 0,05.

A partir dos dados de RPM, pode-se determinar a taxa do encaminhamento dos transcritos encaminhados para tradução, isto é a *translational efficiency* (TE), da linhagem selvagem e da linhagem mutante, e assim, comparar a TE do mutante em razão a TE do selvagem ($\Delta TE = TE \text{ do mutante} / TE \text{ do selvagem}$). Neste trabalho consideramos que um aumento de transcritos encaminhados para a tradução na linhagem mutante em relação a selvagem é representado por valores de ΔTE acima de 2, ou seja, em que a TE do mutante é duas vezes maior do que a TE do selvagem.

3.4. Ensaio de GFP-Atg8

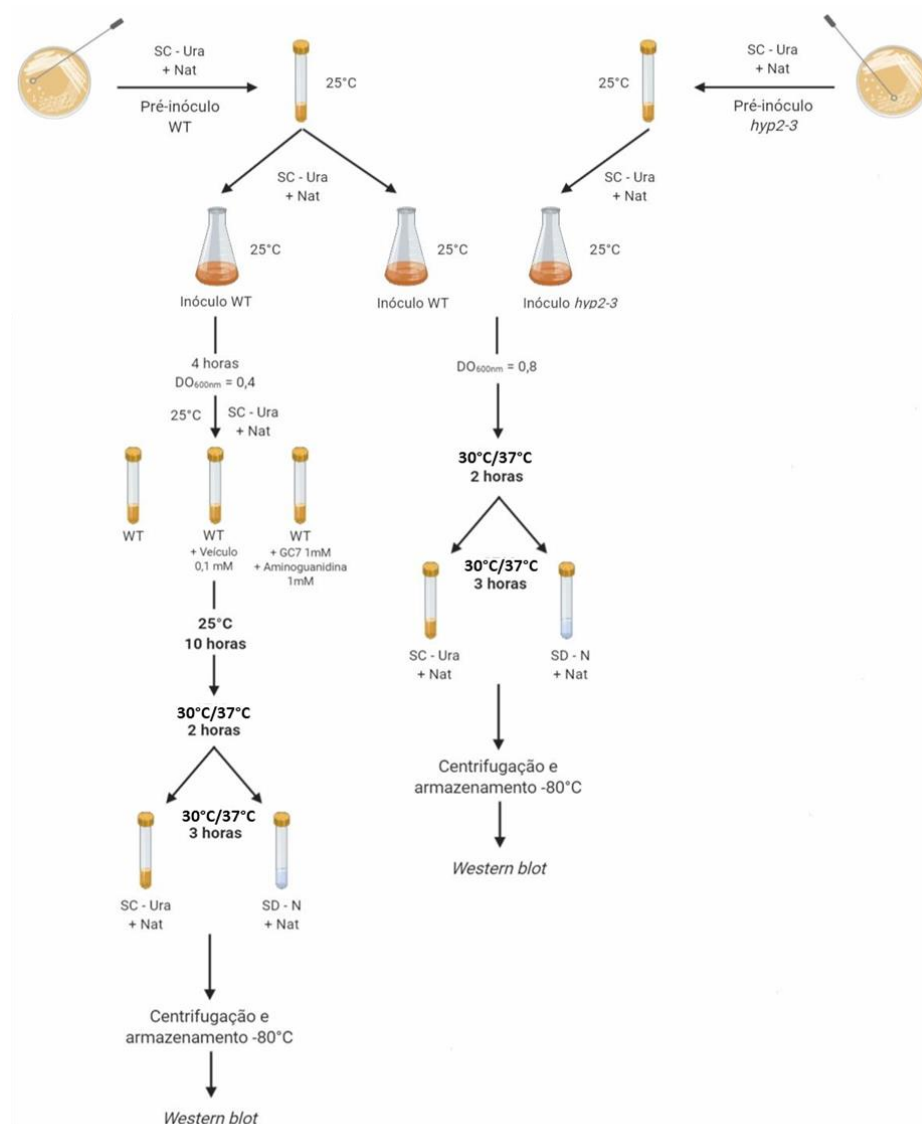
Foi utilizada a linhagem VZL1417 (selvagem – WT) e VZL1418 (mutante de eIF5A – *hyp2-3*) as quais contêm a construção GFP-Atg8, tabela 1. Ainda, a linhagem WT foi utilizada em dois contextos: com e sem tratamento com GC7. Os níveis de GFP no vacúolo foram medidos, como descritos anteriormente, na forma de GFP livre por análise de *western blot*, e correlacioná-lo com a taxa de autofagia. O procedimento foi realizado conforme o esquema da Figura 11, baseado no protocolo de Nair et al. (2011); e realizado, de forma independente, em duas diferentes temperaturas: 30°C e 37°C.

Foi feito pré-inóculo a partir de colônias cultivadas das linhagens: selvagem VZL1417 (WT) e mutante de eIF5A VZL1418 (*hyp2-3*), utilizando meio de cultura sintético (SC) sem uracila e com 100µg/ml de nourseotricina (Meio SC–Ura+Nat), deixando-o crescer em *shaker* de agitação, *overnight*, a 25°C. A partir desses pré-inóculos foram feitos três inóculos, dois de WT e um de *hyp2-3*. Para um dos inóculos de WT, o pré-inóculo foi diluído para uma DO_{600nm} de 0,2, para que após 4 horas de crescimento à 25°C, ao atingir o início da fase logarítmica ($DO_{600nm} \sim 0,4$), fosse dividido em três diferentes tratamentos: WT; WT com o veículo (ácido acético 0,1 mM); WT com o GC7 (GC7 1mM e AG 1mM). As culturas foram crescidas durante 10 horas a 25°C mais 2 horas a 30°C/e 37°C, totalizando 12 horas de crescimento, que são necessárias para conseguir observar o fenótipo de inibição de hipusinação, já que o tempo de meia vida de Dys1 são 10,9 horas e eIF5A são 9,1 horas (CHRISTIANO et al., 2014).

Após as 12 horas, de cada inóculo foi retirado um volume celular

correspondente a uma quantidade de células de DO_{600nm} igual a 1,5. Este volume foi centrifugado (4000 rpm, 25°C, Eppendorf Centrifuge 5804R), o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado em água Milli-Q. As células foram ressuspensas em dois diferentes meios (pré-aquecidos a 30°C/e 37°C): o meio seletivo SC-Ura + Nat e o meio cultura para indução de autofagia por *starvation* de nitrogênio - composto de 0,17% de YNB (yeast nitrogen base) sem aminoácidos e sulfato de amônio e 2% glicose – mais nourseotricina (meio SD-N + Nat). Foram crescidas por mais 3 horas, a 30°C/e 37°C, para indução de autofagia. Ao final, foram centrifugadas (4000 rpm, 4°C, Eppendorf Centrifuge 5804R) e os *pellets* foram armazenados à -80°C para posterior análise por *western blot*.

Figura 11. Esquema dos procedimentos realizados no ensaio de GFP-Atg8. Os procedimentos esquematizados foram realizados três vezes a fim de obter-se uma triplicata biológica para as análises estatísticas.



