



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS – UNICAMP**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS – FCA**



**LETICIA TAMBORLIN**

**ESTUDO DE CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA PROTEÍNA SH2D4A  
HUMANA**

**LIMEIRA – SP**

**2017**

LETICIA TAMBORLIN

**ESTUDO DE CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA PROTEÍNA SH2D4A  
HUMANA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação da Faculdade de Ciências Aplicadas da Universidade Estadual de Campinas (FCA-UNICAMP) como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo, com área de concentração em Metabolismo e Biologia Molecular.

**Orientador:** Prof. Dr. Augusto Ducati Luchessi

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA LETICIA TAMBORLIN E ORIENTADA PELO PROF. DR. AUGUSTO DUCATI LUCHESSI.

LIMEIRA – SP

2017

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas  
Sueli Ferreira Júlio de Oliveira - CRB 8/2380

T151e Tamborlin, Leticia, 1993-  
Estudo de caracterização funcional da proteína SH2D4A humana / Leticia Tamborlin. – Limeira, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Augusto Ducati Luchessi.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas.

1. Células HeLa. 2. Mutação. 3. Códon de iniciação. 4. Gene. I. Luchessi, Augusto Ducati. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Functional characterization study of human SH2D4A protein

**Palavras-chave em inglês:**

HeLa cells

Mutation

Start codon

Gene

**Área de concentração:** Metabolismo e Biologia Molecular

**Titulação:** Mestra em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

**Banca examinadora:**

Augusto Ducati Luchessi [Orientador]

Igor Luchini Baptista

Leonardo dos Reis Silveira

**Data de defesa:** 23-08-2017

**Programa de Pós-Graduação:** Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

**Autora:** Leticia Tamborlin.

**Título:** Estudo de caracterização funcional da proteína SH2D4A humana.

**Natureza:** Pesquisa na área de Metabolismo e Biologia Molecular.

**Instituição:** Faculdade de Ciências Aplicadas, Universidade Estadual de Campinas.

**Aprovado em:** Limeira, 23/08/2017.

Presidente: Prof. Dr. Augusto Ducati Luchessi  
Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA/UNICAMP)  
(Orientador)

Prof. Dr. Igor Luchini Baptista  
Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA/UNICAMP)

Prof. Dr. Leonardo dos Reis Silveira  
Instituto de Biologia (IB/UNICAMP)

A Ata de Defesa foi devidamente assinada pelos membros da Comissão Examinadora e consta no processo de vida acadêmica do aluno.



*Dedico esta, bem como todas as minhas demais conquistas, aos meus pais Adriana e Edvaldo, que com muito carinho e apoio não mediram esforços para que eu concluísse mais esta etapa da minha vida.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus pela minha vida, pela saúde e pelas pessoas ao meu redor, sem isso não seria possível a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Adriana e Edvaldo, que me deram toda a estrutura para que eu me tornasse a pessoa que sou hoje. Agradeço especialmente pela confiança, carinho, compreensão, dedicação e pelo amor que me fortalece todos os dias. Vocês são meu porto seguro. Muito obrigada.

Ao meu namorado Danilo Donato Xavier, pelo apoio, incentivo, respeito e carinho, por ter paciência comigo, me acalmar nos momentos difíceis e acreditar no meu potencial. Obrigada por me dar segurança e tranquilidade para seguir em frente.

Ao meu orientador Prof<sup>o</sup> Dr. Augusto Ducati Luchessi cabe-se um agradecimento muito especial, pela confiança depositada em meu trabalho, por toda sua capacidade de ensinar e transmitir seu amplo conhecimento, pela amizade que construímos ao longo do tempo de trabalho juntos, pelo apoio, incentivo e orientação.

A todos os meus amigos e companheiros do Laboratório de Biotecnologia, André Proença, Karina Pereira, Letícia Meneguello, Mariana Artal, os quais estiveram comigo desde o início e entre outros que fizeram parte do laboratório. Agradeço especialmente pela ajuda e apoio oferecidos, que contribuíram diretamente para a execução deste trabalho e também pela ótima convivência, com muitos bons momentos e risadas dentro e fora do laboratório, que me proporcionaram momentos de descontração e alegria nesta jornada.

Agradeço em especial a minha amiga e companheira de laboratório, Karina Pereira, por toda ajuda, amizade, companheirismo, pelas muitas risadas e bons momentos compartilhados em todos esses anos de trabalho.

Agradeço a Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA-UNICAMP) e todo seu corpo docente, por todo o conhecimento transmitido, que foram fundamentais para a minha formação acadêmica. Agradeço também a estrutura cedida pela universidade e a todos os funcionários, sempre solícitos, que possibilitaram a execução deste trabalho.

Um agradecimento especial para minhas amigas da graduação Isadora Pavan, Kamila Ramponi e Karina Martins, que durante a graduação foram como irmãs

para mim. Além disso, todas seguimos o mesmo caminho após a graduação, o que possibilitou que pudéssemos compartilhar experiências e conselhos durante esta etapa de nossas vidas. Muito obrigada por sempre estarem ao meu lado, sendo minhas companheiras, amigas e um dos pilares que me fortalecem.

Agradeço a todos os meus amigos e amigas que caminham comigo ao longo dos anos, alguns até se tornaram meus companheiros de pós-graduação, obrigada por me apoiarem na minha trajetória, por me propiciarem bons momentos e de conforto emocional nas horas difíceis. São muitas pessoas que me vêm a cabeça agora e eles sabem quem são, muito obrigada a todos.

Ao Dr. Leo K. Iwai do Instituto Butantã pela contribuição com os experimentos de espectrometria de massas.

Ao Dr. Fernando Moreira Simabuco pela colaboração e ajuda com discussões e trocas de informações relevantes para o trabalho, além da contribuição com diversos reagentes para o desenvolvimento do projeto.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio jovem pesquisador JP (2010/18095-0) cedido ao laboratório, o que possibilitou a compra de equipamentos e reagentes utilizados neste trabalho.

Por fim, gostaria de agradecer a todos que contribuíram diretamente ou indiretamente para a minha formação acadêmica, pessoal e para a realização/conclusão deste trabalho. A todos vocês o meu sincero agradecimento. Ninguém vence sozinho!

***“A mente que se abre a uma nova ideia  
jamais volta ao seu tamanho original.”***

*Albert Einstein*

## RESUMO

**Introdução:** O fator de início de tradução de eucariotos 5A (eIF5A) está envolvido com a iniciação e alongação da tradução e apresenta relação com os processos de transcrição, trânsito de macromoléculas pelo complexo do poro nuclear, decaimento de mRNAs, proliferação e diferenciação celular, além de, também estar relacionado com processos inflamatórios, diabetes, câncer, malária e infecções virais, tais como HIV-1 e EBOV. O eIF5A é produzido pelas células como precursor inativo e a hipusinação deste fator é uma modificação pós-traducional essencial para sua atividade e para a viabilidade celular. Ensaios de espectrometria de massas revelaram a proteína SH2D4A como possível parceiro de interação a eIF5A-FLAG purificada a partir de extratos de células de adenocarcinoma de colo de útero humano (HeLa). Nestes ensaios, constatou-se que um peptídeo derivado da proteína SH2D4A poderia estar hipusinado, fato intrigante, pois desde a descoberta da hipusinação do eIF5A na década de 70 não há evidências da existência de qualquer outra proteína hipusinada. Já a proteína SH2D4A tem o seu gene localizado no cromossomo 8p, próximo a alguns genes associados à supressão tumoral. Esta região encontra-se deletada em pacientes com hepatocarcinoma celular (HCC) que não apresentam boas respostas aos tratamentos, sugerindo que a depleção de SH2D4A pode estar envolvida com a progressão do tumor. Recentemente, foi demonstrado que SH2D4A interage e inibe a atividade do fator de transcrição STAT3 controlado pela via de sinalização de interleucina 6 (IL-6), inibindo a transcrição de genes envolvidos com a proliferação celular, sobrevivência e desenvolvimento de tumores. Entretanto, apesar de fortes evidências relacionando SH2D4A com o desenvolvimento de tumores, existem menos de 15 estudos publicados envolvendo essa proteína. **Justificativa:** Atualmente, não são conhecidas vias de biossíntese de hipusina não associadas ao processo de modificação pós-traducional de eIF5A e, também, a existência de outras proteínas hipusinadas. Deste modo, indícios de que a proteína SH2D4A pudesse apresentar o resíduo de aminoácido hipusina e, visto também, seu envolvimento como supressor tumoral, fez com que essa proteína se tornasse alvo principal deste estudo, utilizando como modelo células de adenocarcinoma de colo de útero humano (HeLa). **Resultados:** Análises *in silico* indicam que a região supostamente hipusinada é conservada nas isoformas A e X1 (predita), mas não na isoforma B,

além de ser conservada em várias espécies. Entretanto, análises por espectrometria de massas de imunoprecipitados da proteína SH2D4A endógena não foram capazes de validar a hipusinação dessa proteína, requerendo estudos futuros para sua caracterização. Em relação à validação da interação física entre as proteínas eIF5A-FLAG e SH2D4A, foi observado por *immunoblotting* que a proteína SH2D4A endógena também co-imunoprecipitava com o controle GFP-FLAG. Para dar início ao estudo de caracterização da proteína, iniciamos com a amplificação e posterior clonagem do gene em um vetor plasmidial. Com isso, foi possível identificar os transcritos variantes 1, 2, X1 e X2 de SH2D4A em células HeLa, seguido de validação pelo sequenciamento das amostras. A partir do sequenciamento foi possível observar que o cDNA de SH2D4A clonado apresentava algumas mutações, dentre elas a mais significativa foi observada no códon iniciador da proteína, resultando na utilização de um códon de iniciação alternativo para a produção da proteína nessas células. Além disso, a presença de uma *uORF* (*upstream Open Reading Frame*) na variante 1 de SH2D4A fez com que células HeLa transfectadas expressassem conteúdos proteicos distintos a partir das variantes transcricionais 1 e 2. A mutação sítio dirigida na *uORF* da variante 1 resultou em um aumento na produção da proteína em relação a variante 1 selvagem. **Conclusão:** Os resultados obtidos no presente estudo contribuem para a caracterização do gene e da proteína SH2D4A e sugerem que esta proteína possui características importantes, dentre as quais, mutações no gene que podem contribuir, juntamente com outros fatores, para o desenvolvimento e progressão de tumores.

**Palavras-chave:** Células HeLa. Mutação. Códon de iniciação. Gene.

## ABSTRACT

**Introduction:** The eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) is involved in translation initiation and elongation and is related to transcription processes, macromolecular transit through the nuclear pore complex, mRNA decay, cell proliferation and differentiation, as well as being related to inflammatory processes, diabetes, cancer, Malaria, and viral infections such as HIV-1 and EBOV. The eIF5A protein is produced as an inactive precursor, and the hypusination of this factor is a post-translational modification essential for its activity and cell viability. Mass spectrometric assays revealed SH2D4A protein as a possible interaction partner for eIF5A-FLAG purified from HeLa cell extracts. In these assays, the peptide derived from SH2D4A showed a hypusine amino acid residue, an intriguing fact, because since the eIF5A hypusination discovery in the 1970s there is no evidence of any other hypusinated protein. SH2D4A gene is located on chromosome 8p close to some genes associated with tumor suppression. This region is deleted in patients with hepatocellular carcinoma (HCC) with poor outcomes, suggesting that depletion of SH2D4A could be involved in tumor progression. Besides, SH2D4A inhibits the STAT3 transcription factor activity mediated by interleukin 6 (IL-6) signaling pathway, inhibiting the transcription of genes involved in cell proliferation, survival, and tumor development. However, despite the strong evidence of the association of SH2D4A as a tumor suppressor, there are few studies involving this protein. **Justification:** Currently, it is unknown hypusine biosynthesis pathways not associated with the post-translational modification process of eIF5A and also the existence of other hypusinated proteins. Thus, evidence that SH2D4A protein could present the amino acid residue hypusine and, as well as its involvement in the inhibition of tumor progression, turned this protein the main target of this study. **Results:** *In silico* analysis showed that the supposedly hypusinated region is conserved in the isoforms A and X1 (predicted), but not in the B isoform, in addition to being conserved in several species. However, mass spectrometric analysis of endogenous SH2D4A protein immunoprecipitates was not able to validate the hypusination of this protein. Concerning the validation of the physical interaction between the eIF5A-FLAG and SH2D4A proteins, it was observed by immunoblotting that the endogenous SH2D4A protein also co-immunoprecipitated with the GFP-FLAG control. To start the characterization of the protein, we performed amplification of the cDNA by RT-PCR

and subsequent cloning. Thereby, it was possible to identify the transcript variants 1, 2, X1 and X2 of SH2D4A, which was confirmed by sequencing of the samples. Analysis of the sequenced samples revealed some mutations in SH2D4A gene, among them, the most significant was observed in the start codon, which results in the use of an alternative start codon for production of the protein. Also, the presence of the uORF (upstream Open Reading Frame) in SH2D4A variant 1 downregulates the protein production from transcript variant 1 in transfected cells. In fact, a depletion of the uORF increased the protein content compared to original variant 1.

**Conclusion:** Our results suggest these mutations in SH2D4A gene and the presence of the uORF in transcript variant 1 may contribute to the abnormal characteristics observed in this type of cells.

**Keywords:** HeLa cells. Mutation. Start codon. Gene.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - A hipusinação de eIF5A (Park, 2006).....	26
<b>Figura 2</b> - O gene humano de SH2D4A e seus transcritos alternativos .....	28
<b>Figura 3</b> - Tradução da <i>coding DNA sequence</i> (CDS) regulada pela presença de <i>uORFs</i> no mRNA (Young e Wek, 2016).....	29
<b>Figura 4</b> - Representação esquemática da proteína SH2D4A humana.....	31
<b>Figura 5</b> - Sequência de aminoácidos da proteína SH2D4A isoforma A .....	52
<b>Figura 6</b> - Imunoprecipitação da proteína SH2D4A endógena, seguida de análise das bandas recortadas por espectrometria de massas.....	53
<b>Figura 7</b> - Predição de sítios de fosforilação em tirosina na proteína eIF5A .....	55
<b>Figura 8</b> - Validação da interação entre as proteínas superexpressas eIF5A-FLAG e SH2D4A endógena .....	55
<b>Figura 9</b> - Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas SH2D4A isoformas A, B e predita X1 humanas .....	57
<b>Figura 10</b> - Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína SH2D4A de diferentes espécies .....	57
<b>Figura 11</b> - Predição da estrutura 3D das isoformas A, B, predita X1 e domínio SH2 da proteína SH2D4A .....	58
<b>Figura 12</b> - Detecção dos transcritos de SH2D4A em células HeLa para clonagem no vetor plasmidial pFLAG-CMV5a .....	60
<b>Figura 13</b> - Análise de restrição dos plasmídeos pFLAG-CMV5a clonados com o gene SH2D4A .....	60
<b>Figura 14</b> - Identificação da mutação no códon de iniciação codificador da proteína SH2D4A através do sequenciamento do gene clonado a partir de cDNA de células HeLa.....	62

<b>Figura 15</b> - Sequência da proteína SH2D4A isoforma A originada a partir do transcrito variante 1 em células HeLa .....	63
<b>Figura 16</b> - Análise do conteúdo proteico de SH2D4A-FLAG isoforma A produzido a partir das variantes transcricionais 1 e 2 .....	65
<b>Figura 17</b> - Mutação sítio dirigida da <i>uORF</i> na <i>UTR 5'</i> da proteína SH2D4A resultou em um aumento no conteúdo proteico produzido .....	67

## LISTA DE QUADROS

**Quadro 1** - Construções obtidas e oligonucleotídeos utilizados no experimento de PCR para clonagem do gene SH2D4A a partir de cDNA de células HeLa .....38

**Quadro 2** - Oligonucleotídeos utilizados para sequenciamento dos clones obtidos na clonagem do gene SH2D4A a partir de cDNA de células HeLa .....42

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALX	proteína adaptadora de células T com função desconhecida
c-Cbl	E3 proteína ligase de ubiquitina Cbl
CCDC25	gene codificador da proteína contendo o domínio <i>coiled-coil</i> 25
cDNA	DNA complementar
CDS	sequência codificadora de DNA
Crk	molécula adaptadora Crk
C-terminal	extremidade carboxi-terminal
DAG	diacilglicerol
Dapp1	Adaptador duplo para fosfotirosina e 3-fosfotirosina e 3-fosfoinositideo
DHS	deoxihipusina sintase
DLC1	gene codificador da proteína ativadora de Rho GTPase 7
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP mix	desoxirribonucleotídeos misturados (dATP, dCTP, dGTP e dTTP)
DOHH	deoxihipusina hidroxilase
eIF4D	fator de início de tradução de eucariotos 4D (eIF5A)
eIF5A	fator de início de tradução de eucariotos 5A
ELP3	gene codificador da proteína do complexo elongador 3
ER $\alpha$	receptor de estrogênio - alpha
Fgr	proteína tirosina quinase Fgr
Fps	proteína tirosina quinase Fes/Fps
Fyn	proteína tirosina quinase Fyn

Grb2	proteína ligada ao receptor do factor de crescimento 2
HIV-1	vírus da síndrome da imunodeficiência adquirida humana-1
IL-6	interleucina 6
IP <sub>3</sub>	inositol trifosfato
LB meio	Luria-Bertani
MAPK	proteína quinase ativada por mitógenos
mRNA	RNA mensageiro
MS	espectrometria de massas
<i>NCBI</i>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Nck1	proteína citoplasmática Nck1
N-terminal	extremidade amino-terminal
PBS	tampão fosfato-salino
PCR	reação em cadeia da polimerase
PIP <sub>2</sub>	fosfatidilinositol bifosfato
PKC	proteína quinase C
PLC-γ	mensageiro secundário fosfolipase C - gamma
PROSC	gene codificador da proteína de homeostase de fosfato piridoxal
Ras-Gap	sinalizadores de Ras
RNA	ácido ribonucleico
RT	transcrição reversa
SDS-PAGE	dodecilo sulfato de sódio – Eletroforese em gel de poliacrilamida
SFB	soro fetal bovino
SH2	domínio homólogo de Src 2
SH3	domínio homólogo de Src 3

SH(2)A	proteína contendo domínio SH2 A (SH2D4A)
SH2D4A	proteína contendo domínio SH2 4A
Shc	proteína adaptadora Shc
Shp-1	proteína contendo domínio SH2 fosfatase de tirosina 1
Shp-2	proteína contendo domínio SH2 fosfatase de tirosina 2
Slp76	fosfoproteína de leucócitos contendo domínio SH2 de 76 kDa
SORBS3	gene codificador de uma proteína adaptadora contendo domínio SH3 ( <i>vinexin</i> )
Src	proteína tirosina quinase Src
STAT1	transdutor de sinal e ativador da transcrição 1
STAT3	transdutor de sinal e ativador da transcrição 3
Syk	proteína tirosina quinase Syk
Tec	proteína tirosina quinase Tec
TPK	proteína tirosina quinase
TSA <sub>d</sub>	proteína adaptadora específica de células T
<i>uORF</i>	<i>upstream Open Reading Frame</i>
<i>UTR 5'</i>	região não traduzida 5'

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$	alpha
$\beta$	beta
$\gamma$	gamma
®	marca registrada
™	marca registrada
%	percentual
°C	graus Celsius
$\times g$	aceleração gravitacional
$\mu\text{L}$	microlitro
$\mu\text{M}$	micromolar
$\mu\text{g}$	micrograma
ACN	acetonitrila
$\text{CaCl}_2$	cloreto de cálcio
cm	centímetro
$\text{cm}^2$	centímetro quadrado
$\text{cm}^3$	centímetro cúbico
$\text{CO}_2$	gás carbônico (dióxido de carbono)
DEPC	dicarbonato de dietila
DMSO	dimetilsufóxido
DO	densidade óptica
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
HCl	ácido clorídrico

KCl	cloreto de potássio
kDa	quilodáton
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	fosfato monopotássico
kV	quilovolt
L	litro
M	molar
$\text{MgCl}_2$	cloreto de magnésio
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	milimolar
mm	milímetro
MOPS	ácido 4-morfolina-propanossulfônico
ms	milissegundo
m/z	massa/carga
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	fosfato dissódico heptahidratado
NaCl	cloreto de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
ng	nanograma
nL	nanolitro
nm	nanômetro
pmol	picomol
ppm	parte por milhão
$\text{RbCl}_2$	cloreto de rubídio
rpm	rotação por minuto



SDS	dodecilo sulfato de sódio
TFA	ácido trifluoroacético
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
Triton X-100	polietilenoglicol-terc-octilfenil éter
Tween 20	monolaurato de polietilenoglicol-sorbitana
U	unidade de atividade enzimática
V	volt

