

UNESP - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

LUIS CAMACHO IGLESIAS

**Estudo dos efeitos celulares do inibidor de
hipusinação GC7 utilizando coleções de mutantes de
*Saccharomyces cerevisiae***

Araraquara, SP

2018

LUIS CAMACHO IGLESIAS

**Estudo dos efeitos celulares do inibidor de
hipusinação GC7 utilizando coleções de mutantes de
*Saccharomyces cerevisiae***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli

Coorientador: Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini

Araraquara, SP

2018

Ficha Catalográfica

Elaborada por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

I52e

Iglesias, Luis Camacho

Estudo dos efeitos celulares do inibidor de hipusinação GC7 utilizando coleções de mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* / Luis Camacho Iglesias. – Araraquara, 2018.
124 f. : il.

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

Orientador: Cleslei Fernando Zanelli.

Coorientador: Sandro Roberto Valentini.

1. *Saccharomyces cerevisiae*. 2. eIF5A. 3. Desoxi-hipusina sintase. 4. Rastreamento.
5. GC7. I. Zanelli, Cleslei Fernando, orient. II. Valentini, Sandro Roberto, coorient. III. Título.

CAPES: 40300005

LUIS CAMACHO IGLESIAS

Estudo dos efeitos celulares do inibidor de hipusinação GC7 utilizando coleções de mutantes de
Saccharomyces cerevisiae

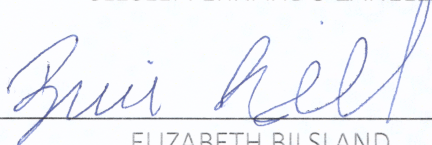
Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista
– UNESP, Campus de Araraquara como requisito para a
obtenção do título de Mestre em Biociências e
Biotecnologia aplicadas à Farmácia

Araraquara, 22 de maio de 2018.

BANCA EXAMINADORA



CLESLEI FERNANDO ZANELLI



ELIZABETH BILSLAND



MARIA CÉLIA BERTOLINI

Agradecimentos:

Ao meu Pai Luis, pelo traspasso da paixão e curiosidade no estudo dos mecanismos e processos que fazem possível a vida, assim como por ter me ensinado o realmente importante no percurso da mesma. Obrigado por ser um exemplo a seguir.

Ao meu amor e companheira de viagem Aura, pelo amor, apoio incondicional e paciência recebido durante o desenvolvimento deste trabalho.

À minha mãe Rosário e minha irmã Lucia, pelo carinho e apoio recebido durante a execução deste trabalho, ainda que na distância.

Aos meus amigos e irmãos da Espanha, especialmente, Ana, Pablo, Javi, Angel, Alberto, Gonzalo e Bonaque, por me mostrar que a distância não importa quando a amizade é verdadeira.

Ao Professor Cleslei, pela oportunidade, orientação, apoio, compreensão e aplicação na evolução e desenvolvimento deste trabalho, assim como pela amizade forjada no transcurso do mesmo.

À minha aluna de IC Leticia, pela indubitável e importante contribuição neste trabalho, assim como por ter potenciado minhas capacidades comunicativas e aprendizado.

Ao Professor Sandro, por ter possibilitado junto com meu amigo Pablo meu primeiro contato com a ciência, assim como pela coorientação e apoio no decorrer deste trabalho.

Ao Doutor Agustín, pela colaboração, que permitiu aumentar o impacto deste trabalho, assim como meu processo de aprendizado.

Às Professoras Elizabeth e Maria Celia, por terem formado parte das minhas bancas de qualificação e defesa, aportando sugestões e correções, que sem dúvida, foram chave no desenvolvimento deste trabalho.

A BIOMOL em sua totalidade, por ter me acolhido desde minha chegada ao Brasil, fomentando minha aprendizagem na língua portuguesa, assim como minhas habilidades técnicas e profissionais no laboratório e fora dele através da elaboração de café brasileiro de garrafa de alta qualidade. Especialmente, a Leticia, Mari e Keylla, pelo envolvimento direto com este trabalho, a Oliveira pela amizade e apoio pessoal diário e a Angélica pela ajuda e orientação com os WB.