Fonte: Da Autora.

De forma semelhante foram realizados os procedimentos referentes a linhagem mutante *hyp2-3*. Neste caso, realizou-se a mudança de temperatura para 30°C/e 37°C ao final da fase logarítmica (DO_{600nm} ~ 0,8), para que houvesse a depleção de eIF5A, deixando em crescimento por 2 horas. Iniciou-se a indução de autofagia por meio de *starvation* de nitrogênio da mesma forma descrita anteriormente e esquematizada na Figura 10.

3.5. Lise celular mecânica

As células coletadas por centrifugação e armazenadas a -80°C foram lisadas

mecanicamente por agitação em *vortex*, durante 10 minutos, com a adição de tampão de lise (Tris HCl pH 7,5 20 mM; DTT 2 mM; PMSF 2 mM; coquetel de inibidor de protease plac; EDTA 2mM) e de perolas de vidro.

O extrato celular foi clarificado por centrifugação (10.600 xg, a 4°C, 15 minutos) e a concentração de proteína total foi determinada pelo método Lowry.

3.6. Quantificação pelo método de Lowry

A solução de BSA (*Bovine Serum Albumin*) foi preparada em uma concentração de 3 mg/mL. Para a curva padrão, foram feitas 4 diluições seriadas da solução de BSA, em uma razão 1:1 (100 µL de solução de BSA : 100 µL de água Milli-Q). Para cada ponto de diluição da curva foi preparada as reações seguindo as recomendações *kit* utilizado: *Protein Assay* Bio-Rad, *Catalog number Reagent A*: 500-0113; e *Reagent B*: 500-0114. As leituras foram realizadas em comprimento de onda de 280 nm. Para as amostras foi feita uma diluição 10x, e nesse caso o branco foi o tampão de lise.

3.7. Western blot

As amostras proteicas foram separadas por eletroforese em gel de poli(acrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) e transferidas para uma membrana de nitrocelulose (através de transferência semi-seca). A membrana foi bloqueada, sob agitação, a temperatura ambiente por 40 minutos em tampão PBST (PBS 1X, 0.25% Tween-20) contendo 10% de leite desnatado. Seguindo para o protocolo padrão de *Western blot*, a membrana foi incubada com uma diluição adequada de anticorpo primário em PBST 1X, por 16 horas a 4°C, sob agitação. Após esse período, as membranas foram lavadas quatro vezes com PBST 1X, por 5 minutos em cada lavagem. Então, foram incubadas em uma diluição de anticorpo secundário em PBST 1X, por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram lavadas novamente quatro vezes com PBST 1X, por 5 minutos. Ao final, foram tratadas com reagentes quimioluminescentes (*kit Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* da GE Healthcare) por 2 minutos e reveladas utilizando o equipamento *C-Digit Blot Scanner* (LI-COR 3600).

4. Resultados e Discussão

4.1. Avaliação dos motifs de stalling ribossomal descritos na literatura para a proteína Atg3

Como foi citado, no trabalho de Lubas et al. (2018) identificaram, em células de humano, a presença de *motifs*, na proteína Atg3, que foram classificados como *motifs* que requerem eIF5A para serem traduzidos, são eles: PPPP e DDG. Entretanto, o grupo concluiu que o *motif* determinante para o recrutamento de eIF5A e, portanto, a tradução de Atg3, foi o DDG. No entanto, os *motifs* PPPP aparecem somente na Atg3 de humano, e DDG aparece na Atg3 de humano, e na sequência de Atg3 de *Drosophila melanogaster*. Em outros organismos, como em *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* e *Caenorhabditis elegans*, especificamente, estes *motifs* não estão presentes na proteína Atg3 (Figura 12). Neste caso, o recrutamento de eIF5A para a tradução de Atg3 seria diferente do que ocorre para as proteínas forminas, descrita na literatura (MUÑOZ-SORIANO et al., 2017), em que os *motifs* que requerem eIF5A conservaram-se ao longo da evolução; Atg3 não possui um padrão de *motif* conservado durante a evolução, desta forma, seria esperado que a necessidade de eIF5A para a eficiência da tradução pode variar entre diferentes organismos. No caso das forminas existe uma presença muito frequente de vários *motifs* de prolinas subsequentes em todos seus ortólogos (LI et al., 2014; NGUYEN et al., 2015; MUÑOZ-SORIANO et al., 2017).

Este é um importante exemplo de que apenas a presença de um *motif* de possível *stalling* do ribossomo não é suficiente para prever sua dependência de eIF5A para tradução. Isto é, os trabalhos publicados que identificaram *motifs* que frequentemente requerem eIF5A para sua tradução (SAINI et al., 2009; PELECHANO; ALEPUZ, 2017) não determinaram se todos estes *motifs* requerem eIF5A para a tradução em todas as proteínas/organismos em que aparecem. Portanto, outros estudos são necessários para relacionar a ocorrência desses *motifs* e quais contextos induzem maior ou menor dependência de eIF5A. Assim como tem sido estudado para EF-P, em bactérias, em que foi proposto que resíduos de aminoácidos presentes antes e após os *motifs* de *stalling*, assim como a posição dos *motifs* em relação à extensão do mRNA, entre outros fatores, determinam a dependência de um polipeptídeo por EF-P, durante sua tradução (LASSAK;

WILSON; JUNG, 2016; WITZKY et al., 2018). O posicionamento do *motif* na ORF, por exemplo, na Atg3 de humano, nota-se que o *motif* que foi determinante para o *stalling* foi o DDG o qual se encontra no início da sequência de aminoácidos, e o outro *motif* – que o grupo Lubas et al., (2018) analisou – PPPP encontra-se no final da sequência de aminoácidos (Figura 12).

Figura 12. Alinhamento múltiplo de sequências da proteína Atg3. Alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos da proteína Atg3 de *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* e *Homo sapiens*. Os *motifs* que foram descritos, por SCHULLER et al. (2017), como dependentes de eIF5A (em *S. cerevisiae*) estão destacados.

que poderiam ocorrer nesta via metabólica em linhagens mutantes da via de hipusinação. Os dados utilizados aqui são de perfil transcricional e traducional do mutante *dys1-1*, e de perfil transcricional do mutante *hyp2-3* (Natália Moreira Barbosa, disponível em <http://hdl.handle.net/11449/183579>), o mesmo mutante que foi utilizado no ensaio GFP-Atg8 apresentado a seguir. Os dados transcricionais foram obtidos por sequenciamento de RNA mensageiro (mRNA), e os traducionais foram obtidos por perfil polissomal e posterior sequenciamento. É importante ressaltar que os dados traducionais tratam-se de um rastreamento de perfil polissomal, logo um aumento na expressão de um gene pode não significar que tal gene encontra-se mais traduzido, podendo ser um indicativo de uma parada ribossomal.