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	25
1.1 A proteína eIF5A e sua hipusinação .....	25
1.2 A proteína SH2D4A .....	27
2 OBJETIVO GERAL .....	34
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.1 Reagentes e anticorpos .....	35
3.2 Descongelamento, cultivo e subcultivo da linhagem celular de adenocarcinoma de colo de útero humano (HeLa) .....	36
3.3 Extração de RNA total utilizando TRIzol® .....	36
3.4 Transcrição reversa (RT): Síntese de cDNA.....	37
3.5 Reação em cadeia pela polimerase (PCR) .....	37
3.6 Clonagem do cDNA de SH2D4A utilizando os produtos da PCR .....	38
3.6.1 Preparação do inserto .....	38
3.6.2 Digestão e defosforilação do vetor plasmidial .....	39
3.6.3 Reação de ligação .....	39
3.7 Preparo de <i>E. coli</i> quimiocompetentes .....	39
3.8 Transformação de <i>E. coli</i> quimiocompetentes .....	40
3.9 Preparação de DNA plasmidial de <i>E. coli</i> em pequena escala (Miniprep) – Método de lise alcalina .....	40
3.10 Preparação de DNA plasmidial de <i>E. coli</i> em média escala (Midiprep) ....	41
3.11 Sequenciamento de DNA utilizando o método de Sanger .....	41
3.12 Transfecção celular utilizando os plasmídeos construídos para expressar SH2D4A-FLAG ou eIF5A-FLAG obtidos por Pereira <i>et al.</i> (2016) .....	42

3.13 Análise do conteúdo proteico produzido pelos diferentes plasmídeos que expressam SH2D4A-FLAG .....	43
3.13.1 Preparo de extratos proteicos, quantificação de proteína total e preparo das amostras para <i>SDS-PAGE</i> .....	43
3.13.2 <i>SDS-PAGE</i> ( <i>Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i> ) seguido de <i>immunoblotting</i> .....	43
3.14 Co-Imunoprecipitação de eIF5A-FLAG para análise por espectrometria de massas e por <i>SDS-PAGE</i> seguido de <i>immunoblotting</i> .....	44
3.15 Imunoprecipitação de SH2D4A endógena para análise por espectrometria de massas .....	45
3.16 Coloração de gel de poliacrilamida com nitrato de prata .....	46
3.17 Espectrometria de massa para análise das co-imunoprecipitações de eIF5A-FLAG – Realizada no LNBio em Campinas .....	47
3.18 Espectrometria de massa para análise das imunoprecipitações de SH2D4A endógena – Realizada no Instituto Butantã em São Paulo .....	48
3.19 Análises de bioinformática .....	50
4 RESULTADOS .....	51
4.1 Identificação da proteína SH2D4A em imunoprecipitados de eIF5A-FLAG revelou a possível existência de uma nova proteína contendo o resíduo de aminoácido hipusina. ....	51
4.2 Análises <i>in silico</i> indicam sítios de fosforilação em tirosina na proteína eIF5A, indicando um possível alvo de ligação da proteína SH2D4A através do domínio SH2. ....	54
4.3 Alinhamento das diferentes isoformas de SH2D4A permite a visualização das diferenças na composição de aminoácidos entre as isoformas e indica que a região da possível hipusinação é conservada nas isoformas A e X1, mas não na isoforma B.....	56
4.4 Análises <i>in silico</i> da proteína SH2D4A e suas isoformas permitem a visualização da estrutura 3D da proteína.....	58

4.5 Identificação dos transcritos variantes 1, 2, X1 e X2 de SH2D4A em células HeLa. ....	59
4.6 Sequenciamento do gene SH2D4A clonado a partir do cDNA de células HeLa revelou uma mutação no códon de iniciação codificador da proteína (ATG → ACG). ....	61
4.7 A presença da <i>uORF</i> ( <i>upstream Open Reading Frame</i> ) na variante 1 de SH2D4A faz com que células HeLa transfectadas expressem conteúdos proteicos distintos a partir das variantes transcricionais. ....	64
4.8 Mutação sítio dirigida na <i>uORF</i> da variante 1 resultou em um aumento na produção da proteína em relação a variante 1 selvagem. ....	66
5 DISCUSSÃO .....	68
6 CONCLUSÃO.....	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	73

## 1 INTRODUÇÃO

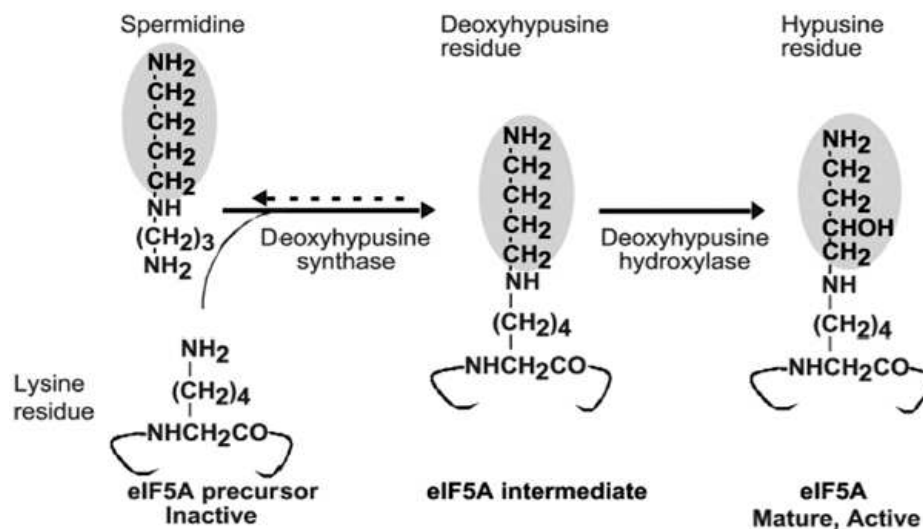
A proteína eIF5A humana vem sendo estudada pelo nosso grupo e, desde então, diversos experimentos foram realizados envolvendo eIF5A como alvo principal dos estudos. Ensaio de co-imunoprecipitação, seguidos de identificação por espectrometria de massas, mostraram que a proteína SH2D4A de células HeLa é um possível parceiro de interação com a proteína purificada eIF5A-FLAG. Além disso, um peptídeo da proteína SH2D4A identificado nestes ensaios revelou que esta proteína poderia apresentar o resíduo de aminoácido hipusina na posição 59 (um resíduo de lisina modificado). Até o presente momento, eIF5A ainda é a única proteína conhecida por apresentar este resíduo de aminoácido, desde a descoberta de sua hipusinação na década de 70 (Shiba *et al.*, 1971; Nakanishi e Cleveland, 2016a). A possibilidade de SH2D4A ser hipusinada nos despertou atenção para intensificar a caracterização desta proteína, visto também o seu forte envolvimento na inibição da progressão tumoral relatada na literatura (Roessler *et al.*, 2012; Quagliata *et al.*, 2014; Ploeger *et al.*, 2016). Deste modo, o presente estudo passa a ter como alvo a validação dos resultados preliminares obtidos e a elucidação de novas características em relação ao gene e à proteína SH2D4A que possam auxiliar na compreensão do envolvimento desta com a progressão e desenvolvimento tumoral. A seguir, serão abordadas as principais características das proteínas eIF5A e SH2D4A.

### 1.1 A proteína eIF5A e sua hipusinação

O fator de início de tradução de eucariotos 5A (eIF5A), inicialmente chamado de eIF4D, foi isolado de ribossomos de lisados de reticulócitos de coelho (Kemper *et al.*, 1976). O fator eIF5A é uma proteína essencial de aproximadamente 17 kDa e altamente conservada em eucariotos e entre seus homólogos de *archaeas* (Klier *et al.*, 1993; Park *et al.*, 1993; Klier *et al.*, 1995; Park *et al.*, 1997). O eIF5A é a única proteína conhecida que apresenta o resíduo de aminoácido hipusina, um aminoácido básico que foi isolado em 1971 a partir de extrato solúvel de cérebro bovino (Shiba *et al.*, 1971). A hipusina é proveniente de uma modificação pós-traducional denominada hipusinação, também conservada em eucariotos e *archaeas*, envolvendo a poliamina espermidina (Park, 2006).

A hipusinação de eIF5A inicia-se com a transferência do radical 4-aminobutil

da espermidina para o grupo  $\epsilon$ -amino de um resíduo de lisina específica de eIF5A (Lys<sup>50</sup>, em humanos) por meio de uma reação reversível catalisada pela enzima deoxihipusina sintase (DHS). Ao término da reação, o resíduo de lisina é modificado em deoxihipusina. A seguir, o resíduo deoxihipusina é hidroxilado por meio de uma reação irreversível mediada pela enzima deoxihipusina hidroxilase (DOHH), produzindo o resíduo hipusina (Figura 1) (Park, 2006).



**Figura 1 - A hipusinação de eIF5A (Park, 2006).** Modificação pós-traducional que transforma um resíduo de lisina (Lisina<sup>50</sup>, em humanos) do precursor inativo de eIF5A em um resíduo de hipusina, tornando o eIF5A ativo. (FONTE: figura retirada de Park (2006)).

Atualmente, são desconhecidas vias de biossíntese de hipusina não associadas ao processo de modificação pós-traducional de eIF5A e, também, a existência de outras proteínas contendo este resíduo de aminoácido. Similarmente, não são conhecidas vias bioquímicas de metabolização de hipusina livre. Sabe-se que a hipusinação de eIF5A é essencial para sua atividade e para a viabilidade celular, pois células nas quais ela foi bloqueada se tornaram inviáveis (Schnier *et al.*, 1991; Sasaki *et al.*, 1996; Park *et al.*, 1997).

O eIF5A está envolvido com a iniciação e alongação da tradução e apresenta relação com os processos de transcrição, trânsito de macromoléculas pelo complexo do poro nuclear, decaimento de mRNAs, proliferação e diferenciação celular (Park *et al.*, 1997; Zuk e Jacobson, 1998; Rosorius *et al.*, 1999; Lipowsky *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2007; Jasiulionis *et al.*, 2007; Hoque *et al.*, 2009; Luchessi *et al.*, 2009; Saini *et al.*, 2009; Parreiras-E-Silva *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2014). O eIF5A associa-se com ribossomos ativamente engajados na tradução, fortalecendo o

envolvimento desta proteína na síntese proteica (Jao e Chen, 2006; Zanelli *et al.*, 2006). Além disso, a importância da hipusinação para a atividade de eIF5A no processo de tradução foi mostrada a partir da observação de que eIF5A humana recombinante, não hipusinada, foi incapaz de estimular a síntese *in vitro* de metionil-puromicina, ensaio utilizado para avaliar a formação da primeira ligação peptídica (Sano *et al.*, 1986; Smit-Mcbride *et al.*, 1989). Além disso, tem sido demonstrado que eIF5A atua na elongação da tradução de proteínas contendo regiões ricas em prolina (Gutierrez *et al.*, 2013).

A proteína eIF5A também vem sendo relacionada com processos inflamatórios, diabetes, câncer, malária e infecções virais, tais como as causadas por HIV-1 e EBOV (vírus causador da doença Ebola) (Kaiser, 2012; Hanauske-Abel *et al.*, 2013; De Almeida *et al.*, 2014; Imam *et al.*, 2014; Nakanishi e Cleveland, 2016b; Olsen *et al.*, 2016). Além disso, o eIF5A vem sendo apontado como um possível e promissor alvo terapêutico para essas doenças, através de drogas inibidoras da sua hipusinação (Kaiser, 2012; Hanauske-Abel *et al.*, 2013).

Visto a importância da hipusinação para a atividade da proteína eIF5A e sua relação com diversas doenças, a possível existência de outras proteínas hipusinadas é algo que nos desperta atenção, podendo esta também ser importante para atividade de outras proteínas ou para a manutenção da homeostase celular por mecanismos regulatórios de eIF5A hipusinada e não hipusinada. Deste modo, indícios de que a proteína SH2D4A pudesse apresentar o resíduo de aminoácido hipusina fez com que essa proteína fosse o alvo principal deste estudo, a qual suas principais características serão apresentadas a seguir.

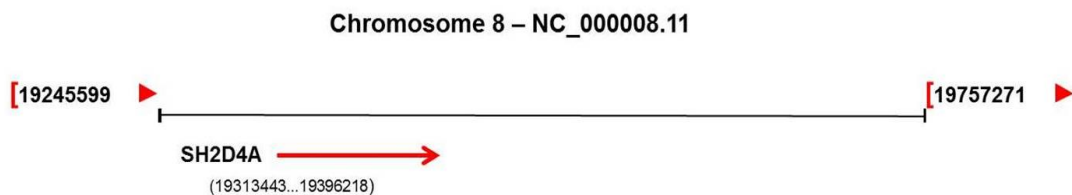
## **1.2 A proteína SH2D4A**

A proteína SH2D4A, inicialmente denominada de SH(2)A, teve seu gene clonado e caracterizado pela primeira vez em 2002 (Dai *et al.*, 2002). O gene SH2D4A está localizado no cromossomo 8p, o qual possui alguns genes supressores tumorais (DLC1, CCDC25, ELP3, PROSC e SORBS3) e que encontram-se deletados em pacientes com hepatocarcinoma celular que apresentam baixa resposta ao tratamento, consequentemente, menor tempo de sobrevivência (Roessler *et al.*, 2012). Ensaios *in vitro* e *in vivo* indicaram que os produtos dos genes PROSC, SH2D4A, SORBS3 e DLC1 possuem atividades

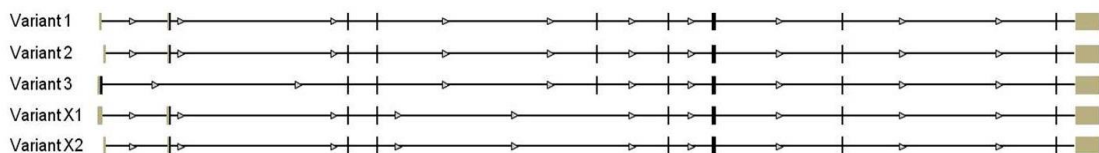
supressoras de tumor (Goodison *et al.*, 2005; Xue *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2008; Roessler *et al.*, 2012). Um estudo que corrobora os dados anteriores foi realizado com o objetivo de investigar se a proteína SH2D4A apresentava envolvimento na patogênese de câncer de fígado, o qual mostrou que esta proteína encontra-se reduzida em hepatocarcinoma celular e nódulos cirróticos, quando comparados com fígados de indivíduos normais, corroborando sua atividade supressora tumoral observada anteriormente (Quagliata *et al.*, 2014).

Em humanos o gene SH2D4A (cromossomo 8, 19313443 - 19396218) contém 10 exons (Figura 2). Cinco variantes transcricionais correspondentes a SH2D4A (variantes 1, 2, 3, X1 e X2) estão registradas nas bases de dados (Figura 2). Os transcritos variantes 1 e 2 codificam a mesma isoforma (isoforma A), a qual possui 454 aminoácidos e é considerada canônica. O transcrito variante 3 de SH2D4A difere dos transcritos 1 e 2 na *untranslated region 5'* (UTR 5') e na sequência codificadora, pois pelo mecanismo de *splicing* alternativo o transcrito variante 3 perde o exon 2, resultando em uma isoforma menor (isoforma B), com um N-terminal distinto da isoforma A e que contém 409 aminoácidos. Já os transcritos variantes X1 e X2, que possivelmente codificam a isoforma X1, são apenas preditos na literatura e ainda não foram validadas. O que diferencia esses dois transcritos dos demais é a perda do exon 5, resultando na possível produção de uma isoforma distinta.

A



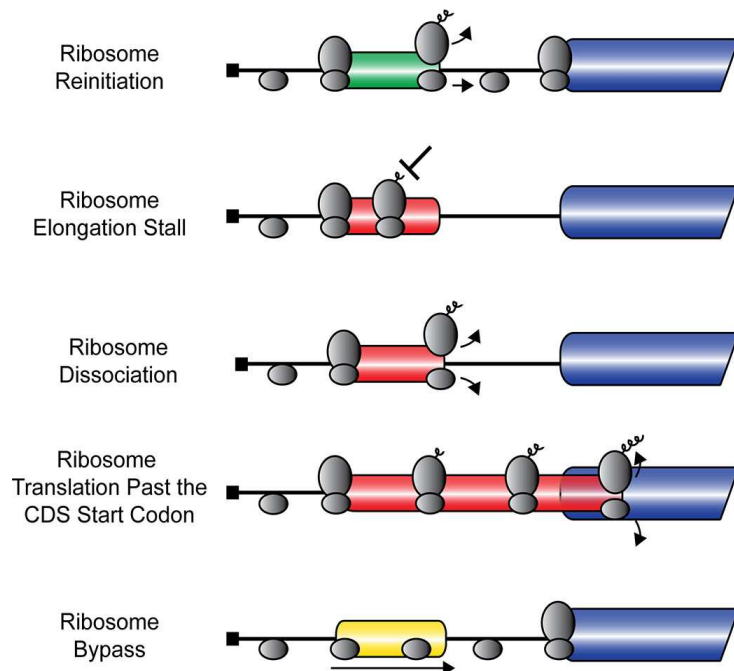
B



**Figura 2 - O gene humano de SH2D4A e seus transcritos alternativos.** (A) Representação esquemática do gene SH2D4A no cromossomo 8. (B) As variantes transcricionais 1, 2, 3, X1 e X2 estão representadas nos segmentos acima: os exons estão representados como os segmentos cinza e pretos achatados; os introns estão representados como os grandes segmentos pretos. Informações obtidas pelo banco de dados do *National Center for Biotechnology Information*, Gene ID: 63898. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. (FONTE: figura elaborada pela autora).

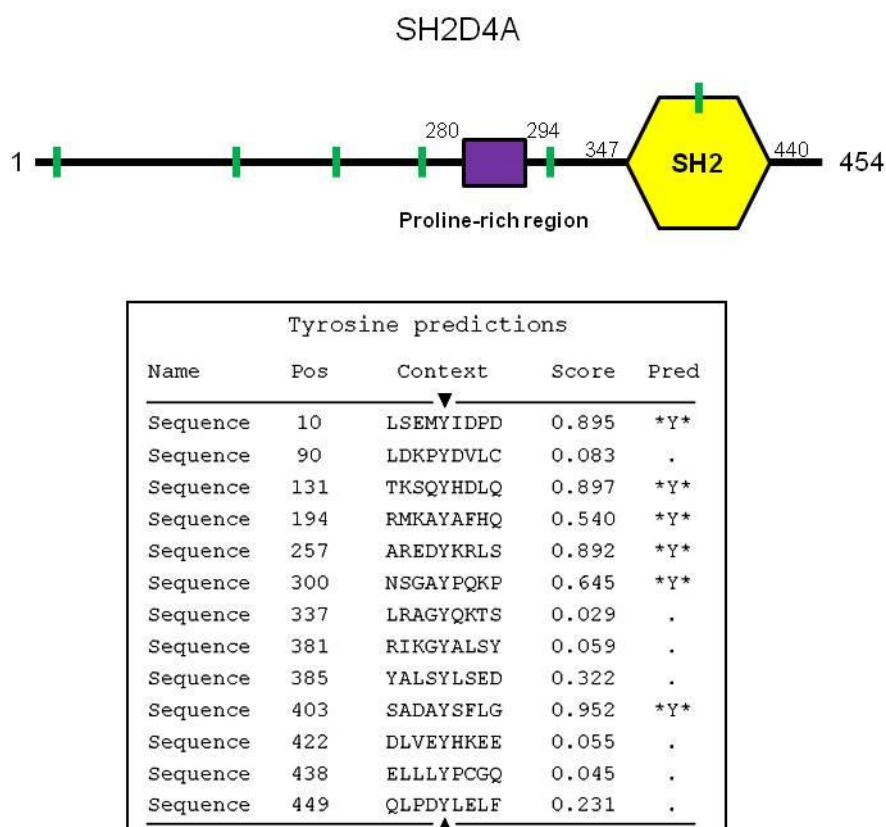


Uma característica relevante em relação aos transcritos de SH2D4A, é o fato do transcrito variante 1 apresentar uma *uORF* (*upstream Open Reading Frame*). As *uORFs* são pequenas regiões localizadas nas UTRs 5' dos mRNAs capazes de serem reconhecidas pelo ribossomos e serem traduzidas, o que pode interferir no reconhecimento do códon de iniciação da sequência codificadora de DNA (*coding DNA sequence* - CDS) da proteína específica (Meijer e Thomas, 2002). Geralmente, são conhecidas por atuarem como repressores da tradução, entretanto, há estudos que mostram que as *uORFs* podem promover a tradução a partir da CDS, indicando que essas regiões possuem muitas características que determinam o controle traducional (Young e Wek, 2016). As *uORFs* participam da regulação da tradução através de diversos mecanismos, como, por exemplo, podendo promover a reiniciação da tradução pelo ribossomo; causar uma estagnação na elongação da tradução; causar a dissociação precoce do ribossomo do mRNA; pode ocasionar a produção de uma proteína com o N-terminal estendido; pode fazer com que a *uORF* seja traduzida e o ribossomo não reconheça o códon de iniciação da CDS principal, ou, ainda, o ribossomo pode deslocar-se sobre a *uORF* sem causar nenhuma interferência no reconhecimento da CDS principal (Figura 3) (Meijer e Thomas, 2002; Young e Wek, 2016).