Aos Professores e funcionários da pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, especialmente à Claudia pela compreensão, orientação e ajuda nos assuntos administrativos deste trabalho.

À agência de fomento CNPq, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento e realização deste trabalho.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pelo apoio institucional para o desenvolvimento deste trabalho.

“La sociedad es poco mas que el producto de unos genes”

Steve Jones

RESUMO

elF5A é um fator de tradução envolvido com vários processos celulares, como o controle da proliferação celular e inflamação. Esse fator sofre uma modificação pós-traducional totalmente conservada e específica para sua ativação. Essa modificação é chamada de hipusinação e consiste na modificação de uma lisina específica em duas etapas: primeiro, a porção aminobutil da poliamina espermidina é transferida para o grupamento amino da cadeia lateral da lisina, pela ação da enzima desoxi-hipusina sintase; e, em seguida, o radical transferido sofre uma hidroxilação na posição beta, pela ação da desoxi-hipusina hidroxilase. Assim como elF5A, desoxi-hipusina sintase é altamente conservada em arquea e eucariotos e é essencial em *Saccharomyces cerevisiae*. A desoxi-hipusina sintase é inibida por N1-Guanyl-1,7-diaminoheptane (GC7), um análogo estrutural da espermidina. No entanto, estudos mais recentes demonstraram que o composto GC7 apresenta efeitos celulares independentes de elF5A, o que demonstra que este possui outros alvos. Além disso, não é conhecido como se dá o processo de transporte do GC7 para o meio intracelular ou se existem mecanismos de compartimentalização celular ou externalização do GC7. Por fim, também não são conhecidos mecanismos de metabolização celular do GC7. Desta forma, o presente projeto teve como objetivo a busca de novos alvos celulares para o composto GC7 utilizando rastreamento quimio-genético utilizando a coleção haploide de genes nocautes de *S. cerevisiae* (genes não essenciais). A partir do rastreamento, foram obtidos resultados de sensibilidade ao GC7 para 96 linhagens nocautes e de resistência para 107. As principais vias afetadas por GC7 estão relacionadas ao transporte e biossíntese de aminoácidos e poliaminas, acidificação vacuolar e ribofagia. Além da identificação destes, foram testados outros nocautes relacionados e foram identificados prováveis transportadores de GC7 para fora do citoplasma. Também foi verificado que GC7 reduz os níveis de putrescina, assim como em cultura de células de mamífero, e outros resultados deste trabalho também estão de acordo com um efeito de GC7 de impacto relevante nesta via de poliaminas. Um dos resultados mais importantes deste trabalho foi a resistência de mutantes de ribofagia a GC7, efeito este que se mostrou independente de elF5A. Por fim, demonstramos que *S. cerevisiae*, no *background* genético da coleção de nocautes, é altamente resistente a GC7 e que os efeitos de GC7 na célula não podem ser revertidos pela adição exógena de espermidina, seu análogo estrutural.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*. elF5A. Desoxi-hipusina sintase. Rastreamento. GC7.