No rastreamento da linhagem *dys1-1*. As proteínas Pph22 (somente no perfil traducional), Tpk1 e Tpk2 (transcricional e traducional) estão diminuídas, sendo que em condições normais de nutrientes atuam como inibidores do complexo Atg1 e do fator de transcrição Ume6, inibidor de Atg8. Entretanto, quanto a Ume6 encontra-se diminuído no perfil transcricional, enquanto que Atg8 está aumentada em ambos os perfis. Gcn4, um fator transcricional positivo para a expressão gênica de proteínas autofágicas, está aumentado no perfil traducional e transcricional. Essas evidências poderiam levar-nos a pensar que talvez houvesse uma regulação positiva sob as proteínas relacionadas à autofagia nesse mutante. Sendo alvos interessantes para se aprofundar.

Foram também analisados os dados transcricionais de RNA-seq da linhagem mutante de eIF5A *hyp2-3*. Ao contrário do mutante *dys1-1*, tem-se que inibidores do complexo Atg1 estão aumentados: Pph21, Pph22 e Ume6. Apesar de Ume6 estar aumentado neste perfil, um aumento na expressão de Atg8 é observado, indicando que pode haver algum problema na tradução de Ume6, já que esta não está inibindo a transcrição de Atg8 e, como indicado na tabela 2, Ume6 possui *motifs* de parada ribossomal demonstrados por Schuller et al. (2017) por recrutarem eIF5A durante sua tradução (Tabela 2). Mas, o mais interessante a ser destacado aqui é que há diferenças nos perfis dos diferentes mutantes, corroborado pelo fato de que mesmo sendo mutantes relacionados à mesma via, podem possuir alguns efeitos celulares diferentes. Uma vez que, por exemplo, no mutante *dys1-1* pode haver um

acúmulo de poliaminas (que será explicado no próximo tópico) o qual não é encontrado no mutante *hyp2-3*, pois neste, a espermidina está sendo utilizada pela enzima Dys1, então, possivelmente não há acúmulo de poliaminas. Neste caso, o defeito da via se dá na proteína eIF5A que por não ser estável é degradada.

Tabela 2. Proteínas relacionadas à autofagia, mencionadas neste trabalho, que apresentam ou não *motifs* de paradas ribossomais confirmadas em levedura. Foi realizada uma reanálise dos dados de linhagem selvagem e mutante eIF5Ad (SCHULLER et al., 2017) obtidos no GEO (GSE49704 – banco de dados disponível no NCBI) afim de verificar quais ORFs do genoma de *S. cerevisiae* possuem parada ribossomal de acordo com o que foi descrito nesta referência.

Proteína	ID	Parada Ribossomal
Atg14	YBR128C	
Atg12	YBR217W	Confirmada
Atg15	YCR068W	
Atg9	YDL149W	Confirmada
Atg31	YDR022C	Confirmada
Ume6	YDR207C	Confirmada
Gcn4	YEL009C	Confirmada
Atg1	YGL180W	Confirmada
Slr2	YHR030C	Confirmada
Atg7	YHR171W	
Sch9	YHR205W	Confirmada
Tpk1	YJL164C	Confirmada
Arp3	YJR065C	Confirmada
Msn4	YKL062W	Confirmada
Atg17	YLR423C	Confirmada
Msn2	YMR037C	Confirmada
Atg16	YMR159C	
Lst8	YNL006W	
Atg4	YNL223W	
Atg2	YNL242W	Confirmada
Atg3	YNR007C	Confirmada
Atg6	YPL120W	Confirmada
Tpk2	YPL203W	Confirmada
Pho23	YNL097C-B	
Gcn2	YDR283C	
eIF2 α	YJR007W	

Rpd3	YNL330C	Confirmada
Tpk3	YKL166C	
Ras2	YNL098C	
Ras1	YOR101W	
Rim15	YFL033C	
Raptor	YHR186C	
Atg8	YBL078C	
Tor2	YKL203C	Confirmada
Tor1	YJR066W	
Atg13	YPR185W	
Atg29	YPL166W	Confirmada
Snf1	YDR477W	
Tos3	YGL179C	
Sak1	YER129W	
Tap42	YMR028W	Confirmada
Tip41	YPR040W	Confirmada
Pph21	YDL134C	Confirmada
Pph22	YDL188C	Confirmada
Pho85	YPL031C	Confirmada
Pcl5	YHR071W	
Atg23	YLR431C	
Atg27	YJL178C	
Atg11	YPR049C	
Arp2	YDL029W	
Arp3	YJR065C	
Atg18	YFR021W	
Atg38	YLR211C	
Vps15	YBR097W	
Vps34	YLR240W	
Atg5	YPL149W	
Atg10	YLL042C	

4.3. Efeitos da inibição da hipusinação no metabolismo celular

Uma vez que essa modificação envolve uma via biossintética importante para diversas funções celulares, que é a via de poliaminas, quais possíveis impactos na célula ao interromper a conexão entre a via de poliaminas e hipusinação. Referente a isso, em 2018, Ivanov e colaboradores observaram que, em células de mamíferos, a redução de hipusinação mimetiza um efeito de acúmulo de poliaminas (IVANOV et al., 2018)

No caso do mutante da desoxi-hipusina sintase, *dys1-1*, há uma ineficiência

da via, devido a redução dos níveis proteicos de Dys1, leva a uma diminuição da hipusinação, por consequência, semelhantemente ao trabalho de Ivanov e colaboradores (2018) pode haver um acúmulo de poliaminas. Muitos aspectos a respeito de poliaminas não são claros, como por exemplo, se elas desencadeiam ou elas são a consequência de algumas patologias. Entretanto, o que alguns estudos têm mostrado é que em certas situações, entre elas a administração exógena, as poliaminas induzem autofagia. A indução da autofagia traz benefícios celulares: tais como, a proteção celular em situações de estresse e o favorecimento da longevidade celular (EISENBERG et al., 2009; GUPTA et al., 2013).

Desta forma, assim como a administração de espermidina é capaz de induzir autofagia, a administração de GC7 possivelmente tem este mesmo efeito, aqui considerado como um efeito secundário de GC7. Sendo assim, a presença de GC7 na célula leva a três cenários celulares: os efeitos na tradução de proteínas, devido a inibição da hipusinação; o acúmulo de poliaminas na célula devido ao efeito da não hipusinação; e a presença de um composto análogo a espermidina o qual pode atuar de forma secundária na célula. Diante dos possíveis cenários e os dados da literatura, os quais mostram fortemente uma relação de acúmulo de poliaminas e autofagia, possivelmente o tratamento com GC7 induz a autofagia. Sendo assim, buscou-se averiguar este feito.