**Figura 3 - Tradução da *coding DNA sequence* (CDS) regulada pela presença de *uORFs* no mRNA (Young e Wek, 2016).** As CDS estão representadas pelas barras em azul; *uORFs* de ação positiva estão representadas pelas barras em verde; *uORFs* de ação negativa estão representadas pelas barras em vermelho; e *uORFs* que não têm efeito sobre a tradução estão representadas pelas barras em amarelo. Os ribossomos estão ilustrados em cinza. (FONTE: figura retirada de Young e Wek (2016)).

Em relação à proteína SH2D4A, uma das suas principais características é o fato de apresentar um único domínio SH2 (*Src homology region 2*) próximo à extremidade C-terminal da proteína e uma região rica em prolinas próximo ao domínio SH2 (Figura 4) (Lapinski *et al.*, 2008; Lapinski *et al.*, 2009). Em geral, este domínio está envolvido com a transdução de sinal intracelular e é conhecido por promover ligações proteína-proteína (Moran *et al.*, 1990). O domínio SH2 é um domínio conservado de aproximadamente 100 aminoácidos, que está presente em um grande número de proteínas: proteínas adaptadoras (Nck1, Crk, Grb2), proteínas estruturais (Slp76, Shc, Dapp1), quinases (Src, Syk, Fps, Tec), fosfatases (Shp-1, Shp-2), fatores de transcrição (STAT1), moléculas de sinalização de Ras (Ras-Gap), fatores de ubiquitinação (c-Cbl), reguladores do citoesqueleto (Tensin), reguladores de sinal (SAP), mensageiros secundários de fosfolipídios (PLC $\gamma$ ), entre outras (Moran *et al.*, 1990; Pawson e Gish, 1992; Liu *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2012). A principal característica desse domínio é a sua ligação com regiões polipeptídicas contendo fosfotirosinas (pTyr/pY) (Moran *et al.*, 1990). Um estudo analisou bibliotecas de ligação do domínio SH2 a fosfopeptídeos para tentar definir sequências preferenciais de ligação a esse domínio, no qual foi observado que os domínios SH2 das proteínas Fgr, Fyn, Lck e Src se ligam preferencialmente à sequência pYEEI, do que a outras sequências (Songyang e Cantley, 1995). Em relação ao domínio SH2 de outras proteínas, sabe-se que o domínio da proteína Src forma duas regiões de reconhecimento a fosfopeptídeos, uma que coordena a ligação à fosfotirosinas e outra que se liga a um ou mais resíduos de aminoácidos hidrofóbicos na extremidade C-terminal em relação à fosfotirosina (Waksman e Kuriyan, 2004; Roskoski, 2015). Entretanto, o domínio SH2 dessa proteína se liga a várias outras sequências contendo fosfotirosinas, que não correspondem a sequência ótima (pYEEI) descrita para ligação desse domínio (Roskoski, 2015). Apesar da existência de vários estudos na literatura que tentam caracterizar a ligação do domínio SH2 a regiões polipeptídicas específicas, não existem regras gerais para todas as proteínas que contém esse domínio, uma vez que ele é variável entre as proteínas e a sequência polipeptídica que ele se liga contendo fosfotirosinas também pode variar.



**Figura 4 - Representação esquemática da proteína SH2D4A humana.** O retângulo em roxo representa a região rica em prolina (280 - 294), o hexágono em amarelo o domínio SH2 (347 - 440) e as barras em verde representam as regiões de possíveis fosforilação em tirosina (pTyr/pY) da proteína SH2D4A com *score* acima de 0.500, que representa maior grau de confiabilidade da análise. Análise de predição de fosfotirosinas realizada no *software NetPhos 2.0 server*. (FONTE: figura elaborada pela autora).

O fato da proteína SH2D4A possuir um domínio SH2 e uma região rica em prolina, fez com que alguns estudos investigassem o papel desta proteína na transdução de sinal do receptor de células T, pois sabe-se que existem duas proteínas chaves na regulação deste receptor, a proteína adaptadora específica de células T (TSAd) e a proteína adaptadora com função desconhecida (ALX), que apresentam características estruturais similares à proteína SH2D4A. Deste modo, a proteína SH2D4A apresenta alta homologia com estas duas proteínas e, a partir disso, foi estudada neste contexto. Como resultado, obteve-se que a proteína SH2D4A é dispensável para a transdução de sinal a partir do receptor de células T e que o silenciamento desta proteína nestas células não impactou na função das mesmas (Lapinski *et al.*, 2008; Lapinski *et al.*, 2009).

Com o objetivo de avaliar o efeito do gene SH(2)A (nome originário do gene SH2D4A) na transdução de sinal celular e sua localização subcelular, um estudo

realizou a construção de um plasmídeo pEGFP-SH(2)A, o qual foi utilizado para transfecção em células Bel7402 e COS7. As células transfectadas foram observadas em um microscópio de fluorescência e a proteína, até então denominada SH(2)A, teve sua localização subcelular determinada no citoplasma da célula (Ding *et al.*, 2003). O mesmo estudo também realizou a construção de um plasmídeo pcDNA 3.1-SH(2)A, o qual foi utilizado para transfecção nestas mesmas células, seguida da realização de múltiplos ensaios de quinases. Como resultado, o estudo obteve que a proteína SH(2)A reduziu a atividade da proteína quinase C (PKC) em 40% no citoplasma, interferindo na transdução do sinal celular. Também foram mensuradas as atividades da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) e da proteína tirosina quinase (TPK), mas não foram encontradas alterações aparentes nas atividades dessas proteínas (Ding *et al.*, 2003). Posteriormente, a relação entre a proteína SH2D4A com a redução da atividade da PKC, foi explicada por um estudo, dos mesmos autores, que mostrou que a SH2D4A possui efeitos inibitórios na proliferação celular induzida por estrogênio através da sua ligação direta com o receptor de estrogênio (ER $\alpha$ ). A proteína SH2D4A se liga ao receptor de estrogênio e compete com a fosfolipase C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) pela ligação ao receptor, impedindo assim que a PLC- $\gamma$  clive o fosfatidilinositol bifosfato (PIP<sub>2</sub>) em diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>), deste modo bloqueando a ativação da PKC e reduzindo os efeitos do estrogênio na proliferação celular (Li *et al.*, 2009).

O estudo mais recente publicado envolvendo a proteína SH2D4A mostrou que, os já descritos genes supressores tumorais localizados no cromossomo 8p, SH2D4A e SORBS3, foram capazes de inibir a ativação do fator de transcrição STAT3 mediada pela via de sinalização de interleucina 6 (IL-6) em hepatocarcinoma celular (Roessler *et al.*, 2012; Ploeger *et al.*, 2016). SH2D4A interage fisicamente com STAT3, fazendo com que este fator de transcrição fique retido no citoplasma, impedindo que STAT3 entre no núcleo e ative a transcrição de genes envolvidos com a proliferação celular, sobrevivência e progressão do tumor (Ploeger *et al.*, 2016). Além disso, também foi observado neste estudo que SH2D4A e SORBS3, juntos, possuem uma melhor resposta para inibição do crescimento celular, quando comparado com a ação de cada um isoladamente.

Apesar das evidências apresentadas sobre a atuação desse gene como um potente supressor tumoral, ainda existem poucos estudos sobre essa proteína na literatura (11 artigos encontrados na base de dados PubMed quando se busca pelo

termo SH2D4A - Busca realizada em: 15/08/2017), principalmente envolvendo mecanismos celulares que regulam a depleção do gene e/ou baixa expressão dessa proteína em células tumorais. Deste modo, além de comprovar os resultados obtidos a partir do estudo iniciado com eIF5A, o presente estudo busca identificar novas características do gene e da proteína, que possam auxiliar no entendimento das funções desta proteína supressora de tumor.

## 2 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente estudo consiste em caracterizar e definir características estruturais e funcionais da proteína SH2D4A, em um modelo de células tumorais (adenocarcinoma de colo de útero - células HeLa), visando contribuir com o entendimento de sua ação como supressora tumoral.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a suposta hipusinação de SH2D4A por meio de imunoprecipitação da proteína endógena, seguido de separação da amostra imunoprecipitada por *SDS-PAGE* e identificação por espectrometria de massas.
- Validar a interação física de eIF5A-FLAG superexpressa e SH2D4A endógena por meio de ensaios de co-imunoprecipitação de eIF5A-FLAG, seguido de *immunoblotting* anti-SH2D4A.
- Analisar características estruturais da proteína SH2D4A por meio de análises de bioinformática.
- Clonar as variantes transcricionais 1 e 2 de SH2D4A em vetores pFLAG-CMV5a, seguido de sequenciamento de DNA para identificação de eventuais mutações no cDNA clonado.
- Avaliar a produção da proteína SH2D4A isoforma A a partir das variantes transcricionais 1 e 2, por meio de transfecção celular com os vetores plasmidiais construídos, seguido de avaliação do conteúdo proteico produzido por *immunoblotting*.
- Avaliar se a presença da *uORF* (*upstream Open Reading Frame*) na variante 1 afeta a expressão de SH2D4A em nível traducional, por meio da remoção dessa *uORF* através de uma mutação sítio dirigida, seguida de transfecção celular e avaliação do conteúdo proteico por *immunoblotting*.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Reagentes e anticorpos

Células de adenocarcinoma de colo de útero humano (HeLa) foram adquiridas do laboratório da Prof.<sup>a</sup> Dra. Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro (IB-UNICAMP). *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), L-Glutamina (200 mM), Penicilina/Estreptomicina (10.000 U/mL e 10.000 µg/mL, respectivamente), Soro Fetal Bovino (SFB), 0,25% Tripsina/EDTA e TRIzol® foram adquiridos da *Life Technologies Corporation* (Carlsbad, CA, EUA). Ácido acético glacial, *ACRYL/BIS™ 29:1 Solution*, ágar, agarose, azul de bromofenol, β-mercaptoetanol, *Bradford Reagent*, cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), dietilpirocarbonato (DEPC), dimetil sulfóxido (DMSO), ditioneitol (DTT), dodecilo sulfato de sódio (SDS), EDTA dissódico dihidratado, etanol, extrato de levedura, fosfato dissódico heptahidratado (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O), fosfato monopotássico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), glicerol, glicina, hidróxido de sódio (NaOH), isopropanol, metanol, triptona, Tris, Triton X-100 e Tween 20 foram adquiridos da Amresco (Solon, OH, EUA). DNase I, MgCl<sub>2</sub>, *Random Hexamer Primers*, dNTP mix, *Revertaid Premium Reverse Transcriptase*, *High Fidelity buffer with 15 mM MgCl<sub>2</sub>*, *High Fidelity enzyme mix*, *FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase*, *T4 DNA ligase*, *Lipofectamine 2000™*, *Pierce™ Protein A/G Agarose* e as enzimas de restrição *Hind III* e *Bam HI* foram adquiridos da *Thermo Fisher Scientific Inc.* (Waltham, MA, EUA). Ampicilina, carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>), cloreto de rubídio (RbCl<sub>2</sub>), formaldeído 37%, hidróxido de potássio (KOH), MOPS, *cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail*, *PhosSTOP™*, tiosulfato de sódio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>), resinas *ANTI-FLAG M2 Affinity Gel* e o peptídeo 3XFLAG foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O *Kit GFX PCR DNA and gel band purification*, *Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* e *Nitrocellulose Membrane Amersham Protan* foram adquiridos da *GE Healthcare* (Little Chalfont, Buckinghamshire, RU). *GenElute™ HP Plasmid Midiprep Kit* foi adquirido da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Plasmídeo pFLAG-CMV 5a (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, EUA) foi adquirido do laboratório da Prof.<sup>a</sup> Dra. Beatriz A. Castilho (UNIFESP). Todos os oligonucleotídeos utilizados foram obtidos da *Exxtend* (Paulínia, SP, Brasil). Anticorpo monoclonal produzido em coelho anti-FLAG foi adquirido da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Anticorpo policlonal produzido em coelho anti-SH2D4A

foi adquirido da Abcam (Cambridge, Reino Unido). Anticorpo monoclonal produzido em camundongo anti-GAPDH foi adquirido da *Life Technologies Inc.* (Nova York, NY, EUA).

### **3.2 Descongelamento, cultivo e subcultivo da linhagem celular de adenocarcinoma de colo de útero humano (HeLa)**

Células HeLa ( $1-2 \times 10^6$ ) armazenadas em nitrogênio líquido foram submetidas a um rápido descongelamento em banho-maria 37°C e transferidas para um tubo cônico contendo 10 mL de DMEM suplementado com 10% SFB, 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (DMEM completo). A suspensão celular foi centrifugada a 130 xg por 10 minutos a temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado. As células foram suspensas em 10 mL de DMEM completo. A suspensão celular foi transferida para uma placa de 100 mm (diâmetro) em um volume total de 10 mL de DMEM completo por placa. As células foram mantidas em estufa umidificada a 37°C contendo 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi trocado a cada dois dias até a cultura atingir confluência em torno de 90%. O subcultivo foi realizado após remoção do meio de cultura, lavagem com 3 mL de PBS 1X (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), adição de 1 mL de 0,25% Tripsina/EDTA e incubação por 1 minuto a 37°C. Em seguida, as células foram suspensas na placa e a neutralização da tripsina foi realizada com a adição de 1 mL de DMEM completo. Após a suspensão das células o volume foi ajustado para possibilitar a expansão das células para o número de placas desejado. O procedimento de subcultivo ou o plaqueamento das células para a execução dos experimentos foi realizado toda vez que as células atingiam confluência em torno de 90%.

### **3.3 Extração de RNA total utilizando TRIzol®**

O preparo de RNA total de células HeLa foi realizado a partir de 1 placa de 100 mm de diâmetro com células em crescimento, apresentando de 60-80% de confluência, a qual foi homogeneizada em 1 mL do reagente TRIzol®. Após 5 minutos de incubação a temperatura ambiente foi acrescentado 200 µL de clorofórmio. Após homogeneização, a mistura foi submetida à centrifugação 12.000 xg por 15 minutos a 4°C e a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo. A



seguir, foi adicionado 500  $\mu$ L de isopropanol gelado no microtubo, o qual foi incubado por 10 minutos a temperatura ambiente e centrifugado a 12.000  $\times$ g por 10 minutos a 4°C. O precipitado de RNA formado foi lavado com 1 mL de etanol 75% e centrifugado a 12.000  $\times$ g por 5 minutos a 4°C. A seguir, o precipitado foi mantido a temperatura ambiente para secagem por 5 minutos e em seguida suspenso em 40  $\mu$ L de água ultrapura tratada com DEPC. A amostra foi mantida em banho seco a 60°C por 10 minutos e, por fim, armazenada a -80°C. Uma alíquota foi quantificada por leitura em espectrofotômetro a 260 nm ( $A_{260}$  nm = 1 corresponde a 40  $\mu$ g/mL) e o grau de pureza determinado pela razão 260/280 nm (razão entre 1,8 e 2 indica o grau aceitável de pureza).

### 3.4 Transcrição reversa (RT): Síntese de cDNA

Para a obtenção do cDNA a partir do RNA total de células HeLa, 2  $\mu$ g de RNA total foi tratado com DNase I, adicionando-se 1  $\mu$ L de tampão de DNase I 10x (100 mM Tris-HCl pH 7,5; 25 mM  $MgCl_2$  e 1 mM  $CaCl_2$ ), 1  $\mu$ L da enzima DNase I e o volume foi completado com água ultrapura-DEPC para 10  $\mu$ L. Em seguida, as amostras foram mantidas no termociclador por 30 minutos a 37°C. A inibição da DNase I foi realizada pela adição de 1  $\mu$ L de EDTA (25 mM) e incubação por 10 minutos a 65°C. Posteriormente, foi adicionado 1  $\mu$ L de 100  $\mu$ M *random hexamer primers*, 1  $\mu$ L de 10 mM dNTPmix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) e 2  $\mu$ L de água ultrapura-DEPC. As amostras foram incubadas por 5 minutos a 65°C e resfriadas rapidamente em gelo. A seguir, foi acrescentado 1  $\mu$ L da enzima *RevertAid Premium Reverse Transcriptase* (RT) e 4  $\mu$ L de tampão da RT 5X. As amostras foram incubadas por 10 minutos a 25°C, 30 minutos a 50°C e 5 minutos a 85°C. O cDNA obtido foi armazenado a -20°C.

### 3.5 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

O conteúdo dos transcritos de interesse (SH2D4A variantes 1, X1, 2 e X2) foram avaliados a partir da amplificação por PCR. As reações foram realizadas em 37,7  $\mu$ L de água ultrapura contendo 200 ng de cDNA, 0,3  $\mu$ M oligonucleotídeos (sense e antisense), 0,2 mM de dNTPmix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 5  $\mu$ L de 10X *High Fidelity buffer with 15 mM  $MgCl_2$*  e 2,5 u de *High Fidelity enzyme mix*, totalizando um volume final de 50  $\mu$ L. Em seguida, a reação foi realizada utilizando

as seguintes condições: 94°C por 1 minuto, seguida por 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, seguido por um ciclo de 72°C por 10 minutos. Ao término da reação as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1%. Os oligonucleotídeos utilizados na reação e as construções obtidas estão representados no Quadro 1, a seguir:

**Quadro 1 - Construções obtidas e oligonucleotídeos utilizados no experimento de PCR para clonagem do gene SH2D4A a partir de cDNA de células HeLa**

Construções	Oligonucleotídeos	Sequência
pV1(SH2D4A)-FLAG	oFCA – 25F	5' TACAAGCTTAGTCACCCCGGCATGTGGGCG 3'
	oFCA – 17R	5' TACGGATCCCTCAAACAGCTCCAGGTA 3'
pV1(SH2D4A)-MUT-FLAG	oFCA – 37F	5' TACAAGCTTAGTCACCCCGGCACGTGGGCG 3'
	oFCA – 17R	5' TACGGATCCCTCAAACAGCTCCAGGTA 3'
pV2(SH2D4A)-FLAG	oFCA – 26F	5' TACAAGCTTAGAAGTGCAAAGATGCTGAAA 3'
	oFCA – 17R	5' TACGGATCCCTCAAACAGCTCCAGGTA 3'

**Legenda:** AAGCTT = Sítio de restrição *Hind* III.

GGATCC = Sítio de restrição *Bam* HI.

### 3.6 Clonagem do cDNA de SH2D4A utilizando os produtos da PCR

#### 3.6.1 Preparação do inserto

Produtos da PCR purificados que se destinam a clonagem foram submetidos à digestão com as enzimas de restrição requeridas (*Hind* III e *Bam* HI) seguindo as condições recomendadas pelo fabricante (*Thermo Fisher Scientific Inc.*, Waltham, MA, EUA). Os sítios de restrição estão presentes nas extremidades do produto amplificado, decorrente da presença destes sítios nos oligonucleotídeos utilizados. Os produtos de digestão foram purificados após eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando o *Kit GFX PCR DNA and gel band purification* (*GE Healthcare*, Little Chalfont, Buckinghamshire, RU).

### 3.6.2 Digestão e defosforilação do vetor plasmidial

O vetor plasmidial pFLAG-CMV 5a foi digerido com as enzimas de restrição seguindo as condições recomendadas pelo fabricante (*Thermo Fisher Scientific Inc.*, Waltham, MA, EUA). Após digestão plasmidial, o vetor foi defosforilado com a enzima *FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase* seguindo as condições recomendadas pelo fabricante (*Thermo Fisher Scientific Inc.*, Waltham, MA, EUA) e purificado após eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando o *Kit GFX PCR DNA and gel band purification* (*GE Healthcare*, Little Chalfont, Buckinghamshire, RU).

### 3.6.3 Reação de ligação

A reação de ligação foi realizada utilizando um volume final de 20  $\mu$ L, com um excesso de inserto em relação ao vetor numa proporção de 5:1 e 5 u da enzima *T4 DNA ligase* (*Thermo Fisher Scientific Inc.*, Waltham, MA, EUA). A reação foi incubada a 22°C por 1 hora. O produto da ligação foi introduzido em *E. coli* competentes utilizando o protocolo de transformação de bactérias competentes (método 3.8).

### 3.7 Preparo de *E. coli* quimiocompetentes

Um tubo de *E. coli* quimiocompetente foi descongelado em banho de gelo, seu conteúdo foi transferido para um pré-inóculo contendo 5 mL de meio LB líquido (10 g/L triptona; 5 g/L extrato de levedura e 10 g/L NaCl) e incubado a 37°C *overnight* sob agitação de 200 rpm. O pré-inóculo produzido foi diluído em 200 mL de meio LB líquido e incubado a 37°C sob agitação a 200 rpm até atingir DO<sub>600nm</sub> próximo a 0,700. Após atingir a DO, a cultura bacteriana foi centrifugada a 1.700  $\times$ g por 10 minutos a 4°C. Posteriormente, o sobrenadante foi desprezado e as células suspensas em 25 mL do tampão de transformação I gelado (6 mL de KOH 1M; 6 mL de ácido acético 1M; 10 mL de MgCl<sub>2</sub> 1 M; 2,41g de RbCl<sub>2</sub>; 0,294 g de CaCl<sub>2</sub> e 27 mL glicerol 100% - pH final: 5,8). As células foram incubadas em banho de gelo por 15 minutos e centrifugadas novamente a 1.700  $\times$ g por 10 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e as células foram suspensas em 8 mL do tampão de transformação II gelado (0,42 g de MOPS; 0,24 g de RbCl<sub>2</sub>; 2,2 g de CaCl<sub>2</sub> e 27 mL glicerol 100% - pH final: 7,0). No final, foram preparadas alíquotas de

150 µL da suspensão bacteriana em tubos de microcentrífuga estéreis, que foram armazenados a -80°C até o uso para transformação de bactérias quimiocompetentes utilizando os plasmídeos construídos.