ABSTRACT

eIF5A is a translation factor involved in several cellular processes, as cellular proliferation control and inflammation. This factor undergoes a very conserved and specific posttranslational modification necessary to its activation named hypusination, which consists in the modification of a specific lysine in two steps. First, deoxyhypusine synthase enzyme, transfers 4-aminobutyl moiety from polyamine spermidine to a specific lysine residue in eIF5A precursor; immediately, deoxyhypusine hydroxylase adds a hydroxyl moiety in eIF5A intermediate to generate eIF5A hypusinated. Both, eIF5A and deoxyhypusine synthase are highly conserved from archaea to eukaryotes and are essential in *Saccharomyces cerevisiae*. Deoxyhypusine synthase is inhibited by N1-Guanyl-1,7-diaminoheptane (GC7), a structural analogue of spermidine. Nevertheless, recent findings have demonstrated that GC7 shows independent cellular effects of eIF5A, pointing out that GC7 has other targets. Besides, it is not known how GC7 is transported into the cell or if there are mechanisms of cellular compartmentalization or externalization of GC7. At last, mechanisms in order to metabolize the compound GC7 are not known. Therefore, the present project aimed to find new cellular targets for the GC7 compound using chemo-genetic screening and the haploid collection of knockouts in *S. cerevisiae* (nonessential genes). From the screening, GC7 sensitivity results were obtained for 96 knockout strains and 107 knockout strains showed resistance. The main pathways affected by GC7 are related to the transport and biosynthesis of amino acids and polyamines, vacuolar acidification and ribophagy. In addition to identifying these, other related knockout strains were tested and probable GC7 transporters to outside the cytoplasm were identified. It has also been found that GC7 reduces the levels of putrescine as well as in mammalian cell culture, and other results of this work also agree with a relevant impact of GC7 in this polyamine pathway. One of the most important results of this work was the resistance of ribophagy mutants to GC7, which was shown to be independent of eIF5A. Finally, we demonstrate that *S. cerevisiae*, in the genetic background of the knockout collection, is highly resistant to GC7 and that the effects of GC7 on the cell can not be reversed by the exogenous addition of spermidine, its structural analogue.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*. eIF5A. Deoxyhypusine synthase. Screening. GC7.

Lista de Figuras

Figura 1. Via da biossíntese do resíduo de aminoácido hipusina no precursor de eIF5A.....	18
Figura 2. Via de biossíntese e degradação de poliaminas em <i>S. cerevisiae</i>	20
Figura 3. Possíveis processos a identificar mediante rastreamento quimio-genético em <i>S. cerevisiae</i>	22
Figura 4. Avaliação visual e quantitativa do crescimento diferencial de mutantes nocautes frente ao GC7.....	29
Figura 5. Curva de crescimento da linhagem WT ($\Delta ura10$).....	34
Figura 6. Efeito do GC7 no crescimento celular do selvagem (WT) e de mutantes de eIF5A (<i>hyp2-3</i>), Dys1 (<i>dys1-1</i>) e Lia1 ($\Delta lia1$) e sobre a hipusinação.....	42
Figura 7. Efeito do GC7 1 mM no crescimento celular do selvagem utilizado como borda das placas do rastreamento quimio-genético.....	43
Figura 8. Interações quimio-genéticas encontradas para o composto GC7 e interações genéticas descritas para a via de hipusinação em <i>S. cerevisiae</i>	44
Figura 9. Efeito do GC7 no crescimento celular de mutantes da via de síntese de poliaminas.....	47
Figura 10. Quantificação relativa de poliaminas intracelulares das linhagens selecionadas e efeito do GC7 nos níveis intracelulares de poliaminas no selvagem....	48
Figura 11. Efeito do GC7 no crescimento celular de nocautes de mutantes <i>downstream</i> e <i>upstream</i> da via de síntese de poliaminas.....	51
Figura 12. Efeito do GC7 no crescimento celular de nocautes de mutantes relacionados à biossíntese e transporte de pantotenato.....	52
Figura 13. Efeito do GC7 no crescimento celular das linhagens relacionadas a Trk1....	53
Figura 14. Efeito do GC7 no crescimento celular de linhagens relacionadas a transporte transmembrana.....	58
Figura 15. Efeito do GC7 no crescimento celular das linhagens relacionadas a transportadores MDR (<i>multidrug resistance</i>) do tipo <i>Plasma membrane ATP- binding cassette</i> (ABC).....	59
Figura 16. Efeito do GC7 no crescimento celular das linhagens relacionadas a ribofagia.....	61

Figura 17. Efeito do GC7 1 mM na macroautofagia através da atividade enzimática fosfatase alcalina (ALP) de Pho8 Δ N60.....	63
Figura 18. Efeito do GC7 sobre a clivagem de GFP-Atg8.....	64
Figura 19. Interações genéticas de $\Delta bre5$ e $\Delta ubp3$ com <i>hyp2-3</i> e níveis de eIF5A em $\Delta bre5$ e $\Delta ubp3$	65
Figura 20. Ensaio de competição GC7-espermidina.....	69
Figura 21. Diagrama dos efeitos celulares identificados para o inibidor de hipusinação GC7 em relação à coleção de nocautes em <i>S. cerevisiae</i>	82