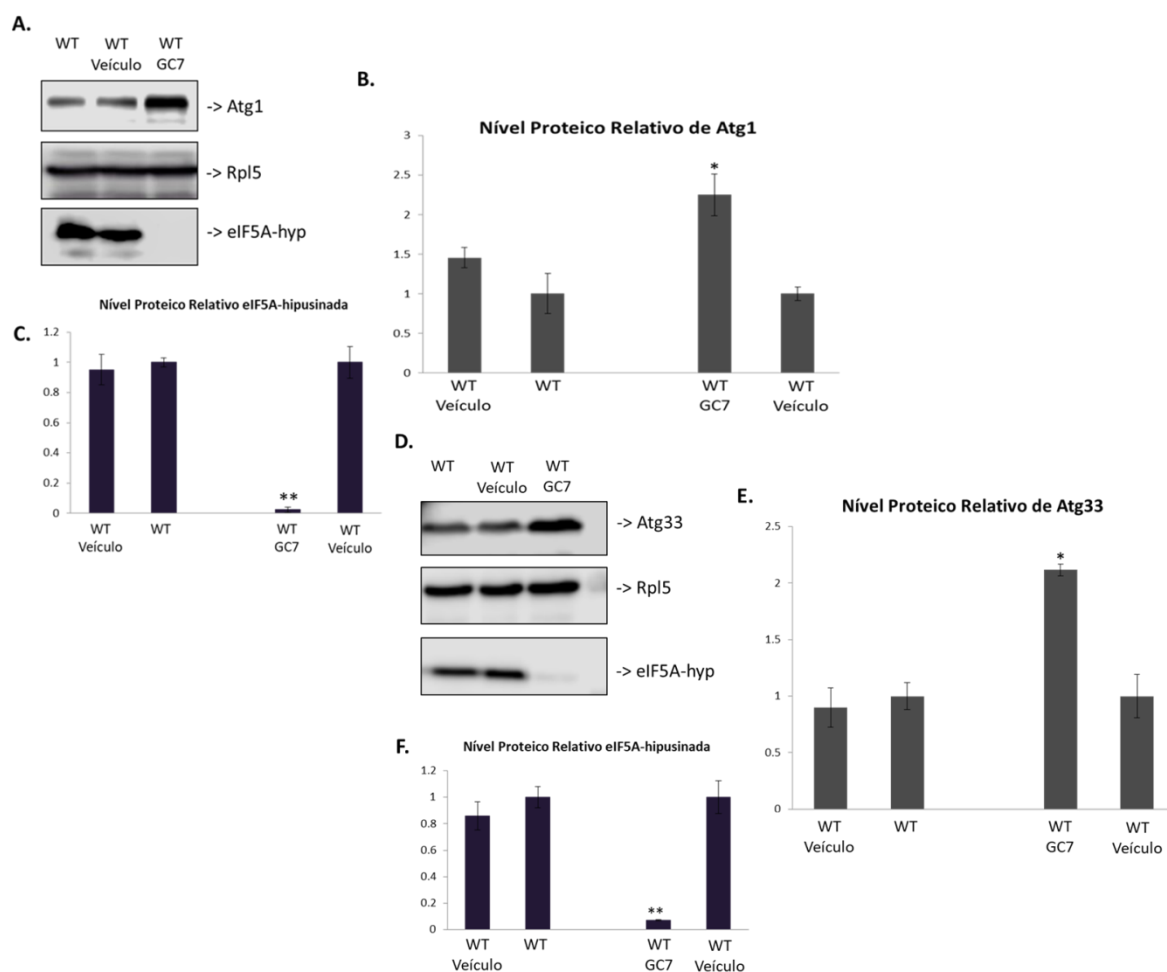
Dentre as linhagens disponíveis em nosso laboratório, foi possível avaliar, por análises de *western blot*, o efeito sob duas proteínas importantes para autofagia: a proteína Atg1 e Atg33 (figura 13). A proteína Atg1 faz parte do complexo Atg1 que tem um papel central na regulação e sinalização para a indução da formação do autofagossomo, atuando, por exemplo, na macroautofagia e mitofagia. Como foi visto, Atg1 está aumentada nos dados de rastreamento em larga escala, tanto no perfil transcricional quanto no polissomal para o mutante *dys1-1*, o qual possui um contexto celular de aumento de poliaminas o que se assemelha ao tratamento com GC7. Ao analisarmos o efeito de GC7 por *western blot*, verificamos um aumento do nível proteico (figura 13-A e B). Desta maneira, sugerindo uma indução de autofagia.

A proteína Atg33 é uma proteína específica da mitofagia, a qual é interessante ser analisada uma vez que dados do grupo mostram que a mitocôndria

é bastante afetada nas linhagens mutantes de eIF5A (Fernanda Manaia Demarqui, acesso em: <http://hdl.handle.net/11449/191901>; Natália Moreira Barbosa, acesso em: <http://hdl.handle.net/11449/183579>). Entretanto, interessante, o trabalho de Melis et al. (2017) mostrou que o tratamento com GC7 atenua o quadro de anóxia celular, preservando as células da morte celular induzidas por anóxicos. Como observamos no *western blot* da figura 13-D, o nível da proteína Atg33, que é essencial para a mitofagia, está aumentado no tratamento com GC7, indicando a possibilidade de que a célula responde a um cenário celular de inibição de hipusinação, que tem se mostrado prejudicial à mitocôndria, e a presença de GC7 pode ter como um efeito secundário, induzindo mitofagia a fim de manter a viabilidade celular.

Figura 13. Análise dos níveis proteicos de Atg1 e Atg33 com tratamento de GC7. (A) *Western blot* da linhagem selvagem da coleção TAP para identificação do nível proteico de de Atg1 com o tratamento com GC7 **(B)** Quantificação relativa do nível proteico de Atg1 **(C)** Quantificação do nível proteico relativo de eIF5A-hipusinada. **(D)** *Western blot* da linhagem selvagem da coleção TAP para identificação do nível proteico de Atg33 com o tratamento com GC7 **(E)** Quantificação relativa do nível proteico de Atg33 **(F)** Quantificação do nível proteico relativo de eIF5A-hipusinada. **(B-C e E-F)** Para todas as quantificações de bandas do *western blot* utilizou-se com o software *image-J* e o nível de intensidade de cada proteína foi normalizado pelo nível de Rpl5 (normalizador) e plotados como unidades relativas. Os valores são mostrados como média $\pm$ SEM, n=2. [*] p-value<0,05 [**] p-value<0,01 [***] p-value<0,001 para *t-student test*. WT: Selvagem; AA: Selvagem com 0,1mM Ácido Acético (Veículo de GC7); GC7: WT com 1mM de GC7 e 1mM de Aminoguanidina. Extratos proteicos (25 μ g). Os anticorpos utilizados foram: anti-Rpl5 (normalizador; diluição de 1:20.000; 34 kDa); anti-TAP (diluição de 1:4.000; 21 kDa; a proteína Atg33 está fusionada a TAP, assim o tamanho no gel é 41,4 kDa; e para Atg1, também fusionada é 123 kDa); anti-hipusina (diluição de 1:3.000; 17 kDa); o anticorpo

secundário utilizado foi anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (1:20.000).



De fato, quando analisamos a *translational efficiency* dos dados do rastreamento em larga escala de *dys1-1*, não se observa muita variação nos valores de ΔTE dentre os grupos de genes das proteínas relacionadas à autofagia e Atgs, em comparação a eficiência de tradução de todos os genes de *S. cerevisiae*, o que está indicado na tabela 3. Reforçando, assim, a hipótese de que neste mutante também haveria um acúmulo de poliaminas e que devido a isto a autofagia não está sendo prejudicada.