### **3.8 Transformação de *E. coli* quimiocompetentes**

Tubos de microcentrífuga contendo 150 µL de células de *E. coli* competentes armazenadas a -80°C foram descongeladas em banho de gelo. Em seguida, foram adicionados 10 µL da reação de ligação do DNA plasmidial com o inserto em cada um dos tubos identificados. Os tubos foram mantidos em gelo por 20 minutos, seguido de um choque térmico em banho-maria a 42°C por 50 segundos e novamente no gelo por 2 minutos. A seguir, 850 µL de meio LB líquido foram adicionados aos tubos, os quais foram incubados a 37°C por 1 hora sob agitação a 200 rpm. Após o período de incubação, 50-100 µL das culturas de bactérias foram semeados em placas de Petri contendo meio LB-Ágar (sólido) acrescidas de ampicilina (100 µg/mL). Como controle negativo foi utilizado células competentes não transformadas com DNA plasmidial ou transformadas com vetor vazio (sem inserto). As placas foram incubadas *overnight* a 37°C.

### **3.9 Preparação de DNA plasmidial de *E. coli* em pequena escala (Miniprep) – Método de lise alcalina**

Colônias isoladas de células da linhagem de *E. coli* contendo os plasmídeos de interesse foram selecionadas e inoculadas em 3 mL de meio LB acrescido de ampicilina (100 µg/mL) e incubadas a 37°C por aproximadamente 8 horas sob agitação a 200 rpm. As culturas foram centrifugadas a 12.000 xg por 1 minuto a temperatura ambiente. As células foram suspensas em 200 µL do tampão I gelado (50 mM glicose; 25 mM Tris-HCl pH 7,4; 10 mM EDTA pH 8,0) com a utilização de um vortex. Em seguida, foram adicionados 200 µL do tampão II preparado na hora (0,2 M NaOH e 1% SDS) e os tubos foram invertidos de 3 a 5 vezes. Depois, foram adicionados mais 150 µL do tampão III (3 M acetato de sódio pH 4,8), os tubos foram novamente invertidos de 3 a 5 vezes e incubados em banho de gelo por 10 minutos. Após a incubação, os tubos foram centrifugados a 12.000 xg por 5 minutos a 4°C. Em seguida, os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos, nos quais foram adicionados isopropanol (100%) gelado (2 vezes o volume da amostra,

~850 µL) e os tubos foram invertidos de 3 a 5 vezes. Depois, as amostras foram centrifugadas a 12.000  $\times$ g por 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados foram lavados duas vezes com 200 µL de etanol 70%. A cada lavagem os precipitados de DNA foram centrifugados a 12.000  $\times$ g por 5 minutos a 4°C. Por último, o etanol foi removido e os *pellets* de DNA foram secos a temperatura ambiente nos tubos com a tampa aberta. Depois de secos, os *pellets* de DNA foram suspensos em 50 µL de tampão de eluição (25 mM Tris-HCl pH 7,4; 10 mM EDTA pH 8,0 e 20 µg/µL RNase) e incubados em banho-maria a 37°C por 15 minutos. As amostras foram armazenadas a -20°C para posterior análise de restrição dos plasmídeos obtidos na clonagem.

### **3.10 Preparação de DNA plasmidial de *E. coli* em média escala (Midiprep)**

Colônias isoladas de células da linhagem de *E. coli* contendo os plasmídeos de interesse foram selecionadas e inoculadas em 3 mL de meio LB acrescido de ampicilina (100 µg/mL) e incubadas a 37°C por aproximadamente 8 horas sob agitação a 200 rpm. Em seguida, 1 mL desse pré-inóculo foi inoculado em 100 mL de LB acrescido de ampicilina (100 µg/mL) e incubado a 37°C por 18 horas sob agitação a 200 rpm. As células foram coletadas por centrifugação a 5.000  $\times$ g por 10 minutos e os plasmídeos foram purificados utilizando o kit *GenElute™ HP Plasmid Midiprep* (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante.

### **3.11 Sequenciamento de DNA utilizando o método de Sanger**

Os clones produzidos a partir da clonagem do gene de SH2D4A foram enviados para sequenciamento pela empresa Biotecnologia, Pesquisa e Inovação (BPI, Botucatu, SP, Brasil) utilizando o sequenciador convencional Life ABI 3500. As amostras de DNA foram enviadas em uma concentração de 20 ng/µL e foi utilizado 400 ng de DNA por reação de sequenciamento. Os primers para sequenciamento (Quadro 2) foram enviados a uma concentração de 5 µM. As etapas realizadas para o sequenciamento foram: purificação da amostra com AmPure XP; preparo da reação de sequenciamento; sequenciamento na plataforma Life ABI 3500 e emissão das sequências na extensão .ab1. As sequências obtidas foram analisadas

utilizando o software BioEdit v 7.2.5 (Carlsbad, CA, EUA) e também a ferramenta BLASTn disponível no site do *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*.

**Quadro 2 - Oligonucleotídeos utilizados para sequenciamento dos clones obtidos na clonagem do gene SH2D4A a partir de cDNA de células HeLa.**

Oligonucleotídeos	Alvo	Sequência
oFCA – 32F	pFLAG-CMV 5a	5' GCACCAAAATCAACGGGA 3'
oFCA – 33F	SH2D4A	5' GATGCTGAAACAGATAC 3'
oFCA – 25R	pFLAG-CMV 5a	5' TATTAGGACAAGGCTGGTGG 3'
oFCA – 26R	SH2D4A	5' ATGTCCTCTTGGGCAGAG 3'

**3.12 Transfecção celular utilizando os plasmídeos construídos para expressar SH2D4A-FLAG ou eIF5A-FLAG obtidos por Pereira *et al.* (2016)**

Células HeLa foram plaqueadas em placas de 6 poços ( $3 \times 10^5$  células por poço – 2 mL) ou em placas de 150 cm<sup>2</sup> ( $4 \times 10^6$  células por placa – 18 mL) aproximadamente 18 horas antes da transfecção. Para transfecção nas placas de 6 poços foram preparados tubos contendo 250 µL de meio de cultura sem soro fetal bovino com 1,5 µg do plasmídeo pGFP-FLAG e 4,5 µg para os plasmídeos que expressam SH2D4A-FLAG e tubos contendo 250 µL de meio de cultura sem soro fetal bovino com 5 µL de *Lipofectamine 2000*<sup>TM</sup> (*Thermo Fisher Scientific Inc.*, Waltham, MA, EUA). Para as placas de 150 cm<sup>2</sup> foram preparados tubos contendo 8 mL de meio de cultura sem soro fetal bovino com 30 µg do DNA a ser transfectado (plasmídeos que expressam as proteínas: GFP-FLAG, eIF5A isoforma A-FLAG e eIF5A isoforma B-FLAG) e tubos contendo 8 mL de meio de cultura sem soro fetal bovino com 30 µL de *Lipofectamine 2000*<sup>TM</sup> (*Thermo Fisher Scientific Inc.*, Waltham, MA, EUA). Os tubos contendo DNA foram adicionados nos tubos contendo lipofectamina e incubados por 5 minutos a temperatura ambiente para a formação dos complexos DNA-lipossomos. O complexo formado foi adicionado sobre as células, as quais foram incubadas a 37°C por 6 horas em estufa contendo 5% CO<sub>2</sub>. Após o período de incubação, o meio sem soro foi trocado por meio enriquecido com soro fetal bovino (10% SFB) e as placas foram novamente incubadas a 37°C em estufa contendo 5% CO<sub>2</sub>. As análises foram realizadas 24 horas após a transfecção.

### **3.13 Análise do conteúdo proteico produzido pelos diferentes plasmídeos que expressam SH2D4A-FLAG**

#### **3.13.1 Preparo de extratos proteicos, quantificação de proteína total e preparo das amostras para *SDS-PAGE***

Após a transfecção celular, as placas de 6 poços transfectadas com os plasmídeos que expressam a proteína SH2D4A-FLAG foram lavadas com PBS 1X e coletadas utilizando 30 µL de tampão de lise para proteínas (100 mM Tris-HCl pH 7,4; 10 mM EDTA pH 8,0; 1 mM DTT; 1% Triton-X100, 1x coquetel de inibidores de protease (cOmplete™) e 1x coquetel inibidor de fosfatases (PhosSTOP™)) com auxílio de um raspador. A seguir, os extratos foram mantidos em banho de gelo por 25 minutos com agitação a cada 5 minutos utilizando vortex. As amostras foram centrifugadas a 12.000 xg por 10 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos e submetidos à quantificação proteica no espectrofotômetro (absorbância a 595 nm) utilizando o método de Bradford (Noble e Bailey, 2009). Após a quantificação proteica, foram utilizados 30 µg de todas as amostras para a detecção das proteínas de interesse, as quais foram preparadas para aplicação no gel de poliacrilamida com adição de *Loading Buffer* 3X (1,5 mL de Tris-HCl 1 M pH 6,8; 0,6 g de SDS; 3 de mL glicerol; 0,3 mg de azul bromofenol; 1,5 mL de β-mercaptoetanol diluídos em H<sub>2</sub>O q.s.p 10 mL) para concentração final na amostra de *Loading Buffer* 1X. Em seguida, as amostras foram fervidas a 95°C por 5 minutos em banho seco e armazenadas no gelo até aplicação no gel.

#### **3.13.2 *SDS-PAGE* (Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) seguido de immunoblotting**

Após o preparo, as amostras foram aplicadas e separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, utilizando tampão de corrida (50 mM Tris; 0,38 M glicina; 1,8 mM EDTA; 0,1% SDS) a 100 V até a separação desejada das proteínas. Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose utilizando um sistema de transferência úmido sob diferença de potencial de 100 V por 1 hora, utilizando tampão de transferência (24,8 mM Tris; 192 mM glicina; 10% metanol). Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi bloqueada a temperatura ambiente por 40 minutos em tampão TBS-T (10 mM Tris-

HCl; 150 mM NaCl e 0,02% Tween-20) contendo 5% leite desnatado. Em seguida, a membrana foi incubada *overnight* com diluições adequadas de anticorpos primários diluídos em TBS-T contendo 5% leite desnatado. Anticorpos primários utilizados: *Rabbit* anti-FLAG (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) diluído 1:10.000; *Mouse* anti-GAPDH (*Life Technologies, Inc.*, Nova York, EUA) diluído 1:2.000 e *Rabbit* anti-SH2D4A (Abcam, Cambridge, Reino Unido) diluído 1:1.000. Após esse período, as membranas foram lavadas 5 vezes por 5 minutos cada lavagem com TBS-T e incubadas a temperatura ambiente por 1 hora com anticorpos policlonais anti-IgG conjugados à peroxidase diluídos em TBS-T contendo 5% leite desnatado. Cada anticorpo secundário utilizado era específico para os animais nos quais os anticorpos primários foram produzidos. Após 5 novas lavagens de 5 minutos cada com TBS-T, as membranas foram tratadas com reagentes quimioluminescentes e reveladas em um equipamento fotodocumentador *G:BOX Chemi XRQ* que utiliza como *software* o *GeneSys* ou foram expostas a um filme autorradiográfico utilizando as soluções reveladora e fixadora (Kodak).

### **3.14 Co-Imunoprecipitação de eIF5A-FLAG para análise por espectrometria de massas e por *SDS-PAGE* seguido de *immunoblotting***

Para a realização da co-imunoprecipitação de proteínas que interagem com eIF5A-FLAG superexpressa foram utilizadas duas placas de 150 cm<sup>2</sup> transfectadas (plasmídeos que expressam as proteínas: GFP-FLAG, eIF5A isoforma A-FLAG e eIF5A isoforma B-FLAG) para cada uma das amostras. Após 24 horas de transfecção, as células foram lavadas 3 vezes com PBS 1X e coletadas em PBS 1X cuidadosamente com auxílio de um raspador. Em seguida, as células foram centrifugadas a 150 xg por 10 minutos a 4°C. O PBS foi removido e foram adicionados 400 µL do tampão de lise para IP (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA pH 8.0 e 1x coquetel de inibidores de protease (cOmplete™)) às células precipitadas. As células foram incubadas com o tampão de lise por 15 minutos a 4°C sob leve agitação, seguido de centrifugação a 12.000 xg, por 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos e os conteúdos proteicos foram quantificados pelo método de Bradford (Noble e Bailey, 2009). Para remoção do glicerol, 20 µL de resina *ANTI-FLAG M2 Affinity Gel* (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foram lavados 3 vezes com 1 mL de TBS 1X gelado,



centrifugando a 3.000  $\times$ g por 3 minutos a 4°C em cada lavagem. Foram adicionados às resinas 2.000 ng de proteína total. Os extratos proteicos com as resinas foram incubados *overnight* a 4°C sob leve agitação. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 8.200  $\times$ g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado e as resinas foram lavadas 5 vezes com 1 mL de TBS 1X gelado, centrifugando os tubos a 8.200  $\times$ g por 3 minutos a 4°C em cada lavagem. Após as lavagens, a eluição das proteínas precipitadas com a resina foi feita utilizando o peptídeo 3XFLAG (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) a uma concentração final de 300 ng/ $\mu$ L em um volume final de 100  $\mu$ L. Os eluídos dessas co-imunoprecipitações foram analisados por espectrometria de massas em solução e também das bandas recortadas do gel após separação por *SDS-PAGE* e coloração com nitrato de prata (método 3.16 e 3.17). Outras co-imunoprecipitações de eIF5A-FLAG foram realizadas da mesma maneira para utilização na detecção de SH2D4A endógena por *SDS-PAGE* seguido de *immunoblotting* (método 3.13.2) nos eluídos dessas amostras.

### **3.15 Imunoprecipitação de SH2D4A endógena para análise por espectrometria de massas**

Para a realização da imunoprecipitação da proteína SH2D4A endógena e análise por espectrometria de massas foram utilizadas duas placas de 150 cm<sup>2</sup> não transfectadas. As células foram lavadas 3 vezes com PBS 1X e coletadas em PBS 1X cuidadosamente com auxílio de um raspador. Em seguida, as células foram centrifugadas a 150  $\times$ g por 10 minutos a 4°C. O PBS foi removido e foram adicionados 400  $\mu$ L do tampão de lise para IP (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA pH 8.0 e 1x coquetel de inibidores de protease (cOmplete™)) às células precipitadas. As células foram incubadas com o tampão de lise por 15 minutos a 4°C sob leve agitação, seguido de centrifugação a 12.000  $\times$ g, por 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram transferidos para um novo tubo e o conteúdo proteico foi quantificado pelo método de Bradford (Noble e Bailey, 2009). Um dia antes da coleta, as resinas *Pierce™ Protein A/G Plus Agarose* (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA) foram preparadas. Para a remoção do glicerol, 30  $\mu$ L de resinas foram lavadas 3 vezes com 1 mL de TBS 1X gelado, centrifugando a 3.000  $\times$ g por 3 minutos a 4°C em cada lavagem. Em seguida, foi adicionado 10  $\mu$ L de anticorpo *Rabbit* anti-SH2D4A (Abcam, Cambridge, Reino

Unido) e as resinas foram incubadas com o anticorpo *overnight* a 4°C sob leve agitação. No dia da coleta, as resinas conjugadas ao anticorpo foram centrifugadas a 3.000  $\times$ g por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante foi guardado para controle. Em seguida, foram adicionados às resinas 3.000 ng de proteína total. Os extratos proteicos com as resinas foram incubados *overnight* a 4°C sob leve agitação. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 8.200  $\times$ g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado, e as resinas foram lavadas 5 vezes com 1 mL de TBS 1X gelado, centrifugando os tubos a 8.200  $\times$ g por 3 minutos a 4°C em cada lavagem. Após as lavagens, a eluição das proteínas precipitadas com a resina foi feita utilizando 50  $\mu$ L de tampão de eluição SDS 1X, o qual foi incubado com as resinas por 15 minutos sob leve agitação a temperatura ambiente e depois foi fervido a 95°C por 5 minutos. Os eluídos dessas imunoprecipitações foram diretamente aplicados no gel de poliacrilamida e separados por eletroforese, em seguida, o gel foi corado com nitrato de prata e as bandas de interesse foram recortadas para análise no espectrômetro de massas (método 3.16 e 3.18).

### **3.16 Coloração de gel de poliacrilamida com nitrato de prata**

Após a realização do *SDS-PAGE*, foi adicionada a Solução I (50% metanol, 3% ácido acético, 25  $\mu$ L formaldeído 37%) e o gel foi incubado sob leve agitação por 30 minutos. Após a incubação, a solução I foi retirada e reservada, a Solução II (35% etanol) foi adicionada e o gel foi mantido sob leve agitação por 5 minutos. Em seguida, após a retirada da solução II foi adicionada a Solução III (10 mg de tiosulfato de sódio) e o gel foi incubado sob leve agitação por 2 minutos. Após a remoção da Solução III, a Solução IV (100 mg de nitrato de prata, 36  $\mu$ L de formaldeído 37%) foi adicionada e o gel foi incubado nessa solução por 10 minutos. Em seguida, foi adicionada a Solução V (3 g de carbonato de sódio, 25  $\mu$ L de formaldeído e 1 mL da solução III) e o gel foi agitado levemente até o aparecimento das bandas. Para pausar a reação, a Solução V foi retirada e foi adicionada novamente a Solução I reservada. Após cada incubação com as soluções, foram realizadas três lavagens com água destilada. Cada solução foi utilizada em um volume de 50 mL e as incubações foram realizadas a temperatura ambiente.

### 3.17 Espectrometria de massa para análise das co-imunoprecipitações de eIF5A-FLAG – Realizada no LNBio em Campinas

Amostras provenientes de co-imunoprecipitação foram tratadas com 5 mM DTT durante 25 minutos a 56°C, seguido de alquilação na presença de 14 mM iodoacetamida por 30 minutos a temperatura ambiente e de um segundo tratamento com 5 mM DTT por 15 minutos a temperatura ambiente. Após adição de 1 mM CaCl<sub>2</sub>, foi adicionado tripsina na proporção de 1:50 em relação à quantidade de proteína total presente na amostra. A reação de digestão foi realizada a 37°C por 16 horas. Após este período, a reação foi interrompida pela adição de 0,4% ácido fórmico e os peptídeos resultantes foram purificados em coluna e liofilizados.

A mistura de proteínas obtidas na co-imunoprecipitação também foi separada por *SDS-PAGE* e coradas com nitrato de prata. Após a separação das proteínas, as bandas foram recortadas e submetidas ao tratamento com 50% metanol e 2,5% ácido acético por 2 horas a temperatura ambiente a fim de remover o SDS. Após redução com 10 mM DTT por 30 minutos a temperatura ambiente e alquilação com 50 mM iodoacetamida por 30 minutos a temperatura ambiente, as bandas foram lavadas com 100 mM bicarbonato de amônio e incubadas na presença de tripsina na concentração final de 20 ng/μL por 16 horas a 37°C. Os fragmentos foram extraídos das respectivas bandas pelo tratamento com 5% ácido fórmico e em seguida, liofilizados.

Os peptídeos foram suspensos e cerca de 4,5 μL da mistura resultante foi separada por cromatografia líquida de ultra performance (C18 -100 μm x 100 mm-RP-nanoUPLC; nanoAcquity, Waters) acoplada ao espectrômetro de massas *Q-ToF PREMIER* (Waters). Os espectros foram obtidos utilizando o programa *MassLynx v.4.1* e os dados brutos foram convertidos no formato .mgf pelo programa *Mascot Distiller v.2.3.2.0*, 2009 (Matrix Science Ltd.) e utilizados em buscas contra o banco de dados de proteínas humanas (86392 sequências e 35093930 resíduos de aminoácidos, conforme disponível em Abril de 2013) utilizando o *Mascot engine v.2.3.01* (Matrix Science Ltd.). Os peptídeos foram considerados únicos quando diferiram em pelo menos um resíduo de aminoácido. Aqueles que diferiram entre si apenas por uma extensão amino ou carboxi terminal (devido à ausência de clivagem em um determinado sítio) foram considerados como distintos. Foram considerados somente os peptídeos únicos, com no mínimo cinco resíduos de aminoácidos e que

foram identificados pelo *Mascot* de modo confiável do ponto de vista estatístico ( $p < 0.05$ ).

A identificação das proteínas co-purificadas com a proteína eIF5A, bem como daquelas que foram diferentemente co-purificadas entre as mesmas foi feita utilizando o programa *Scaffold Q+* (version 3.4.5, Proteome Software) a partir dos dados .dat gerados pelo *Mascot*. Nestas análises, foram considerados os valores normalizados da contagem de espectros.