Tabela 3. *Translational efficiency* do mutante *dys1-1* em relação à linhagem selvagem.

ΔTE	>2.0 (%)	<2.0 (%)
<i>Todas Autofagias</i>	17	83
<i>Macroautofagia</i>	17	83
<i>Mitofagia</i>	13	88
<i>Reticulofagia</i>	21	79
<i>Autofagia do Núcleo</i>	17	83
<i>Ribofagia</i>	14	86
<i>Atgs</i>	21	79
<i>Todos os genes</i>	19	81

4.4. Efeito de eIF5A e GC7 em autofagia analisando o ensaio de GFP-Atg8

Como já explicado anteriormente, utilizamos o repórter GFP-Atg8 para medida da taxa de autofagia. Então, uma vez que Atg8 é convertida na forma lipídica, Atg8-PE compõe a membrana do autofagossomo que, por fim, funde-se ao vacúolo. Após a fusão, Atg8 é rapidamente degradada, mas a porção GFP da fusão é mais resistente à hidrólise vacuolar. Então, GFP livre pode ser quantificado como uma medida do fluxo macroautofágico (NAIR et al., 2011; ARAKI; KIRA; NODA, 2017). Uma observação importante sobre os controles é que não houve diferença significativa entre o WT e WT + ácido acético 0,1 mM. Esta concentração é bastante baixa e não interfere na autofagia, o que era esperado, uma vez que na literatura há estudos que indicam não haver interferência na indução de autofagia em células de *S. cerevisiae* tratadas com 180 mM de ácido acético (PEREIRA et al., 2010).

Como podemos verificar na Figura 14 (A e B), nota-se que não há uma diferença na indução de autofagia da linhagem tratada com GC7 1 mM em comparação ao selvagem. Enquanto que na linhagem mutante *hyp2-3* verifica-se uma diminuição significativa da autofagia. Entretanto, esta diminuição em *hyp2-3* não se dá pela diminuição dos níveis totais de Atg8. Segundo os dados do laboratório de RNA-seq (dados não mostrados), neste mutante a 30°C, Atg8 está aumentado transcricionalmente; no *western blot*, os níveis proteicos totais de Atg8 não apresentam diferença significativa do mutante em comparação ao selvagem, ou

seja, não está havendo uma regulação negativa sobre a produção de Atg8. Por outro lado, este não está sendo encaminhado para autofagia por algum outro problema na via, para a linhagem mutante.

Tal resultado mostra que GC7 apresenta um efeito secundário na autofagia, uma vez que sua ação tem um efeito independente de eIF5A, assim como foi visto por Oliverio et al. (2014).

Ao realizar esta mesma análise em uma temperatura restritiva (figura 15) para o mutante *hyp2-3*, nota-se que se agrava a não indução de autofagia para esta linhagem. Além disso, diferentemente da análise a 30°C, para a linhagem selvagem tratada com GC7, a 37°C, nota-se uma diminuição da indução de autofagia, provavelmente devido ao quadro de estresse de temperatura, a deficiência de hipusinação e função de eIF5A torna-se um agravante. Mesmo assim, em comparação ao mutante, com GC7 não ocorre uma diminuição drástica, pois, possivelmente, o efeito de GC7 - independente de eIF5A - auxiliou na indução da autofagia.

Figura 14. Efeito do mutante *hyp2-3* e de GC7 na autofagia basal por análises de Western blot utilizando como repórter GFP-Atg8, a uma temperatura de 30°C. (A) Western blot: Extratos proteicos (10 µg). Os anticorpos utilizados foram: anti-eEF2 (normalizador; diluição de 1:20.000; 94 kDa); anti-GFP (diluição de 1:10.000; 26,89 kDa); anti-hipusina (diluição de 1:3.000; 17,1 kDa); o anticorpo secundário utilizado foi anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (1:20.000). A indução de autofagia foi por *starvation* de nitrogênio, durante 3 horas a 30°C. As linhagens estão apresentadas no *western blot*, como WT (selvagem); WT veículo (WT com 0,1 mM de ácido acético – veículo de GC7); WT GC7 (1mM de GC7 e 1mM de aminoguanidina); e *hyp2-3* (mutante de eIF5A). **(B) Taxa de autofagia relativa:** Quantificação relativa de GFP livre em relação ao total (a presença de GFP livre indica que está ocorrendo autofagia basal). **(C) Quantificação do nível proteico total da proteína Atg8:** A quantidade de proteína Atg8 total é referente a quantificação da soma de GFP-Atg8 e GFP livre na célula, normalizadas por eEF2. **(D) Quantificação do nível proteico relativo de eIF5A-**

hipusinada no ensaio de GFP-Atg8 à 30°C, para as amostras em que foram induzidas *starvation* de nitrogênio. **(B-D)**: A quantificação das bandas foi realizada com o software *image-J* e o nível de intensidade de cada proteína foi normalizado pelo nível de eEF2 (controle de carregamento) e plotados como unidades relativas. Os valores são mostrados como média $\pm$ SEM, n=3. [*] p-value<0,05 [**] p-value<0,01 [***] p-value<0,001 para *t-student test*.

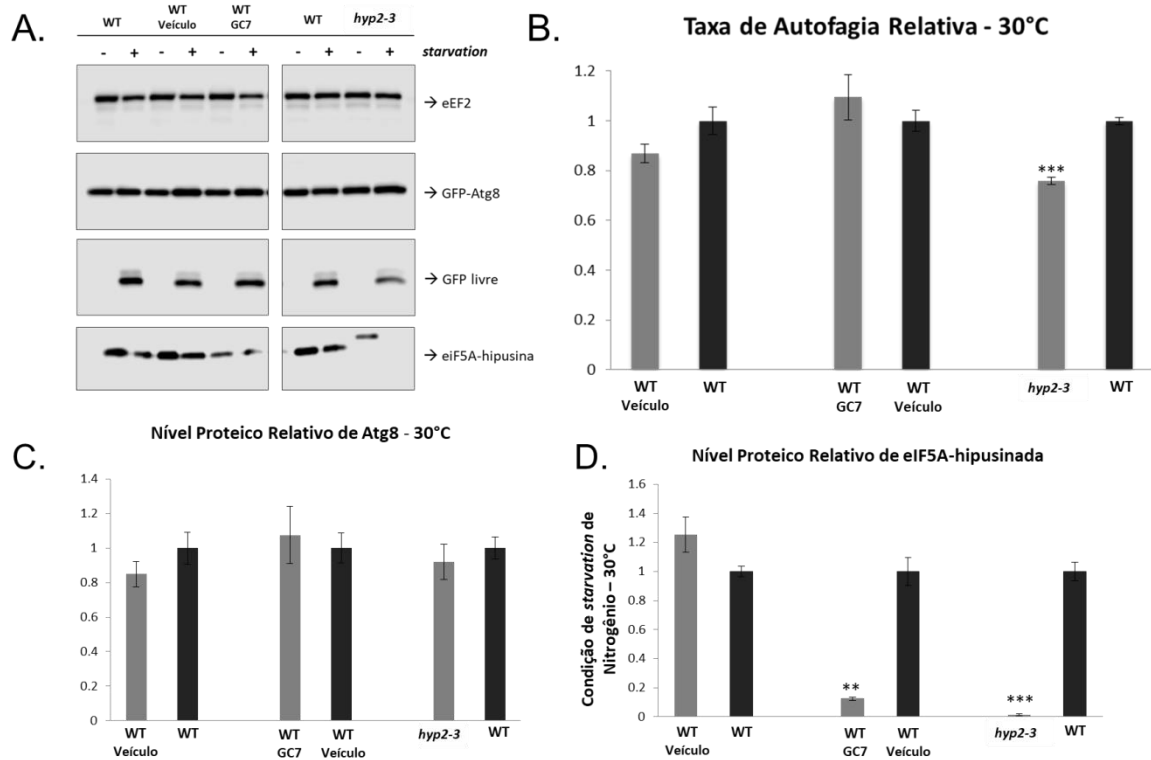
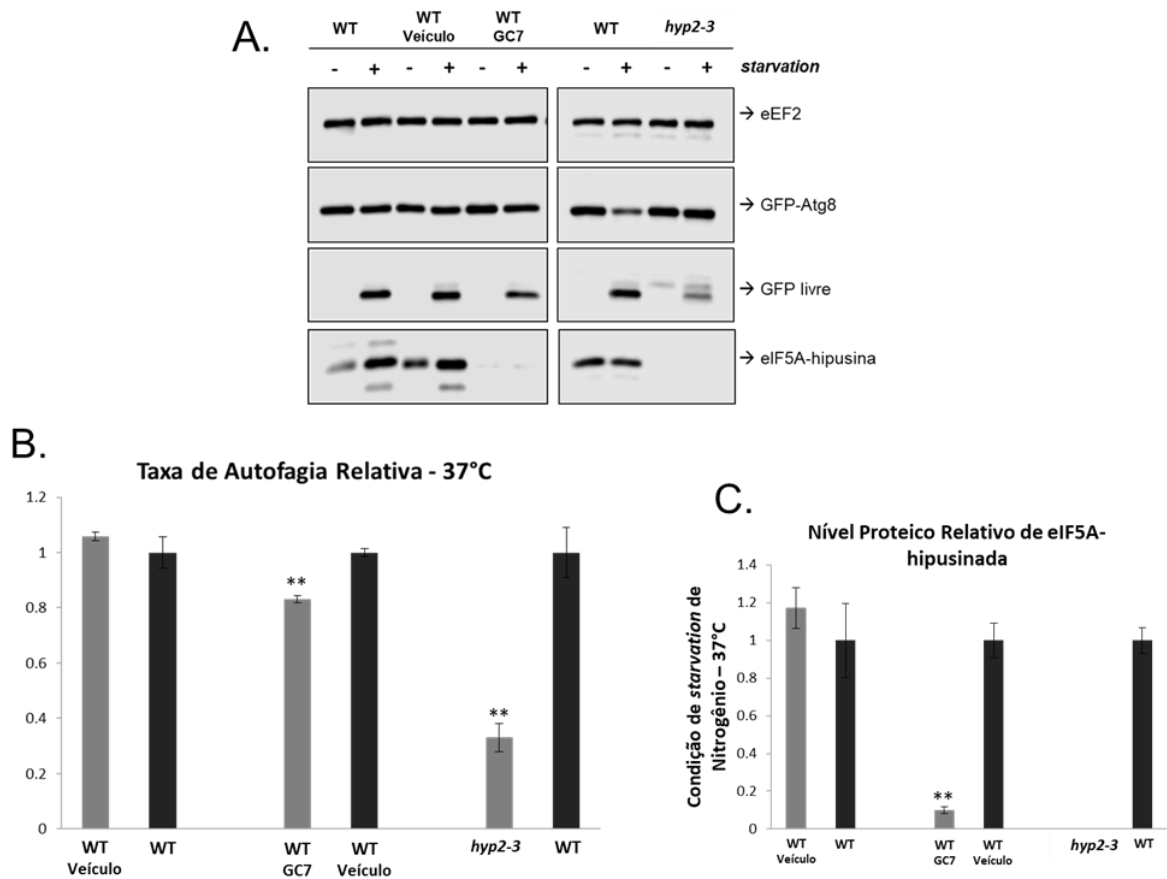


Figura 15. Efeito do mutante *hyp2-3* e de GC7 na autofagia basal por análises de Western blot utilizando como repórter GFP-Atg8, a uma temperatura de 37°C. (A) Western blot: Extratos proteicos (10 µg). Os anticorpos utilizados foram: anti-eEF2 (normalizador; diluição de 1:20.000; 94 kDa); anti-GFP (diluição de 1:10.000; 26,89 kDa); anti-hipusina (diluição de 1:3.000; 17,1 kDa); o anticorpo secundário utilizado foi anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (1:20.000). A indução de autofagia foi por *starvation* de nitrogênio, durante 3 horas a 37°C. As linhagens estão apresentadas no *western blot*, como WT (selvagem);

WT veículo (WT com 0,1 mM de ácido acético – veículo de GC7); WT GC7 (1mM de GC7 e 1mM de aminoguanidina); e *hyp2-3* (mutante de eIF5A). **(B)** Taxa de autofagia relativa: Quantificação relativa de GFP livre em relação ao total (a presença de GFP livre indica que está ocorrendo autofagia basal). **(C)** Quantificação do nível proteico relativo de eIF5A-hipusina no ensaio de GFP-Atg8 à 30°C, para as amostras em que foram induzidas *starvation* de nitrogênio. **(B e C)** A quantificação das bandas foi realizada com o software *image-J* e o nível de intensidade de cada proteína foi normalizado pelo nível de eEF2 (controle de carregamento) e plotados como unidades relativas. Os valores são mostrados como média $\pm$ SEM, n=3. [*] p-value<0,05 [**] p-value<0,01 [***] p-value<0,001 para *t- student test*.