### **3.18 Espectrometria de massa para análise das imunoprecipitações de SH2D4A endógena – Realizada no Instituto Butantã em São Paulo**

As amostras obtidas da imunoprecipitação de SH2D4A endógena foram separadas por *SDS-PAGE*. Em seguida, o gel de poliacrilamida foi corado com nitrato de prata e as bandas foram recortadas para análise no espectrômetro de massas. As bandas recortadas foram submetidas ao tratamento com 50% metanol e 2,5% ácido acético por 2 horas a temperatura ambiente a fim de remover o SDS. Depois, as amostras foram lisadas com ureia 8M, foi adicionado 5  $\mu$ L de ditioneitol 1M (DTT) para redução das pontes dissulfeto e foram incubadas por 1,5 horas em temperatura ambiente. Após a incubação com DTT, foi adicionado 20  $\mu$ L de iodoacetamida para a alquilação das cisteínas por 1 hora no escuro em temperatura ambiente. Para consumir a iodoacetamida que não reagiu, foram adicionados 20  $\mu$ L de DTT e incubado por mais 1h. Após a incubação, foram adicionados 775  $\mu$ L de água Milli-Q e 2  $\mu$ L de tripsina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) quantidade suficiente para se obter uma razão proteica de 1:50 e então incubado a 37°C durante uma noite. No dia seguinte, a reação foi interrompida adicionando-se 2  $\mu$ L de ácido acético 100%.

As amostras foram dessalinizadas utilizando colunas de extração em fase sólida *Sep-Pak Light tC18* (Waters Corporation, Estados Unidos). Inicialmente, as colunas foram condicionadas com 2 mL de metanol, seguido de 2 mL de ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% e acetonitrila (ACN) 50% e 1 mL de TFA 0,1%, após o condicionamento, a amostra foi carregada com 1 mL de TFA 0,1% duas vezes, lavada com TFA 0,1%, e eluída da coluna com 2 mL de TFA 0,1% e ACN 50% transferindo lentamente para um tubo novo de 2 mL, em seguida o *Sep-Pak* foi lavado com 2 mL de ACN 100%. As amostras foram secadas e concentradas em

*Speed-Vac* (RVC 2-18, CHRIST, Analítica). Após a secagem completa, as amostras foram ressuspensas em 20 µL de ácido fórmico 0,1% e centrifugadas a 1.000 rpm por 5 minutos para análise no espectrômetro de massas.

Cinco microgramas de cada amostra foram analisados no espectrômetro de massas *LTQ Orbitrap Velos* (*Thermo Fisher Scientific Inc.*, Waltham, MA, EUA) acoplado ao cromatógrafo líquido de nano-fluxo *EASY-nLC* (*Thermo Fisher Scientific Inc.*, Waltham, MA, EUA). Os peptídeos foram separados por um programa de gradiente de 120 minutos, da seguinte forma: 5-40% do solvente B (90% acetonitrila em 0,1% de ácido fórmico) por 90 minutos, seguido por 40-90% do solvente B por 20 minutos no fluxo de 200 nL/min usando uma pré coluna empacotada com 5 cm de *beads* de C18 de 10 µm (Jupiter, Phenomenex) em um capilar de dimensões ID 100 µm x OD 360 µm e uma coluna analítica de ponta com *frit* empacotada com 15 cm de *beads* C18 de 5 µm (Aqua, Phenomenex) em um capilar de dimensões ID 75 µm x OD 360 µm. O espectrômetro de massas foi operado em modo de aquisição dependente de dados (DDA, do inglês *Data Dependent Acquisition*), no qual os 10 íons mais intensos de cada amostra foram selecionados para a fragmentação no *ion trap* linear utilizando a dissociação por fragmentação por colisão induzida por dissociação (CID) em MS/MS. A aquisição dos dados foi controlada pelo programa de computador *Xcalibur 1.4* (*Thermo Fisher Scientific Inc.*, Waltham, MA, EUA). De modo geral, as condições de análise foram: voltagem no capilar do nano-*electrospray* de 2,3 kV, temperatura da fonte a 250°C, tempo de injeção no *ion-trap* ajustado a 100 ms e no FT-MS em 1000 ms com uma resolução de 60.000 em m/z 300-1800. O tempo de exclusão dinâmica foi ajustado para 70 segundos. Os arquivos de dados (.raw) foram convertidos para .mgf usando o software *MS Convert* (v.3.0.4445, ProteoWizard, SourceForge) e analisados no *Mascot* (v.2.4, Matrix Science Ltd, Boston, MA, USA). As proteínas foram identificadas através da pesquisa de dados MS e MS/MS em banco de dados *Homo sapiens* baixados do *NCBI*. A tripsina foi definida para a especificidade das enzimas com no máximo duas *miss cleavages*, foram selecionados as massa monoisotópicas, a tolerância da massa dos peptídeos 10 ppm, tolerância dos íons precursores foi ajustado para 0,17. Na busca dos espectros MS/MS foram determinadas como modificação fixa a carbamidometilação de resíduos de cisteína, enquanto que a presença do aminoácido hipusina e fosforilação S/T foram definidas como modificações variáveis.

Obs.: A digestão trípica, dessanilização e a análise por LC-MS foram realizadas no laboratório do pesquisador colaborador Dr. Leo Key Iwai do Instituto Butantã-SP.

### **3.19 Análises de bioinformática**

As sequências das proteínas e informações sobre o gene e as variantes transcricionais foram obtidas no site do *National Center for Biotechnology Information*, disponível em (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). O alinhamento das sequências das proteínas foi realizado utilizando a ferramenta de análise *EMBL-EBI/Clustal Omega*, disponível em (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). As predições das estruturas 3D das proteínas foram realizadas utilizando o *software RaptorX web Server*, disponível em (<http://raptorx.uchicago.edu/>). As análises de predição dos sítios de fosforilação foi realizada no *software NetPhos 2.0 server*, disponível em (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Identificação da proteína SH2D4A em imunoprecipitados de eIF5A-FLAG revelou a possível existência de uma nova proteína contendo o resíduo de aminoácido hipusina.

Com o objetivo de avaliar as proteínas que co-imunoprecipitavam com a proteína eIF5A, células HeLa foram transfectadas por 24 horas com vetores plasmidiais capazes de produzir a proteína eIF5A em fusão com o peptídeo FLAG por meio da utilização das construções pEIF5A VABM-FLAG e pEIF5A VB-FLAG (Pereira *et al.*, 2016). Após transfecção, as células foram coletadas e o extrato proteico foi preparado para a realização de um ensaio de co-imunoprecipitação utilizando anticorpo anti-FLAG conjugado à resina de agarose. Em seguida, a proteína eIF5A-FLAG foi precipitada juntamente com a resina por centrifugação e após as etapas de lavagem as proteínas precipitadas foram eluídas. Algumas amostras de produtos de eluição foram diretamente preparadas para análise no espectrômetro de massas, enquanto outras amostras foram separadas em um gel de poliacrilamida, coradas com nitrato de prata, recortadas as bandas de interesse e depois preparadas para análise no espectrômetro de massas.

Como resultado destas análises obteve-se uma lista de proteínas e a proteína SH2D4A nos despertou a atenção, pois peptídeos supostamente derivados de SH2D4A apresentavam um resíduo de aminoácido hipusina na posição 59 (Figura 5). A fim de obter a validação desse resultado, foram realizados ensaios de imunoprecipitação da proteína SH2D4A endógena. Os eluídos destas imunoprecipitações foram fracionados em um gel de poliacrilamida e corados com nitrato de prata. Em seguida, as bandas de interesse foram recortadas e preparadas para análise no espectrômetro de massas. Entretanto, os peptídeos de SH2D4A identificados nesta análise não cobriram a região na qual foi identificada anteriormente a suposta hipusinação desta proteína (Figura 6).

```

1  MLKQILSEMY IDPDLLAELS EEQKQILFFK MREEQIRRWK EREAAMERKE SLPVKPRPKK 60
61  ENGKSVHWKL GADKEVWVWV MGEHHLDKPY DVLCNEIIAE RARLKAEQEA EEPRKTHSEE 120
121 FTNSLKTKSQ YHDLQAPDNQ QTKDIWKKVA EKEELEQGSR PAPTLEEEKI RSLSSSSRNI 180
181 QQMLADSINR MKAYAFHQKK ESMKKKQDEE INQIEEERTK QICKSWKEDS EWQASLRKSK 240
241 AADEKRRSLA KQAREDYKRL SLGAQKGRGG ERLQSPLRVP QKPERPPLPP KPQFLNSGAY 300
301 POKPLRNQGV VRTLSSSAQE DIIRWFKEEQ LPLRAGYQKT SDTIAPWFHG ILTLKKANEL 360
361 LLSTGMPGSF LIRVSEIRKG YALSYLSEDG CKHFLIDASA DAYSFLGVDQ LQHATLADLV 420
421 EYHKEEPITS LGKELLLYPC GQQDQLPDYL ELFE

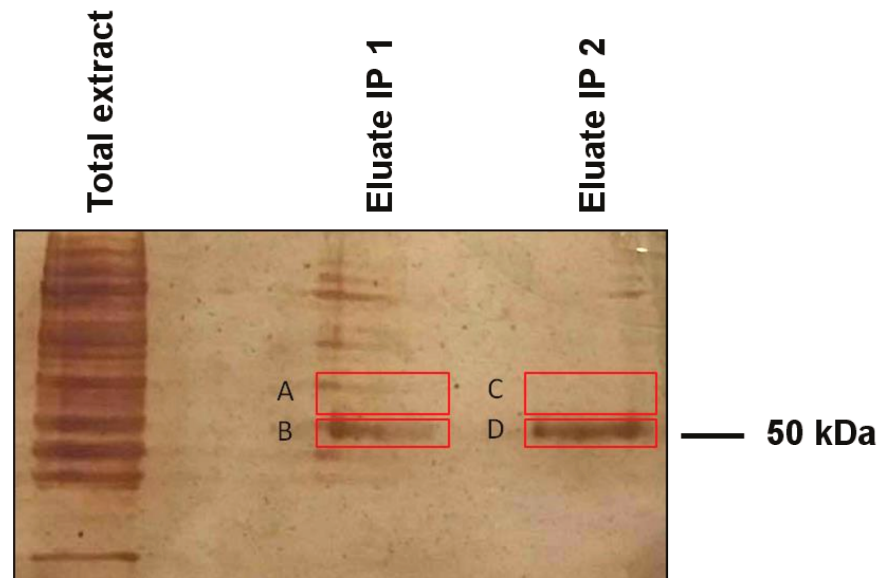
```

R. KESLPVKPRPK.K + Acetyl (K) ; Phospho (ST) ; Hypusine (K)

**Figura 5 - Sequência de aminoácidos da proteína SH2D4A isoforma A.** O peptídeo destacado em vermelho foi identificado pelo espectrômetro de massas nas amostras de eluição da imunoprecipitação de eIF5A-FLAG e nas que foram fracionadas por *SDS-PAGE*, coradas com nitrato prata e recortadas do gel. Sequência obtida no site do *National Center for Biotechnology Information* (NP\_001167630). (FONTE: figura elaborada pela autora).



A



B

```

1  MLKQILSEMY IDPDLLAELS EEQKQILFFK MREEQIRRWK EREAAMERKE SLPVKPRPKK 60
61  ENGKSVHWKL GADKEVWVWV MGEHHLDKPY DVLCNEIIAE RARLKAEQEA EEPRKTHSEE 120
121 FTNSLKTKSQ YHDLQAPDNQ QTKDIWKKVA EKEELEQGSR PAPTLEEEKI RSLSSSSRNI 180
181 QQMLADSINR MKAYAFHQKK ESMKKKQDEE INQIEEERTK QICKSWKEDS EWQASLRKSK 240
241 AADEKRRSLA KQAREDYKRL SLGAQKGRGG ERLQSPLRVP QKPERPPLPP KPQFLNSGAY 300
301 POKPLRNQGV VRTLSSSAQE DIIRWFKEEQ LPLRAGYQKT SDTIAPWFHG ILTLKKANEL 360
361 LLSTGMPGSF LIRVSERIKG YALSYLSEDG CKHFLIDASA DAYSFLGVDQ LQHATLADLV 420
421 EYHKEEPITS LGKELLLYPC GQQDQLPDYL ELFE

```

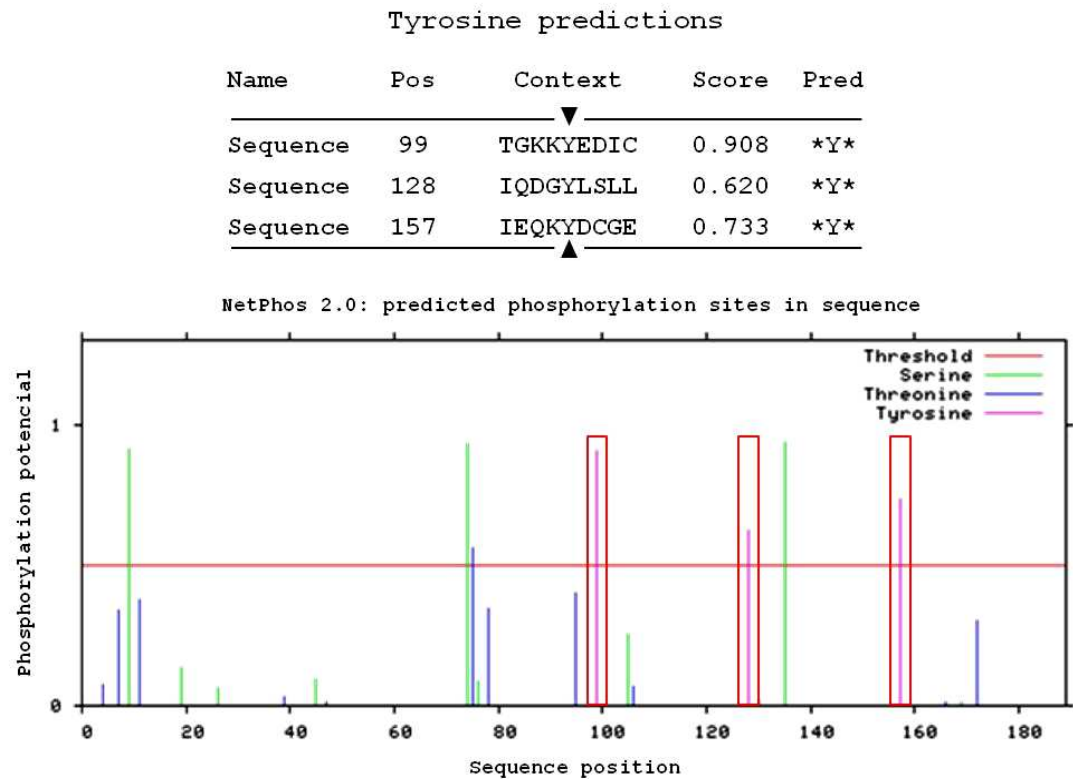
**Figura 6 - Imunoprecipitação da proteína SH2D4A endógena, seguida de análise das bandas recortadas por espectrometria de massas.** (A) Produtos eluídos de dois ensaios de imunoprecipitação foram fracionados por *SDS-PAGE*, quatro bandas (A, B, C e D) foram recortadas do gel corado com nitrato de prata e posteriormente analisadas por espectrometria de massas. (B) As amostras A, B, C e D recortadas do gel foram analisadas em experimentos distintos. Todos os peptídeos da proteína SH2D4A identificados pelo espectrômetro nas quatro amostras estão representados nos segmentos vermelhos sublinhados. O peptídeo esperado por ser hipusinado está representado no segmento sublinhado preto e ele não foi identificado nestas análises. Sequência obtida no site do *National Center for Biotechnology Information* (NP\_001167630). (FONTE: figura elaborada pela autora).

#### **4.2 Análises *in silico* indicam sítios de fosforilação em tirosina na proteína eIF5A, indicando um possível alvo de ligação da proteína SH2D4A através do domínio SH2.**

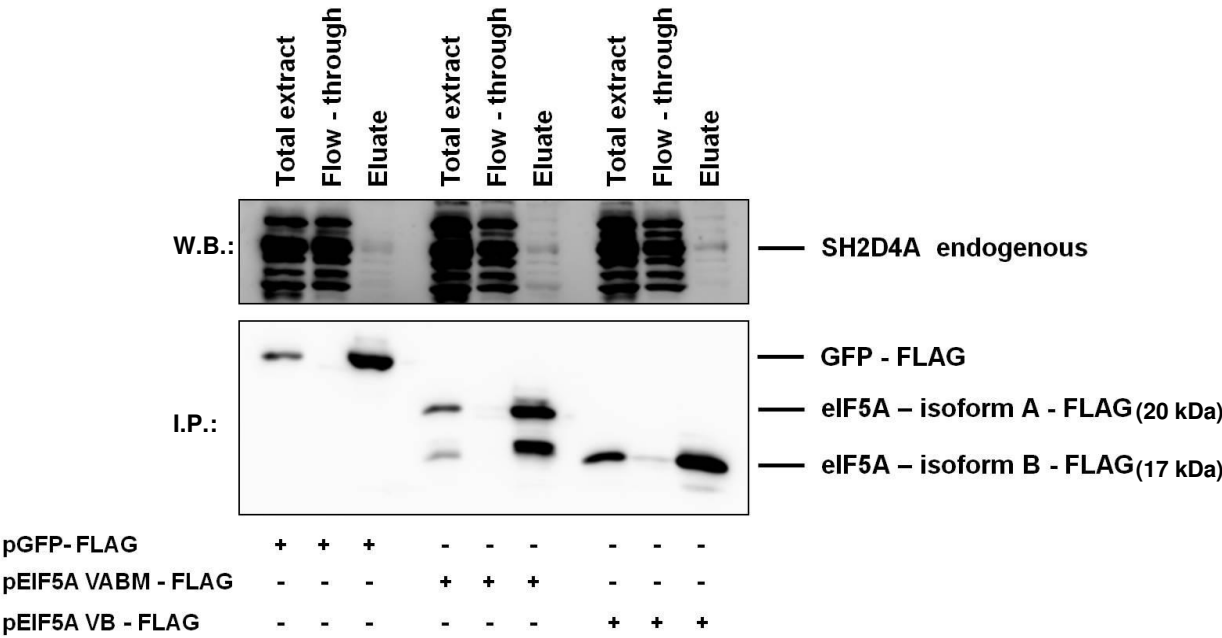
Após a identificação da proteína SH2D4A em imunoprecipitados de eIF5A-FLAG, como um possível parceiro de interação dessa proteína, o próximo passo foi buscar a validação dessa interação realizando novos ensaios de co-imunoprecipitação de eIF5A-FLAG nas mesmas condições anteriores, seguida de validação por *immunoblotting* utilizando anticorpo específico anti-SH2D4A.

Primeiramente, foram realizadas análises *in silico* a fim de verificar se a proteína eIF5A apresentava sítios de fosforilação em tirosina. Para a análise, foi utilizada a proteína eIF5A isoforma A, a qual possui 30 resíduos de aminoácidos a mais do que a isoforma B, na sua extremidade N-terminal. O *software* utilizado para esta análise foi o *NetPhos 2.0 server*, o qual realiza a predição de tirosinas, serinas e treoninas fosforiladas e calcula o *score* indicativo do grau de confiabilidade da predição. Como resultado, foi observado que a proteína eIF5A possui 3 sítios de fosforilação em tirosina, Y<sup>99</sup>, Y<sup>128</sup> e Y<sup>157</sup> com *score* de 0,908; 0,620 e 0,733, respectivamente (Figura 7). Além disso, foi observado que todos estes sítios também estão presentes na isoforma B de eIF5A, pois nenhum dos sítios de fosforilação em tirosina encontravam-se na região dos 30 resíduos de aminoácidos adicionais presentes na isoforma A.

Como resultado da identificação da proteína SH2D4A em eluídos de imunoprecipitados de eIF5A-FLAG, obteve-se que a proteína SH2D4A também co-imunoprecipitou com o controle GFP-FLAG, comprometendo sua especificidade à eIF5A (Figura 8).



**Figura 7 - Predição de sítios de fosforilação em tirosina na proteína eIF5A.** Predição baseada na sequência e na estrutura dos sítios de fosforilação de proteínas eucarióticas. Análise realizada no software NetPhos 2.0 server. (FONTE: figura elaborada pela autora).



**Figura 8 - Validação da interação entre as proteínas superexpressas eIF5A-FLAG e SH2D4A endógena.** Ensaio de *immunoblotting* para identificar a proteína SH2D4A nos eluídos de imunoprecipitados de células HeLa transfectadas com os plasmídeos pEIF5A VABM-FLAG ou pEIF5A VB-FLAG, que expressam a proteína eIF5A isoforma A e isoforma B, respectivamente, em fusão com o peptídeo FLAG. A figura representa os resultados obtidos em 3 experimentos independentes. (FONTE: figura elaborada pela autora).