5. CONCLUSÕES

Nota-se que a via de autofagia possui muitos pontos de regulação específicos, e que a modulação da formação do autofagossomo é muito importante para o estabelecimento da via. Assim, ao analisarmos os dados dos rastreamentos em larga escala de mutantes de eIF5A, pode-se entender que a desregulação da via ocorre por um efeito global e não específico a apenas um ponto regulatório, devido a importância de eIF5A na célula. O ensaio de GFP-Atg8 a 37°C realizado permite observar que a ausência de eIF5A funcional, seja pela inibição de eIF5A por GC7 ou uma linhagem mutante, prejudica a indução de autofagia. Entretanto, a partir deste ensaio realizado a 30°C e somado com as análises de *western blot* de Atg1 e Atg33, tem-se que o tratamento com GC7 pode desencadear um efeito secundário de GC7, mimetizando um acúmulo de poliaminas na célula e logo, uma indução de autofagia. Assim como para o mutante *dys1-1*, os perfis dos rastreamentos e análise de *translational efficiency* traz a hipótese, descrita por Ivanov et al. (2018), de que há um acúmulo de poliaminas neste mutante, diferente do mutante *hyp2-3*, e assim, é possível que neste caso possa haver indução de autofagia.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAKI, Y.; KIRA, S.; NODA, T. Quantitative Assay of Macroautophagy Using Pho8 Δ 60 Assay and GFP-Cleavage Assay in Yeast. **Methods in Enzymology**, v. 588, p. 307–321, 2017. <https://doi.org/10.1016/BS.MIE.2016.10.027>
- AUSUBEL, F. M. et al. Preface. **Current Protocols in Molecular Biology**, v. 98, n. 1, p. iii–v, 2012. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mbprefs98>
- CARLSSON, S. R.; SIMONSEN, A. Membrane dynamics in autophagosome biogenesis. **Journal of Cell Science**, v. 128, n. 2, p. 193–205, 2015. <https://doi.org/10.1242/jcs.141036>
- CHAWLA, B. et al. Identification and Characterization of a Novel Deoxyhypusine Synthase in *Leishmania donovani*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 1, p. 453–463, 2010. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.048850>
- CHEN, Y.; KLIONSKY, D. J. **The regulation of autophagy - Unanswered questions** **Journal of Cell Science**, 2011. . <https://doi.org/10.1242/jcs.064576>
- CHERKASOVA, V. A.; HINNEBUSCH, A. G. Translational control by TOR and TAP42 through dephosphorylation of eIF2 α kinase GCN2. **Genes and Development**, v. 17, n. 7, p. 859–872, 2003. <https://doi.org/10.1101/gad.1069003>
- CHRISTIANO, R. et al. Global Proteome Turnover Analyses of the Yeasts *S.cerevisiae* and *S.pombe*. **Cell Reports**, v. 9, n. 5, p. 1959–1965, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.10.065>
- COSTANZO, M.; BOONE, C. SGAM: an array-based approach for high-resolution genetic mapping in *Saccharomyces cerevisiae*. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 548, p. 37–53, 2009. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-540-4_3
- COUSO, I. et al. Phosphorus Availability Regulates TORC1 Signaling via LST8 in *Chlamydomonas*. **Plant Cell Advance Publication. Published on**, 2019. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00179>
- DE ALMEIDA, O. P. 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. **Current pharmaceutical design**, v. 20, n. 2, p. 284–92, 2014.

DELORME-AXFORD, E. et al. The yeast *Saccharomyces cerevisiae*: An overview of methods to study autophagy progression. **Methods**, v. 75, p. 3–12, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.12.008>

DEVER, T. E.; GUTIERREZ, E.; SHIN, B.-S. The hypusine-containing translation factor eIF5A. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 49, n. 5, p. 413–425, 2014. <https://doi.org/10.3109/10409238.2014.939608>

DEVER, T. E.; IVANOV, I. P. Roles of polyamines in translation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 48, p. 18719–18729, 2018. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.003338>

DEVER, T. E.; KINZY, T. G.; PAVITT, G. D. Mechanism and Regulation of Protein Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 203, n. 1, p. 65–107, 2016. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.186221>

DIAS, C. A. O. 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 Journal**, v. 275, n. 8, p. 1874–1888, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06345.x>

EISENBERG, T. et al. Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. **Nature Cell Biology**, v. 11, n. 11, p. 1305–1314, 2009. <https://doi.org/10.1038/ncb1975>

FANG, L. et al. GC7 enhances cisplatin sensitivity via STAT3 signaling pathway inhibition and eIF5A2 inactivation in mesenchymal phenotype oral cancer cells. **Oncology Reports**, v. 39, n. 3, p. 1283–1291, 2018. <https://doi.org/10.3892/or.2017.6161>

FRANKEL, L. B.; LUBAS, M.; LUND, A. H. Emerging connections between RNA and autophagy. **Autophagy**, v. 13, n. 1, p. 3–23, 2017. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1222992>

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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060140>

GOLDSTEIN, A. L.; MCCUSKER, J. H. Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 15, n. 14, p. 1541–1553, 1999. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199910\)15:14<1541::AID-YEA476>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199910)15:14<1541::AID-YEA476>3.0.CO;2-K)

GREGIO, A. P. B. et al. eIF5A has a function in the elongation step of translation in yeast.

Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 380, n. 4, p. 785–790, 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.01.148>

GUPTA, V. K. et al. Restoring polyamines protects from age-induced memory impairment in an autophagy-dependent manner. **Nature Neuroscience**, v. 16, n. 10, p. 1453–1460, 2013.
<https://doi.org/10.1038/nn.3512>

GUTIERREZ, E. et al. eIF5A Promotes Translation of Polyproline Motifs. **Molecular Cell**, v. 51, n. 1, p. 35–45, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.04.021>

HARA, K. et al. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. **Cell**, v. 110, n. 2, p. 177–189, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00833-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00833-4)

IVANOV, I. P. et al. Polyamine Control of Translation Elongation Regulates Start Site Selection on Antizyme Inhibitor mRNA via Ribosome Queuing. **Molecular Cell**, v. 70, n. 2, p. 254–264.e6, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.03.015>

JIN, M.; KLIONSKY, D. J. Regulation of autophagy: Modulation of the size and number of autophagosomes. **FEBS Letters**, v. 588, n. 15, p. 2457–2463, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.06.015>

KAINTH, P. et al. Comprehensive genetic analysis of transcription factor pathways using a dual reporter gene system in budding yeast. **Methods**, v. 48, n. 3, p. 258–264, 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.02.015>

KAISER, A. et al. Modification of eukaryotic initiation factor 5A from Plasmodium vivax by a truncated deoxyhypusine synthase from Plasmodium falciparum: An enzyme with dual enzymatic properties. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 18, p. 6200–6207, 2007.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.06.026>

LASSAK, J.; WILSON, D. N.; JUNG, K. Stall no more at polyproline stretches with the translation elongation factors EF-P and IF-5A. **Molecular Microbiology**, v. 99, n. 2, p. 219–235, 2016. <https://doi.org/10.1111/mmi.13233>

LI, T. et al. Fertility and polarized cell growth depends on eIF5A for translation of polyproline-rich formins in Saccharomyces cerevisiae. **Genetics**, v. 197, n. 4, p. 1191–1200, 2014.
<https://doi.org/10.1534/genetics.114.166926>

LOU, B. et al. N1-guanyl-1,7-diaminoheptane (GC7) enhances the therapeutic efficacy of doxorubicin by inhibiting activation of eukaryotic translation initiation factor 5A2 (eIF5A2) and

preventing the epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma cells. **Experimental Cell Research**, v. 319, n. 17, p. 2708–2717, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.08.010>

LUBAS, M. et al. eIF5A is required for autophagy by mediating ATG3 translation. **EMBO reports**, v. 19, n. 6, p. e46072, 2018. <https://doi.org/10.15252/embr.201846072>

MAEGAWA, K. et al. Evolutionary conservation of TORC1 components, TOR, Raptor, and LST8, between rice and yeast. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 290, n. 5, p. 2019–2030, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00438-015-1056-0>

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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111800>

MATHEWS, M. B.; HERSHEY, J. W. B. The translation factor eIF5A and human cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1849, n. 7, p. 836–844, 2015. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGRM.2015.05.002>

MELIS, N. et al. Targeting eIF5A hypusination prevents anoxic cell death through mitochondrial silencing and improves kidney transplant outcome. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 28, n. 3, p. 811–822, 2017. <https://doi.org/10.1681/ASN.2016010012>

MILLER-FLEMING, L. et al. Remaining Mysteries of Molecular Biology: The Role of Polyamines in the Cell. **Journal of Molecular Biology**, v. 427, n. 21, p. 3389–3406, 2015. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2015.06.020>

MUÑOZ-SORIANO, V. et al. Evolutionary conserved role of eukaryotic translation factor eIF5A in the regulation of actin-nucleating formins. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 9580, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10057-y>

NAIR, U. et al. GFP-Atg8 protease protection as a tool to monitor autophagosome biogenesis. **Autophagy**, v. 7, n. 12, p. 1546–50, 2011. <https://doi.org/10.4161/AUTO.7.12.18424>

NAKANISHI, S.; CLEVELAND, J. L. **Targeting the polyamine-hypusine circuit for the prevention and treatment of cancer** *Amino Acids* Springer-Verlag Wien, , 2016. .

<https://doi.org/10.1007/s00726-016-2275-3>

NGUYEN, S. et al. Deoxyhypusine Modification of Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A (eIF5A) Is Essential for *Trypanosoma brucei* Growth and for Expression of Polyprolyl-containing Proteins. **The Journal of biological chemistry**, v. 290, n. 32, p. 19987–98, 2015. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.656785>

OERTLIN, C. et al. Generally applicable transcriptome-wide analysis of translational efficiency using anota2seq. **bioRxiv**, p. 106922, 2017. <https://doi.org/10.1101/106922>

OLIVERIO, S. et al. The spermidine analogue GC7 (N1-guanyl-1,7-diamineoheptane) induces autophagy through a mechanism not involving the hypusination of eIF5A. **Amino Acids**, v. 46, n. 12, p. 2767–2776, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00726-014-1821-0>

PARK, M. H. The post-translational synthesis of a polyamine-derived amino acid, hypusine, in the eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A). **Journal of biochemistry**, v. 139, n. 2, p. 161–9, 2006. <https://doi.org/10.1093/jb/mvj034>

PARK, M. H. et al. Functional significance of eIF5A and its hypusine modification in eukaryotes. **Amino Acids**, v. 38, n. 2, p. 491–500, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0408-7>

PATEL, P. H. et al. The *Drosophila* deoxyhypusine hydroxylase homologue *nero* and its target eIF5A are required for cell growth and the regulation of autophagy. **The Journal of Cell Biology**, v. 185, n. 7, p. 1181–1194, 2009. <https://doi.org/10.1083/jcb.200904161>

PELECHANO, V.; ALEPUZ, P. eIF5A facilitates translation termination globally and promotes the elongation of many non polyproline-specific tripeptide sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. 12, p. 7326–7338, 2017. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx479>

PEREIRA, C. et al. Mitochondrial degradation in acetic acid-induced yeast apoptosis: the role of Pep4 and the ADP/ATP carrier. **Molecular Microbiology**, v. 76, n. 6, p. 1398–1410, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07122.x>

REGGIORI, F. et al. The Atg1-Atg13 complex regulates Atg9 and Atg23 retrieval transport from the pre-autophagosomal structure. **Developmental Cell**, v. 6, n. 1, p. 79–90, 2004. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(03\)00402-7](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(03)00402-7)

REGGIORI, F.; KLIONSKY, D. J. Autophagic processes in yeast: Mechanism, machinery and regulation. **Genetics**, v. 194, n. 2, p. 341–361, 2013.

<https://doi.org/10.1534/genetics.112.149013>

ROSSI, D. et al. eIF5A and EF-P: two unique translation factors are now traveling the same road. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, v. 5, n. 2, p. 209–222, 2014. <https://doi.org/10.1002/wrna.1211>

SAINI, P. et al. Hypusine-containing protein eIF5A promotes translation elongation. **Nature**, v. 459, n. 7243, p. 118–121, 2009. <https://doi.org/10.1038/nature08034>

SCHULLER, A. P. et al. eIF5A Functions Globally in Translation Elongation and Termination. **Molecular Cell**, v. 66, n. 2, p. 194–205.e5, 2017. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2017.03.003>

SCHULLER, A. P.; GREEN, R. Roadblocks and resolutions in eukaryotic translation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, p. 1, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0011-4>

SHIN, B.-S. et al. Amino acid substrates impose polyamine, eIF5A, or hypusine requirement for peptide synthesis. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. 14, p. 8392–8402, 2017. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx532>

SHIROKIKH, N. E.; PREISS, T. Translation initiation by cap-dependent ribosome recruitment: Recent insights and open questions. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, v. 9, n. 4, p. e1473, 2018. <https://doi.org/10.1002/wrna.1473>

TATEHASHI, Y.; WATANABE, D.; TAKAGI, H. γ -Glutamyl kinase is involved in selective autophagy of ribosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, v. 590, p. 2906–2914, 2016. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12318>

VALENTINI, S. R. et al. Genetic interactions of yeast eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) reveal connections to poly(A)-binding protein and protein kinase C signaling. **Genetics**, v. 160, n. 2, p. 393–405, 2002.

WITZKY, A. et al. EF-P Posttranslational Modification Has Variable Impact on Polyproline Translation in *Bacillus subtilis*. **mBio**, v. 9, n. 2, p. e00306-18, 2018. <https://doi.org/10.1128/mBio.00306-18>

YI, C. et al. Formation of a Snf1-Mec1-Atg1 Module on Mitochondria Governs Energy Deprivation-Induced Autophagy by Regulating Mitochondrial Respiration. **Developmental Cell**, v. 41, n. 1, p. 59–71.e4, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.03.007>

YORIMITSU, T. et al. Protein kinase A and Sch9 cooperatively regulate induction of autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Biology of the Cell**, v. 18, n. 10, p. 4180–4189, 2007. <https://doi.org/10.1091/mbc.E07-05-0485>

YORIMITSU, T. et al. Tap42-associated protein phosphatase type 2A negatively regulates induction of autophagy. **Autophagy**, v. 5, n. 5, p. 616–624, 2009. <https://doi.org/10.4161/auto.5.5.8091>

ZHANG, H. et al. Polyamines Control eIF5A Hypusination, TFEB Translation, and Autophagy to Reverse B Cell Senescence. **Molecular Cell**, v. 76, n. 1, p. 110- 125.e9, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.08.005>