**4.3 Alinhamento das diferentes isoformas de SH2D4A permite a visualização das diferenças na composição de aminoácidos entre as isoformas e indica que a região da possível hipusinação é conservada nas isoformas A e X1, mas não na isoforma B.**

Como demonstrado anteriormente, a proteína SH2D4A foi identificada pelo espectrômetro de massas nas amostras de precipitados de eIF5A-FLAG e foi observado também que esta proteína poderia apresentar um resíduo de aminoácido hipusina na posição 59. A fim de verificar se essa região é conservada entre as isoformas da proteína SH2D4A, análises *in silico* foram realizadas utilizando a ferramenta *ClustalOmega 1.2.1* a partir do site *EMBL-EBI/Clustal Omega* <<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>>, o qual permite o alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas, permitindo realização de comparações entre elas. Como resultado, observou-se que a região da lisina<sup>59</sup> é conservada entre a isoforma A e a predita isoforma X1, mas não na isoforma B (Figura 9). Além disso, também foi realizado o alinhamento da proteína SH2D4A de diferentes espécies, no qual foi observado que essa região também é conservada na maioria das espécies analisadas, exceto em *C. elegans* e *X. tropicalis*, nos quais a lisina (K) é substituída por uma arginina (R) (Figura 10).

O alinhamento das três isoformas da proteína SH2D4A também nos permite demonstrar as diferenças na composição de aminoácidos nestas isoformas, provenientes do *splicing* alternativo do gene. A isoforma A, canônica e que contém 454 aminoácidos (~53 kDa), difere da isoforma B pela seguinte sequência: 1-60 MLKQILSEMYIDPDLLAELSEEQKQILFFKMREEQIRRWKEREAAAMERKESLPVKPRPKK ser substituída por: 1-15 MWRVIEPPCPGAPST, resultando em uma proteína de 409 aminoácidos (~49 kDa). Já a proteína predita X1 difere da isoforma A pela perda da sequência: 172-198 SLSSSSRNIIQQMLADSINRMKAYAFHQ, resultando em uma proteína de 427 aminoácidos (peso molecular estimado pelo *Expasy – Compute pI/Mw* ~50 kDa) (Figura 9).

```

SH2D4A isoform X1 MLKQILSEMYIDPDLLAELSEEQKQILFFKMREEQIRRWKEREAAERKESLPVKPRPKK
SH2D4A isoform A MLKQILSEMYIDPDLLAELSEEQKQILFFKMREEQIRRWKEREAAERKESLPVKPRPKK
SH2D4A isoform B -----MWRVIEPPCPGAPST
                                     * * . * *
SH2D4A isoform X1 ENGKSVHWKLGADKEVWVWVMEHHLDPYDVLCEIIAERARLKAEQEAEEPRKTHSEE
SH2D4A isoform A ENGKSVHWKLGADKEVWVWVMEHHLDPYDVLCEIIAERARLKAEQEAEEPRKTHSEE
SH2D4A isoform B ENGKSVHWKLGADKEVWVWVMEHHLDPYDVLCEIIAERARLKAEQEAEEPRKTHSEE
*****
SH2D4A isoform X1 FTNSLTKSQYHDLQAPDNQQTCDIWKVAAEKEELEQGSRPAPTLEEKIR-----
SH2D4A isoform A FTNSLTKSQYHDLQAPDNQQTCDIWKVAAEKEELEQGSRPAPTLEEKIRSLSSSSRN
SH2D4A isoform B FTNSLTKSQYHDLQAPDNQQTCDIWKVAAEKEELEQGSRPAPTLEEKIRSLSSSSRN
*****
SH2D4A isoform X1 -----KKESMKKKQDEEINQIEEERTKQICKSWKEDSEWQASLRKSK
SH2D4A isoform A QQMLADSINRMKAYAFHQKKESMKKKQDEEINQIEEERTKQICKSWKEDSEWQASLRKSK
SH2D4A isoform B QQMLADSINRMKAYAFHQKKESMKKKQDEEINQIEEERTKQICKSWKEDSEWQASLRKSK
*****
SH2D4A isoform X1 AADEKRRSLAKQAREDYKRLSLGAQKGRGGERLQSPLRVPQKPERPPLPPKQFLNSGAY
SH2D4A isoform A AADEKRRSLAKQAREDYKRLSLGAQKGRGGERLQSPLRVPQKPERPPLPPKQFLNSGAY
SH2D4A isoform B AADEKRRSLAKQAREDYKRLSLGAQKGRGGERLQSPLRVPQKPERPPLPPKQFLNSGAY
*****
SH2D4A isoform X1 PQKPLRNQGVVRTLSSSAQEDIIRWFKEEQPLRAGYQKTSDTIAPWFHGILTLLKKANEL
SH2D4A isoform A PQKPLRNQGVVRTLSSSAQEDIIRWFKEEQPLRAGYQKTSDTIAPWFHGILTLLKKANEL
SH2D4A isoform B PQKPLRNQGVVRTLSSSAQEDIIRWFKEEQPLRAGYQKTSDTIAPWFHGILTLLKKANEL
*****
SH2D4A isoform X1 LLSTGMPGSFLIRVSEIRIKGYALSYSLEDGCKHFLIDASADAYSFLGVDQLQHATLADLV
SH2D4A isoform A LLSTGMPGSFLIRVSEIRIKGYALSYSLEDGCKHFLIDASADAYSFLGVDQLQHATLADLV
SH2D4A isoform B LLSTGMPGSFLIRVSEIRIKGYALSYSLEDGCKHFLIDASADAYSFLGVDQLQHATLADLV
*****
SH2D4A isoform X1 EYHKEEPITSLGKELLLYPCGQQDQLPDYLELFE
SH2D4A isoform A EYHKEEPITSLGKELLLYPCGQQDQLPDYLELFE
SH2D4A isoform B EYHKEEPITSLGKELLLYPCGQQDQLPDYLELFE
*****

```

**Figura 9 - Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas SH2D4A isoformas A, B e predita X1 humanas.** Foi destacado em vermelho a lisina<sup>59</sup>, a qual representa o possível sítio de hipusinação identificado pela espectrometria de massas. Foi utilizada a ferramenta de análise *EMBL-EBI/Clustal Omega*, disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>>. (FONTE: figura elaborada pela autora).

H. sapiens	1	--MLKQILSEMYIDPDLLAELSEEQKQILFFKMREEQIRRWKEREAAERKESLPVKPRPKK	60	NP_001167630.1
P. troglodytes	1	--MLKQILSEMYIDPDLLAELSEEQKQILFFKMREEQIRRWKEREAVMERKESLPVKPRPKK	60	XP_001148190.1
M. mulatta	1	--MLKQILSEMYIDPDLLAELSEEQKQILFFKMREEQIRRWKEREAAERKESLPVKPRPKK	60	XP_001099151.1
C. lupus	1	--MLKQILSEMYIDPDLLAELSEEQKQILFFKMREEQIRRWKEREVAMEKKESLPVTSRPPK	60	XP_005629820.1
B. taurus	1	--MLKQILSEMYIDPDLLAELSEEQKQILFFKMREEQIRRWKEREAAERKESLPVKPRPKK	60	XP_002698789.3
M. musculus	1	--MLRQILSDFIDPDLLAELSEEQKQILFYKMREEQIRRWKEREAAERKESLPVKSPPK	60	NP_082458.1
R. novergicus	1	--MLRQILSEMFIDPDLLAELSEEQKQILFYKMREEQIRRWKEREAAERKESLPVKSPPK	60	NP_001012048.1
G. gallus	1	--MLKQILSEMYIDPDLLAELSEEQKQILFFKMREEQIRRWKEREAAADK VSA--KKPLPKK	58	XP_420452.1
D. rerio	1	--MLQQILIDMYIEPDLLAELNEEQKQVLFKMRREEQIRRWKEREQLEKQEA--AHAKAKK	58	XP_005156517.1
C. elegans	1	MSILSEILTGHVDEELLAALDDQQLLFCQMRSEQVRKWEAAEADFEK-----TGPMNRK	57	NP_741483.2
X. tropicalis	1	--MLKQILADMYIDPELLAELSEEQKQILFFKMRQEQIRRWQEWAEKCDQNEKRRNSRPPK	60	NP_001072704.1

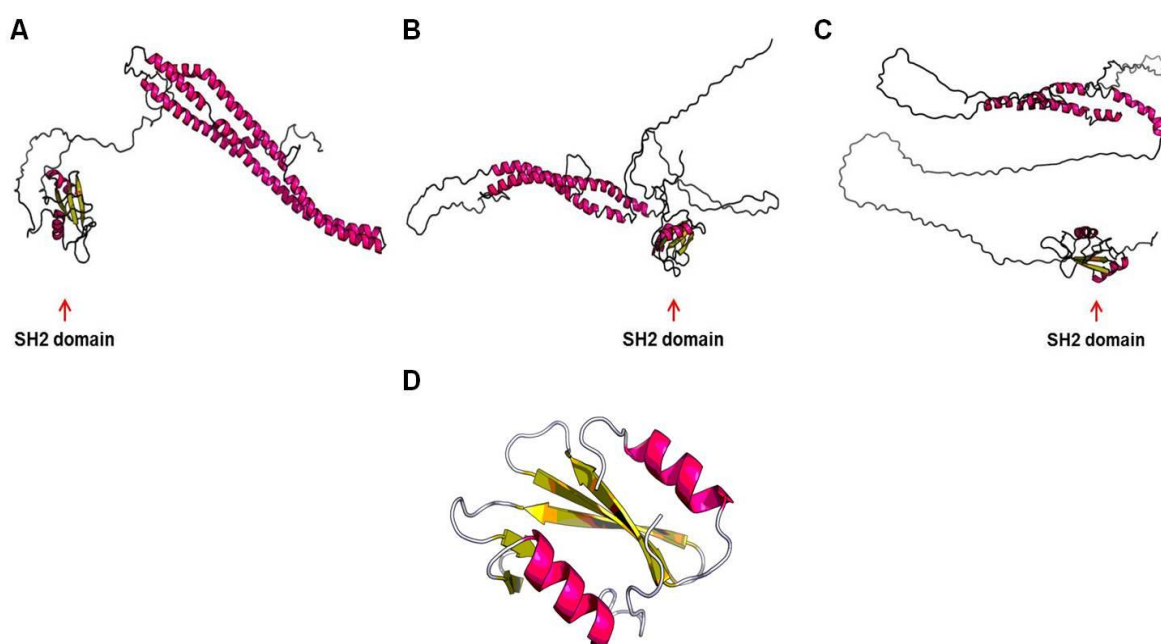
**Figura 10 - Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína SH2D4A de diferentes espécies.** Foi destacado em vermelho a lisina<sup>59</sup>, a qual representa o possível sítio de hipusinação identificado pela espectrometria de massas. Sequências e alinhamento obtidos no site do *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*. (FONTE: figura elaborada pela autora).



#### 4.4 Análises *in silico* da proteína SH2D4A e suas isoformas permitem a visualização da estrutura 3D da proteína.

A estrutura tridimensional de uma proteína permite a visualização das estruturas que constituem as proteínas, as quais possuem padrões estruturais comuns que podem colaborar com a elucidação de sua função molecular. Deste modo, existem programas que realizam a predição da estrutura 3D da proteína, com base na sequência de aminoácidos que é depositada para a realização da análise. As análises de predição da estrutura 3D da proteína SH2D4A e suas isoformas foram realizadas no *software RaptorX web server*.

Foram feitas as análises da proteína SH2D4A isoforma A, da isoforma B e da predita isoforma X1 (Figura 11). Além das isoformas da proteína SH2D4A, foi analisada também a sequência do aminoácido 347 ao 440 da isoforma A, a qual é a sequência da proteína que caracteriza o domínio SH2, sendo assim, foi possível observar a estrutura 3D do domínio SH2 da proteína SH2D4A (Figura 11).

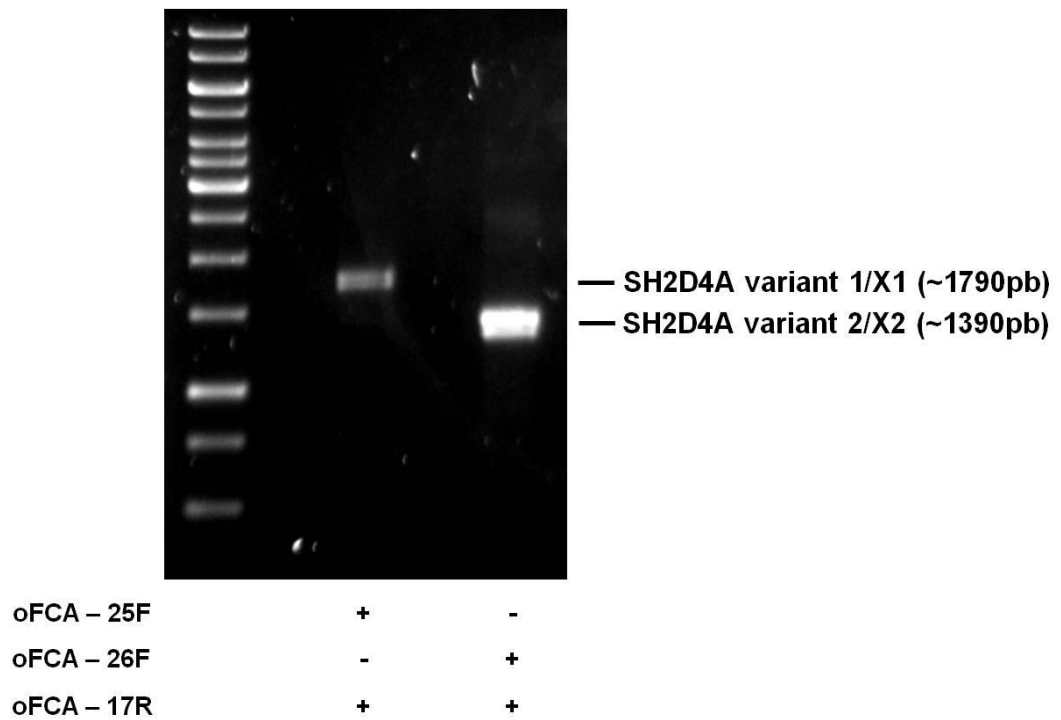


**Figura 11 - Predição da estrutura 3D das isoformas A, B, predita X1 e domínio SH2 da proteína SH2D4A.** (A) Estrutura 3D da isoforma A da proteína SH2D4A. (B) Estrutura 3D da isoforma B de SH2D4A. (C) Estrutura 3D da predita isoforma X1 de SH2D4A. (D) Foi utilizado a sequência de aminoácidos do 347 ao 440 da proteína SH2D4A para a realização da análise. Todas as estruturas foram determinadas utilizando o *software RaptorX web server*. *Nature Protocols* 7, 1511-1522, 2012. As estruturas em rosa indicam as estruturas de  $\alpha$ -hélices, em amarelo as folhas  $\beta$  e em cinza as regiões com estrutura indefinida pelo software. (FONTE: figura elaborada pela autora).

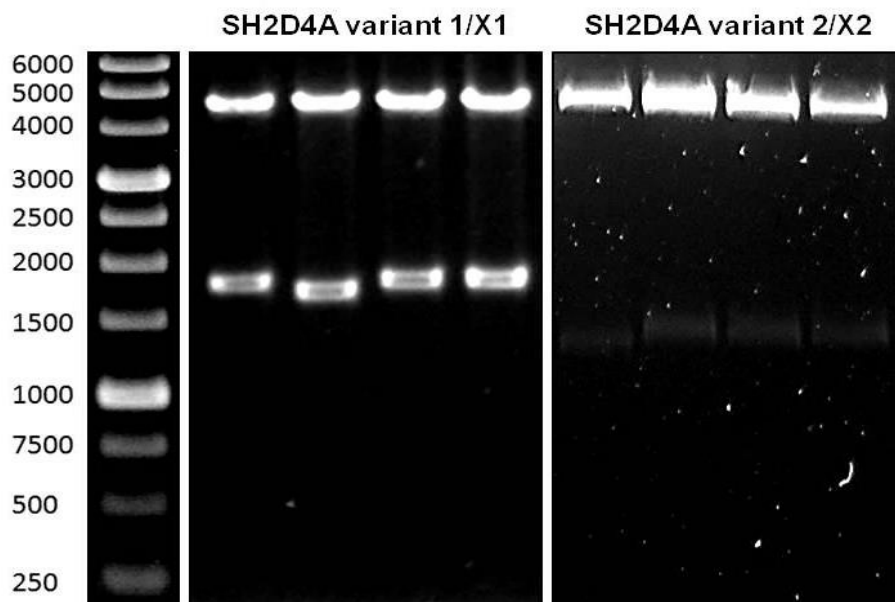
#### **4.5 Identificação dos transcritos variantes 1, 2, X1 e X2 de SH2D4A em células HeLa.**

Para dar início ao estudo de caracterização do gene SH2D4A, iniciamos com a construção de vetores plasmidiais que expressam a proteína SH2D4A em células eucarióticas, por meio da clonagem utilizando oligonucleotídeos específicos para SH2D4A variantes 1/X1 e 2/X2. Os genes de interesse foram amplificados por RT-PCR e inseridos em um vetor plasmidial para expressão de SH2D4A isoforma A em fusão com o peptídeo sinalizador FLAG (pFLAG-CMV 5a).

Ao realizarmos a clonagem, foi possível verificar que as células HeLa apresentam os transcritos variantes 1 e 2, pois foi possível realizar a amplificação desses genes por RT-PCR e visualização das bandas por eletroforese em gel de agarose (Figura 12). Após a ligação dos insertos no vetor pFLAG-CMV 5a, foram realizadas análises de restrição para verificar a inserção dos genes no vetor. Foi observado que entre os clones gerados a partir de uma RT-PCR utilizando oligonucleotídeos para as variantes 1 e 2, haviam insertos de tamanhos diferentes inseridos no plasmídeo (Figura 13). Após o sequenciamento destas amostras foi possível verificar que as amostras com as bandas menores correspondiam aos transcritos variante X1 e X2, confirmando que estes transcritos também são produzidos pelas células HeLa. A *UTR* 5' da variante X1 se assemelha com a da variante 1, já a *UTR* 5' da variante X2 com a da variante 2, permitindo a amplificação de ambos os genes quando se utiliza as sequências alvos das variantes 1 e 2.



**Figura 12 - Detecção dos transcritos de SH2D4A em células HeLa para clonagem no vetor plasmidial pFLAG-CMV5a.** Eletroforese em gel de agarose 1% dos *amplicons* gerados pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) utilizando primers para detectar os transcritos variante 1/X1 e variante 2/X2. (FONTE: figura elaborada pela autora).



**Figura 13 - Análise de restrição dos plasmídeos pFLAG-CMV5a clonados com o gene SH2D4A.** Todas as amostras foram tratadas com as endonucleases *Hind* III e *Bam* HI para a liberação dos insertos clonados. (FONTE: figura elaborada pela autora).



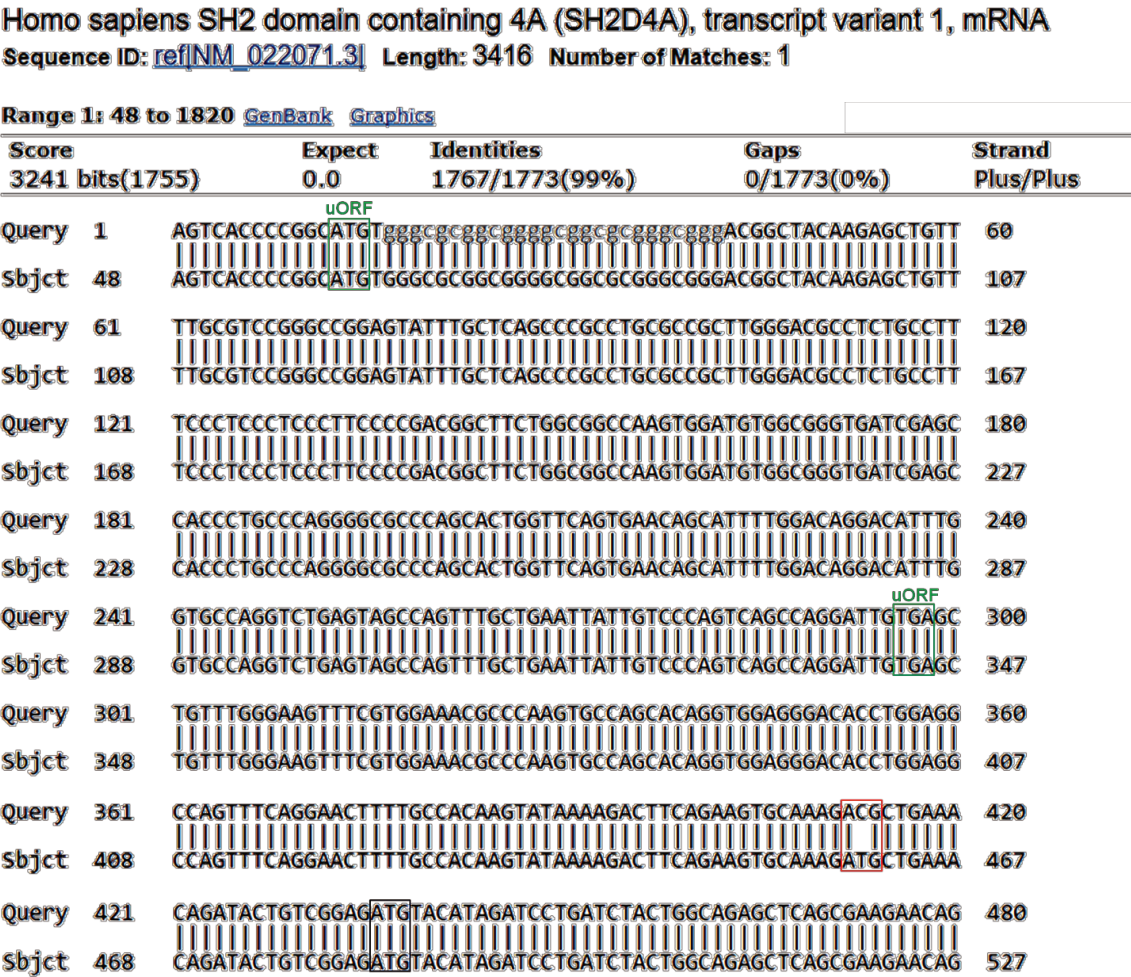
#### 4.6 Sequenciamento do gene SH2D4A clonado a partir do cDNA de células HeLa revelou uma mutação no códon de iniciação codificador da proteína (ATG → ACG).

O sequenciamento dos clones obtidos pela clonagem do gene SH2D4A foi realizado para verificar se as sequências dos clones estavam de acordo com a base de dados do *NCBI*. Entretanto, foi verificado que o códon de iniciação que é indicado pela *coding DNA sequence* (CDS) depositada no banco de dados estava mutado em células HeLa. A região codificadora do gene SH2D4A inicia-se no nucleotídeo 459 e vai até o 1823 (codificando uma proteína de 454 aminoácidos). A mutação fez com que ocorresse uma troca de base (T → C) no nucleotídeo 460 (Figura 14). Além disso, algumas outras mutações foram observadas no sequenciamento do gene, mostrado pelo número de identidades das bases inseridas com a sequência do banco de dados (1767/1773) (Figura 14). Algumas dessas mutações não resultaram em troca de aminoácidos na proteína, ou em alguns casos, ocorreu troca por aminoácidos correspondentes (Figura 15). A clonagem do gene a partir de cDNA de células HeLa foi realizada em dois experimentos independentes e para cada experimento dois clones distintos foram sequenciados e todos apresentaram as mesmas mutações no DNA.

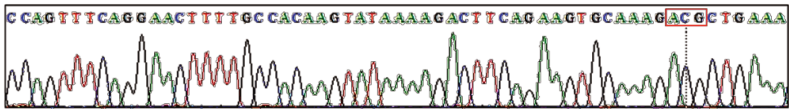
Após o sequenciamento, foi utilizada a ferramenta *Expasy Translate* para traduzir os dados obtidos no sequenciamento e verificar a sequência de aminoácidos que seria traduzida a partir desse gene clonado. Foi possível visualizar a *uORF* (*upstream Open Reading Frame*) presente na *UTR 5'* da variante 1 de SH2D4A, a qual já era alvo do estudo quando iniciamos a clonagem das duas variantes que codificam a isoforma A da proteína. Além disso, como foi verificado que o códon de iniciação determinado pela CDS estava mutado, verificamos a presença de um novo códon de iniciação (ATG) *in frame* com o anterior, na posição 483 ao 485 (Figura 14) resultando na produção de uma proteína com 8 aminoácidos a menos do que indicado no banco de dados, ou seja, 446 aminoácidos (Figura 15). Como o códon de iniciação dessa proteína localiza-se no exon 2 do gene, a mutação também está presente na variante 2 de SH2D4A em células HeLa, pois a diferença entre as duas variantes está apenas no exon 1 (Figura 2). Porém, nos clones obtidos a partir da clonagem da variante 2 esta mutação não foi observada no sequenciamento, pois o oligonucleotídeo desenhado para a clonagem desta variante localizava-se na região

do códon de iniciação descrito pelo *NCBI* (Quadro 1 na seção materiais e métodos), ou seja, durante a PCR para amplificação do gene foi adicionado o nucleotídeo T no lugar do C na posição 460, resultando na produção da proteína completa de 454 aminoácidos.

A



B



**Figura 14 - Identificação da mutação no códon de iniciação codificador da proteína SH2D4A através do sequenciamento do gene clonado a partir de cDNA de células HeLa.** Alinhamento da sequência obtida pelo sequenciamento das amostras com a sequência depositada na base de dados do *NCBI*. A sequência *Query* indica a sequência obtida pelo sequenciamento das amostras e a *Sbjct* indica a sequência do transcrito variante 1 depositada no banco de dados do *NCBI*. O retângulo vermelho indica a mutação encontrada no códon de iniciação da proteína SH2D4A indicado pela *coding DNA sequence* (CDS) do *NCBI*. O retângulo azul indica o possível códon de iniciação alternativo reconhecido para a tradução da proteína SH2D4A em células HeLa. (FONTE: figura elaborada pela autora).

A

SHPGMetWARRGGAGGTATRAVLPRGRSICARLRRLGRCLSLPPFPDGFWRPSGCGGStopSSHQAQGRPALVQStopTAFWTGHL  
 VPGLSSQFAELLSQSARIVSCLGSFVETPKCQHRWRDTRWPVSGTFATSIKDFRSAKTLKQILSEMetYIDPDLLAELSEEQKQILFFK  
 MetREEQIRRWKGREAAAMetERKESLPVKPRPKNENGKSVHWKLGADKEVWVWVMetGEHHLDPYDVLNCNEIAERARKAEQAEAE  
 PRKTHSEEFNTSLKTKSQYHDLQAPDNQQTQDIWKKVAEKEELEQGSRPAPTLSEKIRSLSSSSRNIIQQMetLADSNRMetKAYAFH  
 QKKESMetKKKKQDEEINQIEEERTKQICKSWKEDSEWQASLRKSKAADEKRRSLAKQAREDYKRLSLGAQKGRGGERLQNLPRVQ  
 KPERPPLPPKPQFLNSGAYPQKPLRNOGVVRTLSSSAQEDIRWFKEEQPLRAGYQKTSDTIAPWFHGILTLKKANELLLSTGMetP  
 GSFLIRVSEIRIKGYALSYLSESGCKHFLIDASADAYSFLGVDQLQHATLADLVEYHKEEPIITSLGKELLLYPCGQDDQLPDYLELFE

B

## SH2 domain-containing protein 4A isoform a [Homo sapiens]

Sequence ID: [NP\\_071354.2](#) Length: 454 Number of Matches: 1Range 1: 9 to 454 [GenPept](#) [Graphics](#)

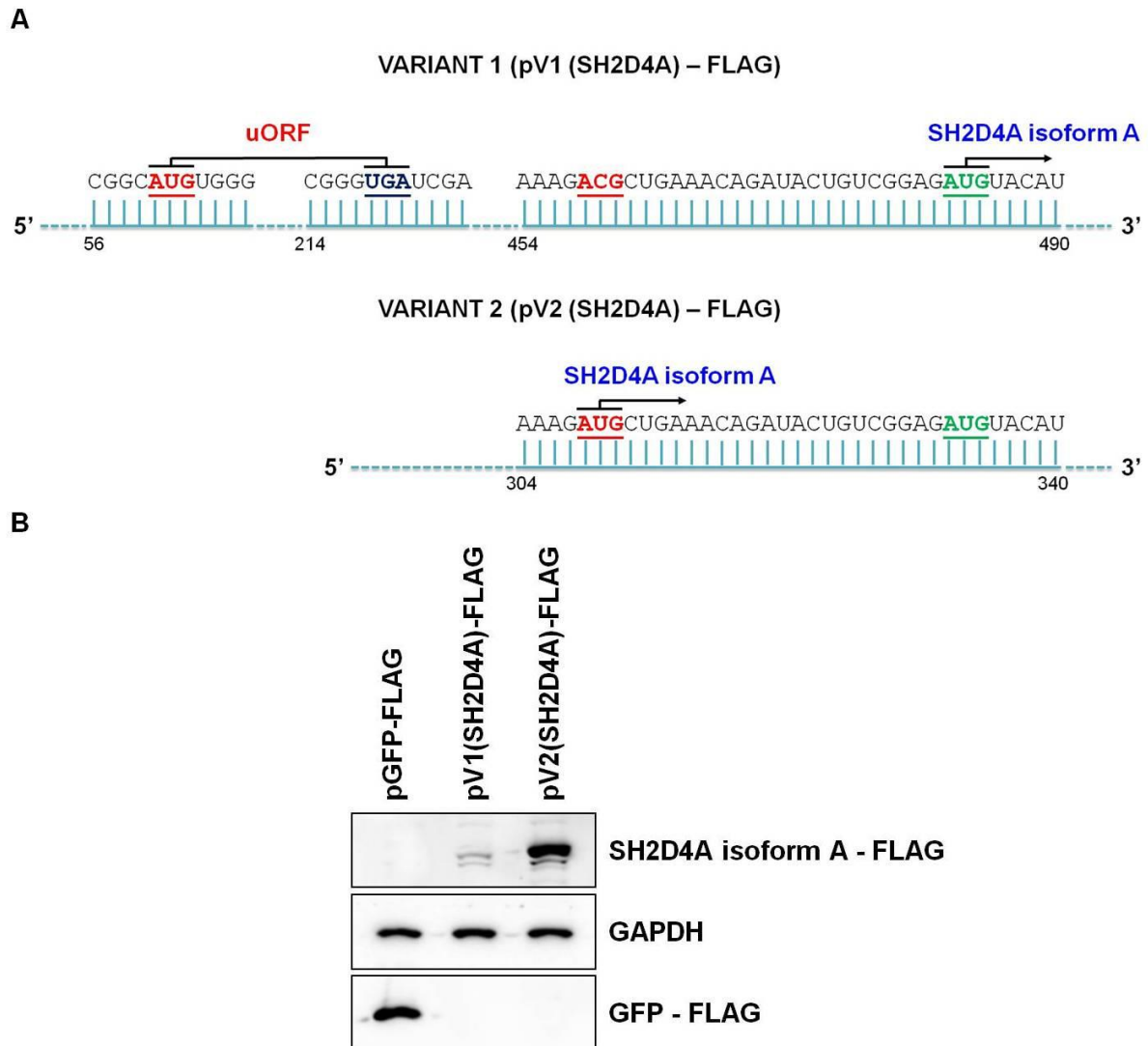
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
907 bits(2344)	0.0	Compositional matrix adjust.	443/446(99%)	444/446(99%)	0/446(0%)
Query 1	MYIDPDLLAELSEEQKQILFFKMREEQIRRWKGREAAAMERKESLPVKPRPKNENGKSVHW				60
Sbjct 9	MYIDPDLLAELSEEQKQILFFKMREEQIRRWK REAAMERKESLPVKPRPK ENGKSVHW				68
Query 61	KLGADEKVVWVMGEHHLDPYDVLNCNEIAERARKAEQAEAEPRKTHSEEFNTSLKTK				120
Sbjct 69	KLGADEKVVWVMGEHHLDPYDVLNCNEIAERARKAEQAEAEPRKTHSEEFNTSLKTK				128
Query 121	SOYHDLQAPDNQQTQDIWKKVAEKEELEQGSRPAPTLSEKIRSLSSSSRNIIQQMLADSI				180
Sbjct 129	SOYHDLQAPDNQQTQDIWKKVAEKEELEQGSRPAPTLSEKIRSLSSSSRNIIQQMLADSI				188
Query 181	NRMKAYAFHQKESMKKKQDEEINQIEEERTKQICKSWKEDSEWQASLRKSKAADEKRRS				240
Sbjct 189	NRMKAYAFHQKESMKKKQDEEINQIEEERTKQICKSWKEDSEWQASLRKSKAADEKRRS				248
Query 241	LAKQAREDYKRLSLGAQKGRGGERLQNLPRVPQKPERPPLPPKPQFLNSGAYPQKPLRNQ				300
Sbjct 249	LAKQAREDYKRLSLGAQKGRGGERLQ+PLRVQKPERPPLPPKPQFLNSGAYPQKPLRNQ				308
Query 301	GVVRTLSSSAQEDIRWFKEEQPLRAGYQKTSDTIAPWFHGILTLKKANELLLSTGMPG				360
Sbjct 309	GVVRTLSSSAQEDIRWFKEEQPLRAGYQKTSDTIAPWFHGILTLKKANELLLSTGMPG				368
Query 361	SFLIRVSEIRIKGYALSYLSESGCKHFLIDASADAYSFLGVDQLQHATLADLVEYHKEEPI				420
Sbjct 369	SFLIRVSEIRIKGYALSYLSESGCKHFLIDASADAYSFLGVDQLQHATLADLVEYHKEEPI				428
Query 421	TSLGKELLLYPCGQDDQLPDYLELFE		446		
Sbjct 429	TSLGKELLLYPCGQDDQLPDYLELFE		454		

**Figura 15 - Sequência da proteína SH2D4A isoforma A originada a partir do transcrito variante 1 em células HeLa.** (A) Tradução da sequência obtida no sequenciamento utilizando a ferramenta *ExPASy Translate*. Foi possível a visualização da sequência traduzida pela *uORF* na *UTR 5'* da variante 1. (B) Alinhamento da proteína traduzida com a sequência da proteína depositada na base de dados do *NCBI*. A sequência descrita como *Query* indica a sequência traduzida obtida no sequenciamento das amostras e sequência *Sbjct* indica a sequência da proteína SH2D4A isoforma A depositada no banco de dados do *NCBI*. (FONTE: figura elaborada pela autora).

**4.7 A presença da *uORF* (*upstream Open Reading Frame*) na variante 1 de SH2D4A faz com que células HeLa transfectadas expressem conteúdos proteicos distintos a partir das variantes transcricionais.**

Foi realizada a clonagem do gene SH2D4A no vetor plasmidial pFLAG-CMV5a, o qual possui uma região promotora para expressar a proteína de interesse em eucariotos em fusão com o peptídeo FLAG e permite a utilização de um anticorpo anti-FLAG para detecção da proteína superexpressa por *immunoblotting*. Como descrito anteriormente, foram observadas algumas mutações no cDNA clonado a partir de células HeLa. Com o objetivo de avaliar se ainda assim a proteína era capaz de ser produzida foi realizada a transfecção em células HeLa das construções geradas. Além disso, foi comparado o perfil de expressão da proteína SH2D4A-FLAG produzida a partir das diferentes variantes transcricionais. Após 24 horas de transfecção, as células foram coletadas e o conteúdo proteico das proteínas superexpressas foi analisado por *immunoblotting*.

Como resultado, obtivemos que as células transfectadas com a construção pV1 (SH2D4A)-FLAG expressaram um menor conteúdo proteico de SH2D4A-FLAG do que quando transfectadas com a construção pV2 (SH2D4A)-FLAG (Figura 16). Este resultado evidencia que a presença da *uORF* na *UTR 5'* e a mutação no códon de iniciação na variante 1 regulam negativamente a produção da proteína SH2D4A-FLAG em células HeLa.



**Figura 16 - Análise do conteúdo proteico de SH2D4A-FLAG isoforma A produzido a partir das variantes transcricionais 1 e 2.** (A) Representação esquemática da diferença entre os plasmídeos construídos com os genes clonados a partir de cDNA de células HeLa. A representação foi baseada na utilizada por Pereira *et al.* (2016) e foi modificada para este trabalho. (B) Ensaio de *immunoblotting* para análise dos conteúdos das proteínas SH2D4A-FLAG produzidas a partir da transfecção em células HeLa com as diferentes variantes transcricionais. Foi utilizado anticorpo anti-FLAG para identificação da proteína SH2D4A-FLAG e GFP-FLAG (utilizado apenas como controle da transfecção) e anticorpo anti-GAPDH como normalizador do experimento. A figura representa os resultados obtidos em 3 experimentos independentes. (FONTE: figura elaborada pela autora).

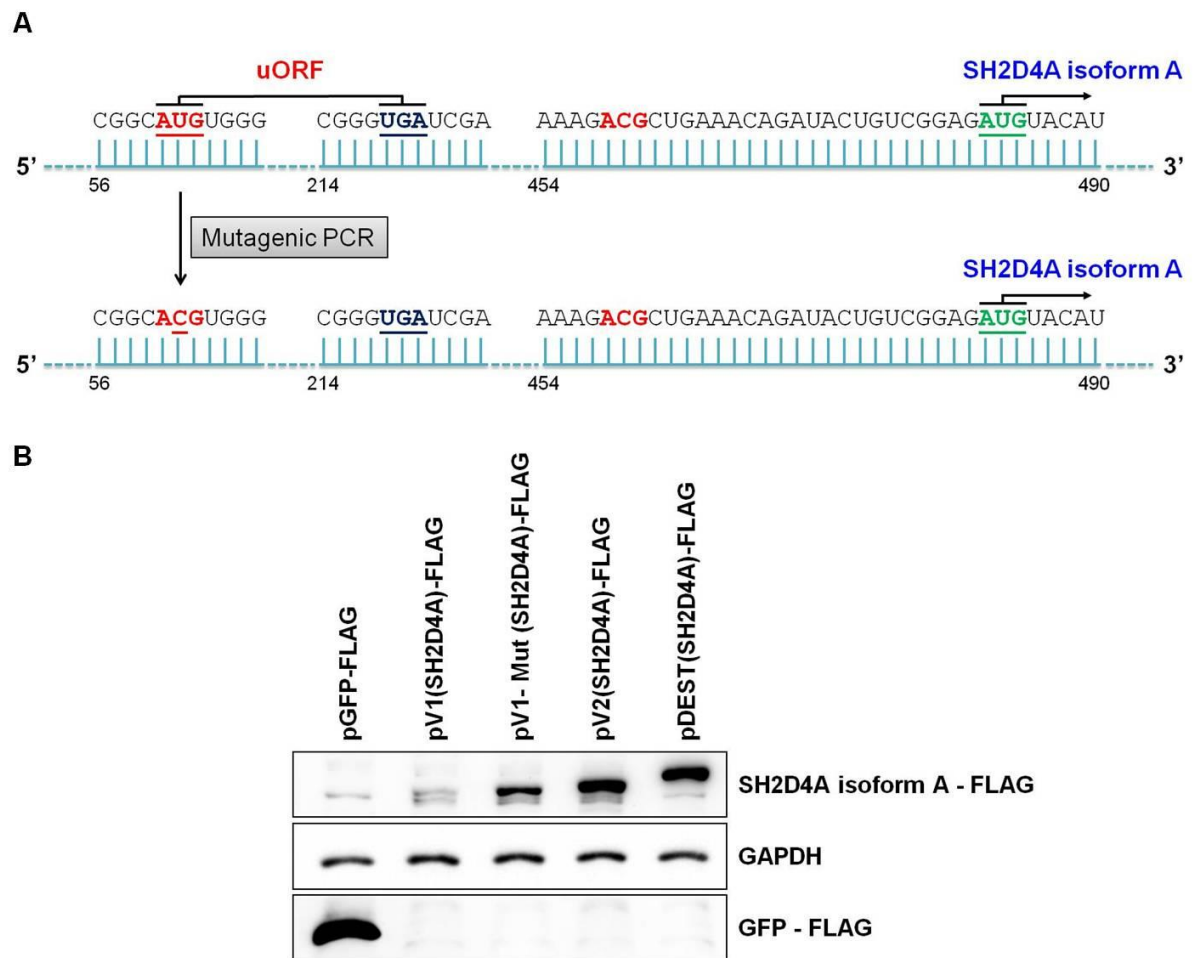
#### **4.8 Mutação sítio dirigida na *uORF* da variante 1 resultou em um aumento na produção da proteína em relação a variante 1 selvagem.**

Com o objetivo de verificar se a *uORF* presente na variante 1 de SH2D4A realmente interferia na produção da proteína, foi realizado a mutação no seu códon de iniciação (ATG → ACG) (Figura 17), resultando na eliminação da *uORF* dessa variante transcricional, o que foi confirmado pelo sequenciamento dos clones gerados.

Como resultado da mutação realizada, foi observado que as células transfectadas com o plasmídeo pV1 (SH2D4A)-MUT-FLAG passaram a produzir, a partir deste transcrito, um maior conteúdo proteico de SH2D4A-FLAG, do que quando transfectadas com o pV1 (SH2D4A)-FLAG. Entretanto, o conteúdo proteico produzido por essa construção, ainda não foi igual ao produzido quando transfectadas com pV2 (SH2D4A)-FLAG ou com o pDEST(SH2D4A)-FLAG (Figura 17). O plasmídeo pDEST(SH2D4A)-FLAG foi cedido pela Dra. Stephanie Roessler (Universidade de Heidelberg - Alemanha) e utilizado em um artigo que demonstrou efeitos de supressão do crescimento tumoral em células que superexpressavam a proteína SH2D4A produzida a partir desta construção (Ploeger *et al.*, 2016). Este plasmídeo foi construído a partir de outro plasmídeo comercial da *Origene* (*TrueORFGold* - RC210260) e utilizado neste experimento para testar a expressão e verificar o peso molecular da proteína produzida a partir dele. O plasmídeo pDEST (SH2D4A)-FLAG será utilizado para comparar os efeitos gerados em células que expressam a proteína SH2D4A a partir deste, com as células que expressam a proteína a partir dos plasmídeos produzidos utilizando o cDNA de células HeLa, que possuem algumas mutações.

Neste experimento, também foi observado que houve diferença no peso molecular das proteínas produzidas a partir das diferentes variantes transcripcionais. Deste modo, as proteínas SH2D4A-FLAG produzidas a partir dos transcritos variante 1, mutado e não mutado, são menores do que a proteína produzida pelo transcrito variante 2, o que se deve ao fato da proteína produzida pela variante 1 apresentar um códon de iniciação alternativo ao indicado pela CDS e produzir uma proteína menor (446 aminoácidos). O fato da proteína produzida a partir da construção pDEST(SH2D4A)-FLAG apresentar peso molecular maior do que as outras três se deve à presença de um Myc-Tag além do peptídeo FLAG (Figura 17).





**Figura 17 - Mutação sítio dirigida da *uORF* na *UTR* 5' da proteína SH2D4A resultou em um aumento no conteúdo proteico produzido.** (A) Representação esquemática da mutação da *uORF*. A representação foi baseada na utilizada por Pereira *et al.* (2016) e foi modificada para este trabalho. (B) Ensaio de *immunoblotting* para análise dos conteúdos das proteínas SH2D4A-FLAG produzidas a partir da transfecção com as diferentes variantes transcricionais. Foi utilizado anticorpo anti-FLAG para identificação da proteína SH2D4A-FLAG e GFP-FLAG (utilizado apenas como controle da transfecção) e anticorpo anti-GAPDH como normalizador do experimento. A figura representa os resultados obtidos em 3 experimentos independentes. (FONTE: figura elaborada pela autora).

## 5 DISCUSSÃO

Desde a descoberta do resíduo de aminoácido hipusina da proteína eIF5A na década de 70 não há evidências da existência de qualquer outra proteína hipusinada (Shiba *et al.*, 1971; Nakanishi e Cleveland, 2016a). Inicialmente, o aparecimento de outra proteína contendo um resíduo de aminoácido hipusina em imunoprecipitados de eIF5A-FLAG nos despertou atenção para o estudo desta proteína que ainda é muito pouco estudada. Em células HeLa, foi identificado por espectrometria de massas que o peptídeo (KESLPVKPRPK) da proteína SH2D4A poderia apresentar um resíduo de aminoácido hipusina na posição Lisina<sup>59</sup>(K<sup>59</sup>). A fim de validar a possível hipusinação de SH2D4A, foram realizadas imunoprecipitações da proteína endógena para identificar o peptídeo previamente encontrado hipusinado. Em seguida, foram realizadas análises destes imunoprecipitados por espectrometria de massas, porém, os peptídeos identificados nestas análises não cobriram a região de interesse da proteína. O fato de este resultado não ter sido validado não descarta a possibilidade de SH2D4A ser hipusinado e de existirem outras proteínas hipusinadas. De fato, são necessários ensaios mais avançados para a obtenção de resultados conclusivos. Foi mostrado na literatura que as enzimas transglutaminases (TGases) catalisam a formação de ligações cruzadas entre cadeias peptídicas e o resíduo de hipusina de eIF5A, na qual indicam que a hipusina<sup>50</sup> da cadeia de eIF5A funciona como um acceptor de grupamento acila para as TGases (Beninati *et al.*, 1995; Caraglia *et al.*, 2001). Este mecanismo de ligação cruzada entre as proteínas e a hipusina de eIF5A poderia ser um mecanismo pelo qual possa ocorrer a permutação deste aminoácido para outras proteínas, quando ocorre a dissociação das mesmas, possibilitando a existência de outras proteínas contendo este resíduo de aminoácido. Além disso, o fato da região da possível hipusinação em SH2D4A ser conservada entre duas das isoformas humanas (A e X1) e entre a maioria das espécies analisadas, fortalece a hipótese de que essa região é importante para a estrutura e manutenção da atividade dessa proteína.

Em busca da descoberta de novas proteínas hipusinadas, foram realizadas análises de espectrometria de massas de extrato total de células HeLa, utilizando a ferramenta de busca por peptídeos contendo hipusina no software *Mascot*, porém, não foi possível a obtenção de resultados conclusivos a partir destes experimentos



(dados não apresentados). Entretanto, apesar do grande interesse do grupo acerca deste assunto, novas técnicas e abordagens necessitam ser realizadas para a obtenção de resultados conclusivos.

O próximo passo do estudo foi validar a interação entre a proteína SH2D4A e eIF5A-FLAG. Sabe-se que a proteína SH2D4A possui um único domínio SH2, composto por 93 aminoácidos, o qual está presente em um grande número de proteínas e é responsável por mediar ligações proteína-proteína, por meio da ligação do domínio a regiões peptídicas contendo fosfotirosinas (Lapinski *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2012). Deste modo, foram realizadas análises *in silico* com a proteína eIF5A, a fim de verificar os sítios de fosforilação em tirosina presentes nesta proteína. Como resultado, foi verificado que eIF5A possui três sítios de fosforilação em tirosina, o que sugere um possível alvo de ligação do domínio SH2 à essa proteína. Entretanto, análises por *immunoblotting* revelaram que a proteína SH2D4A também co-precipitou com a proteína GFP-FLAG, utilizada como controle, mostrando que SH2D4A não era um ligante específico de eIF5A. Este resultado não impossibilita o fato da proteína SH2D4A se ligar a ambas proteínas (GFP e eIF5A). Como última tentativa, o ensaio será repetido com extratos celulares tratados previamente com fosfatases (eIF5A desprovido de grupamentos fosfato) a fim de verificarmos o perfil de interação da proteína SH2D4A nessas condições.

Apesar destas primeiras evidências do estudo não terem sido validadas, elas fizeram com que direcionássemos o foco do estudo para uma investigação aprofundada acerca da proteína SH2D4A, a qual ainda é pouco estudada e consiste uma proteína relevante na patogênese do câncer (Roessler *et al.*, 2012; Quagliata *et al.*, 2014). Deste modo, o objetivo principal do estudo foi buscar novos achados em relação à caracterização do gene e da proteína SH2D4A. A partir disso, foram encontrados novos apontamentos, que nos permitem discutir alguns aspectos em relação à sua função e do seu envolvimento com o desenvolvimento do câncer. Primeiramente, buscamos elucidar algumas características estruturais em relação à proteína SH2D4A que pudessem nos ajudar a compreender a sua organização estrutural e, conseqüentemente, colaborar com a determinação de suas funções. O alinhamento das diferentes isoformas de SH2D4A foi realizado, no qual pudemos analisar o perfil de aminoácidos de cada isoforma e verificar que a região da possível hipusinação é conservada nas isoformas A e X1, mas não na isoforma B. Predições *in silico* da estrutura tridimensional das diferentes isoformas também

foram realizadas, para visualização das estruturas que compõem a proteína. A ocorrência destas isoformas na célula pode ser regulada por eventos de *splicing* alternativos decorrentes da função de cada uma na célula e no requerimento diante de determinada condição fisiológica.

Em relação à caracterização do gene de SH2D4A, foi observado que as células HeLa, uma linhagem tumoral, expressa os transcritos variantes 1, 2, X1 e X2 mostrando que apesar de este ser um gene supressor tumoral ele é transcrito normalmente por essas células. Entretanto, foi verificado que os genes clonados a partir do cDNA de células HeLa apresentavam algumas mutações. A mutação mais significativa ocorreu no códon de iniciação codificador da proteína, resultando na utilização de um códon de iniciação alternativo para a produção da proteína SH2D4A. Deste modo, a produção dessa proteína sem a região N-terminal inicial, pode alterar a configuração estrutural ou causar um mau dobramento dessa proteína, o que pode interferir na sua atividade. Sabendo que o desenvolvimento tumoral é multifatorial e muitas vezes causado por mutações em proteínas que atuam na supressão do tumor, as mutações encontradas no gene SH2D4A podem indicar que isso seja um dos fatores que contribuem para o desenvolvimento e progressão das características tumorais dessas células e, portanto, do tumor que deu origem as mesmas. Em animais que foram induzidos a superexpressar a proteína SH2D4A, foi observado que houve uma redução no crescimento tumoral *in vivo*, os quais apresentaram uma redução significativa do volume tumoral e reversão do quadro ao qual foram expostos (Roessler *et al.*, 2012), sugerindo que a ausência ou o mau funcionamento dessa proteína podem ser fatores cruciais para progressão e crescimento tumoral. Além disso, as alterações genéticas observadas para esse gene poderiam ser utilizadas como possíveis marcadores para auxiliar no diagnóstico ou detecção de pré-disposição para o desenvolvimento de câncer, uma vez que existem outras proteínas supressoras tumorais bem conhecidas, como a p53, por exemplo, a qual possui o seu gene mutado em grande parte dos tumores humanos (Ohashi *et al.*, 2017).

A presença da *uORF* (*upstream Open Reading Frame*) na variante 1 de SH2D4A regula negativamente a produção da proteína SH2D4A, visto que, alguns estudos mostram que a maioria das *uORFs* atuam como repressores da tradução (Johnstone *et al.*, 2016). A mutação dessa *uORF* e sua consequente exclusão fez com que as células aumentassem o conteúdo proteico de SH2D4A produzido,

quando transfectadas com a variante 1 sem a presença da *uORF*. Entretanto, ainda assim a produção da proteína SH2D4A a partir da variante 1 não foi igual a produção a partir da variante 2, indicando que a proteína SH2D4A isoforma A é produzida preferencialmente a partir do transcrito variante 2.

## 6 CONCLUSÃO

Em relação à caracterização do gene de SH2D4A, foi observado que as células HeLa produzem os transcritos variantes 1, 2, X1 e X2 mostrando que apesar de este ser um gene supressor tumoral ele é transcrito normalmente por essas células. Além disso, os genes clonados a partir do cDNA de células HeLa apresentavam algumas mutações. A mutação mais significativa ocorreu no códon de iniciação codificador da proteína, resultando na utilização de um códon de iniciação alternativo para a produção da proteína SH2D4A truncada. Deste modo, a produção dessa proteína sem a região N-terminal, pode alterar a configuração estrutural ou causar um mal dobramento dessa proteína, o que pode interferir na sua atividade. Sabendo que o desenvolvimento tumoral é multifatorial e muitas vezes causado por mutações em proteínas que atuam na supressão do tumor, as mutações encontradas no gene SH2D4A podem indicar que isso seja um dos fatores que contribuem para o desenvolvimento e progressão das características tumorais dessas células. Além disso, estudos para caracterização destas mutações podem ser realizados e explorados futuramente como marcadores moleculares para indicação de predisposição genética ao câncer.

Foi verificado também que a presença da *uORF* na variante 1 de SH2D4A regula negativamente a produção da proteína SH2D4A. A mutação e depleção dessa *uORF* fez com que as células aumentassem o conteúdo proteico de SH2D4A produzido quando transfectadas com essa construção do que quando comparado a ao transfectado com a variante 1 contendo a *uORF*. Entretanto, ainda assim a produção da proteína SH2D4A a partir da variante 1 não foi igual a produção a partir da variante 2, indicando que a proteína SH2D4A isoforma A é produzida preferencialmente a partir do transcrito variante 2.

Em geral, os resultados obtidos no presente estudo contribuem para a caracterização do gene e da proteína SH2D4A e sugerem que esta proteína possui características importantes, dentre as quais, mutações no gene que podem contribuir, juntamente com outros fatores, para o desenvolvimento e progressão de tumores.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENINATI, S. et al. Identification of a substrate site for transglutaminases on the human protein synthesis initiation factor 5A. **Biochem J**, v. 305 ( Pt 3), p. 725-8, Feb 1995. ISSN 0264-6021. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7848270> >.
- CARAGLIA, M. et al. The role of eukaryotic initiation factor 5A in the control of cell proliferation and apoptosis. **Amino Acids**, v. 20, n. 2, p. 91-104, 2001. ISSN 0939-4451. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11332455> >.
- DAI, S.; ZHAO, Y.; DING, Q. [A novel member of SH(2) signaling protein family: cloning and characterization of SH(2)A gene]. **Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi**, v. 19, n. 6, p. 458-62, Dec 2002. ISSN 1003-9406. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12476414> >.
- 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. **Curr Pharm Des**, v. 20, n. 2, p. 284-92, 2014. ISSN 1873-4286. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23701550> >.
- DING, Q. et al. [Effect of SH2A gene in cell signal transduction and its subcellular localization]. **Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi**, v. 20, n. 6, p. 499-503, Dec 2003. ISSN 1003-9406. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14669218> >.
- GOODISON, S. et al. The RhoGAP protein DLC-1 functions as a metastasis suppressor in breast cancer cells. **Cancer Res**, v. 65, n. 14, p. 6042-53, Jul 2005. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16024604> >.
- GUTIERREZ, E. et al. eIF5A promotes translation of polyproline motifs. **Mol Cell**, v. 51, n. 1, p. 35-45, Jul 11 2013. ISSN 1097-4164 (Electronic) 1097-2765 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23727016> >.
- HANAUSKE-ABEL, H. M. et al. Drug-induced reactivation of apoptosis abrogates HIV-1 infection. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e74414, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24086341>>.
- HOQUE, M. et al. Inhibition of HIV-1 gene expression by Ciclopirox and Deferiprone, drugs that prevent hypusination of eukaryotic initiation factor 5A. **Retrovirology**, v. 6, p. 90, 2009. ISSN 1742-4690. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19825182> >.

HUANG, Y. et al. Neuronal growth and survival mediated by eIF5A, a polyamine-modified translation initiation factor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 10, p. 4194-9, Mar 6 2007. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17360499>>.

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

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

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

JOHNSTONE, T. G.; BAZZINI, A. A.; GIRALDEZ, A. J. Upstream ORFs are prevalent translational repressors in vertebrates. **EMBO J**, v. 35, n. 7, p. 706-23, Apr 2016. ISSN 1460-2075. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26896445>>.

KAISER, A. Translational control of eIF5A in various diseases. **Amino Acids**, v. 42, n. 2-3, p. 679-84, Feb 2012. ISSN 1438-2199. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21818564>>.

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

KLIER, H. et al. Isolation and structural characterization of different isoforms of the hypusine-containing protein eIF-5A from HeLa cells. **Biochemistry**, v. 34, n. 45, p. 14693-702, Nov 1995. ISSN 0006-2960. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7578077>>.

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

LAPINSKI, P. E. et al. The T-cell-specific adapter protein family: TSA $\alpha$ , ALX, and SH2D4A/SH2D4B. **Immunol Rev**, v. 232, n. 1, p. 240-54, Nov 2009. ISSN 1600-065X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19909368> >.

LAPINSKI, P. E. et al. Genetic analysis of SH2D4A, a novel adapter protein related to T cell-specific adapter and adapter protein in lymphocytes of unknown function, reveals a redundant function in T cells. **J Immunol**, v. 181, n. 3, p. 2019-27, Aug 2008. ISSN 1550-6606. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18641339> >.

LI, T. et al. SH2D4A regulates cell proliferation via the ER $\alpha$ /PLC- $\gamma$ /PKC pathway. **BMB Rep**, v. 42, n. 8, p. 516-22, Aug 2009. ISSN 1976-6696. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19712589> >.

LI, Y. et al. Increased expression of EIF5A2, via hypoxia or gene amplification, contributes to metastasis and angiogenesis of esophageal squamous cell carcinoma. **Gastroenterology**, v. 146, n. 7, p. 1701-13.e9, Jun 2014. ISSN 1528-0012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24561231> >.

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

LIU, B. A.; ENGELMANN, B. W.; NASH, P. D. The language of SH2 domain interactions defines phosphotyrosine-mediated signal transduction. **FEBS Lett**, v. 586, n. 17, p. 2597-605, Aug 2012. ISSN 1873-3468. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22569091> >.

LIU, B. A. et al. The human and mouse complement of SH2 domain proteins-establishing the boundaries of phosphotyrosine signaling. **Mol Cell**, v. 22, n. 6, p. 851-68, Jun 2006. ISSN 1097-2765. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16793553> >.

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

MEIJER, H. A.; THOMAS, A. A. Control of eukaryotic protein synthesis by upstream open reading frames in the 5'-untranslated region of an mRNA. **Biochem J**, v. 367, n. Pt 1, p. 1-11, Oct 2002. ISSN 0264-6021. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12117416> >.

MORAN, M. F. et al. Src homology region 2 domains direct protein-protein interactions in signal transduction. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 87, n. 21, p. 8622-6, Nov 1990. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2236073>>.

NAKANISHI, S.; CLEVELAND, J. L. Targeting the polyamine-hypusine circuit for the prevention and treatment of cancer. **Amino Acids**, v. 48, n. 10, p. 2353-62, Oct 2016a. ISSN 1438-2199. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27357307>>.

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

OHASHI, T. et al. p53 mediates the suppression of cancer cell invasion by inducing LIMA1/EPLIN. **Cancer Lett**, Jan 2017. ISSN 1872-7980. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28093207>>.

OLSEN, M. E. et al. Polyamines and Hypusination Are Required for Ebolavirus Gene Expression and Replication. **MBio**, v. 7, n. 4, 2016. ISSN 2150-7511. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27460797>>.

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

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

PARK, M. H.; WOLFF, E. C.; FOLK, J. E. Hypusine: its post-translational formation in eukaryotic initiation factor 5A and its potential role in cellular regulation. **Biofactors**, v. 4, n. 2, p. 95-104, May 1993. ISSN 0951-6433 (Print) 0951-6433 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8347280>>.

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



PAWSON, T.; GISH, G. D. SH2 and SH3 domains: from structure to function. **Cell**, v. 71, n. 3, p. 359-62, Oct 1992. ISSN 0092-8674. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1423600>>.

PEREIRA, K. D. et al. Alternative Start Codon Connects eIF5A to Mitochondria. **J Cell Physiol**, v. 231, n. 12, p. 2682-9, Dec 2016. ISSN 1097-4652 (Electronic) 0021-9541 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27414022>>.

PLOEGER, C. et al. Chromosome 8p tumor suppressor genes SH2D4A and SORBS3 cooperate to inhibit interleukin-6 signaling in hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v. 64, n. 3, p. 828-42, Sep 2016. ISSN 1527-3350. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27311882>>.

QUAGLIATA, L. et al. SH2D4A is frequently downregulated in hepatocellular carcinoma and cirrhotic nodules. **Eur J Cancer**, v. 50, n. 4, p. 731-8, Mar 2014. ISSN 1879-0852. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24315626>>.

ROESSLER, S. et al. Integrative genomic identification of genes on 8p associated with hepatocellular carcinoma progression and patient survival. **Gastroenterology**, v. 142, n. 4, p. 957-966.e12, Apr 2012. ISSN 1528-0012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22202459>>.

ROSKOSKI, R. Src protein-tyrosine kinase structure, mechanism, and small molecule inhibitors. **Pharmacol Res**, v. 94, p. 9-25, Apr 2015. ISSN 1096-1186. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25662515>>.

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

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

SANO, A.; KOTANI, K.; KAKIMOTO, Y. Isolation and identification of alpha-(gamma-aminobutyryl)-hypusine. **J Neurochem**, v. 46, n. 4, p. 1046-9, Apr 1986. ISSN 0022-3042 (Print) 0022-3042 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3950619>>.

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

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

SHIBA, T. et al. Hypusine, a new amino acid occurring in bovine brain. Isolation and structural determination. **Biochim Biophys Acta**, v. 244, n. 3, p. 523-31, Sep 21 1971. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4334286>>.

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 5 1989. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2509460>>.

SONGYANG, Z.; CANTLEY, L. C. Recognition and specificity in protein tyrosine kinase-mediated signalling. **Trends Biochem Sci**, v. 20, n. 11, p. 470-5, Nov 1995. ISSN 0968-0004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8578591>>.

WAKSMAN, G.; KURIYAN, J. Structure and specificity of the SH2 domain. **Cell**, v. 116, n. 2 Suppl, p. S45-8, 3 p following S48, Jan 2004. ISSN 0092-8674. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15055581>>.

XUE, W. et al. DLC1 is a chromosome 8p tumor suppressor whose loss promotes hepatocellular carcinoma. **Genes Dev**, v. 22, n. 11, p. 1439-44, Jun 2008. ISSN 0890-9369. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18519636>>.

YOUNG, S. K.; WEK, R. C. Upstream Open Reading Frames Differentially Regulate Gene-specific Translation in the Integrated Stress Response. **J Biol Chem**, v. 291, n. 33, p. 16927-35, Aug 2016. ISSN 1083-351X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27358398>>.

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

ZHOU, X. et al. DLC1 suppresses distant dissemination of human hepatocellular carcinoma cells in nude mice through reduction of RhoA GTPase activity, actin cytoskeletal disruption and down-regulation of genes involved in metastasis. **Int J Oncol**, v. 32, n. 6, p. 1285-91, Jun 2008. ISSN 1019-6439. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18497990>>.

ZUK, D.; JACOBSON, A. A single amino acid substitution in yeast eIF-5A results in mRNA stabilization. **EMBO J**, v. 17, n. 10, p. 2914-25, May 15 1998. ISSN 0261-4189 (Print) 0261-4189 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9582285>>.