Lista de Tabelas

Tabela 1. Linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas neste trabalho..... **24**

Tabela 2. Linhagens encontradas sensíveis ou resistentes ao GC7 a traves do rastreamento quimio-genético e ensaios confirmatórios..... **70**

Lista de Abreviaturas

<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
eIF5A.....	eukaryotic initiation factor 5A
GC7.....	<i>N1-Guanyl-1,7-diaminoheptane</i>
μ M.....	micromolar
mM.....	milimolar
M.....	molar
μ L.....	microlitro
min.....	minutos
h.....	horas
mm.....	milímetros
GO.....	<i>genetic ontology</i>
°C.....	graus Celcius
SPD.....	espermidina
WT.....	<i>wild type</i>
UV.....	ultravioleta
xg.....	unidade de força centrífuga
SC.....	<i>synthetic complete</i>
DO _{600nm}	densidade ótica em 600 nanómetros
DNA.....	ácido desoxirribonucléico
RNA.....	ácido ribonucleico
RNAi.....	ácido ribonucleico de interferencia
DTT.....	ditiotreitól
EDTA.....	ácido etilenodiaminotetracético

g..... grama

mg..... miligrama

kb..... quilobase

kDa..... quilodalton

SC..... meio sintético completo para levedura

SDS..... dodecil sulfato de sódio

ssDNA..... DNA de esperma de salmão

S-SPO..... *super-sporulation* (meio para esporulação de levedura)

TCA..... ácido tricloroacético

Tris tris-hidroximetilaminometano

HCl..... cloreto de hidrogénio

Tween 20..... monolaurato de polioxietilenosorbitana

YPD..... *yeast extract, peptone, dextrose* (meio rico para levedura)

LiAC..... acetato de lítio

N-terminal..... amino-terminal

PAGE..... eletroforese em gel de poliacrilamida

PBS..... solução salina tamponada com fosfato

PBST..... PBS com Tween 20

PMSF..... phenilmetylsulfonyl fluoride

PCR..... *Polymerase Chain Reaction*

PEG..... polietilenoglicol

pH..... potencial hidrogeniônico

Sumário

1. Introdução	17
2. Objetivos	23
2.1 Objetivo geral	23
2.2. Objetivos específicos	23
3. Materiais e Métodos	24
3.1. Materiais	24
3.2. Métodos	28
3.2.1. Rastreamento quimio-genético com a coleção de nocautes de <i>S.cerevisiae</i>	28
3.2.2. Análise quantitativa do rastreamento e definição do <i>fitness</i> relativo	30
3.2.3. Teste de diluição seriada	31
3.2.4. Teste de curva de crescimento quantitativa	31
3.2.5. Análise das curvas de crescimento	32
3.2.6. Quantificação de poliaminas intracelulares	34
3.2.6.1. Extração de poliaminas	34
3.2.6.2. Derivatização de poliaminas	35
3.2.6.3. Quantificação de poliaminas	35
3.2.7. Ensaio enzimático Pho8 Δ 60 (ALP <i>assay</i>)	36
3.2.8. Transformação de Levedura	37
3.2.9. <i>Western blot</i>	37

3.2.10. Cruzamento, esporulação e dissecação de <i>S. cerevisiae</i>	38
3.2.10.1. Cruzamento	38
3.2.10.2. Esporulação	38
3.2.10.3. Dissecação	39
3.2.10.4. Caracterização de tétrades	39
4. Resultados e Discussão	40
4.1. Efeitos do GC7 em <i>S. cerevisiae</i> e rastreamento quimio-genético	40
4.2. Predição dos efeitos do GC7 independentes de eIF5A	44
4.3. Efeito do GC7 na via de síntese de poliaminas	45
4.4. Efeito do GC7 sobre mutantes de transporte transmembrana	52
4.5. Efeito do GC7 em autofagia	60
4.6. Efeito do GC7 sobre outras vias	66
4.7. Competição GC7-espermidina	67
5. Conclusões	81
6. Referências	84

1. INTRODUÇÃO

A proteína eIF5A é altamente conservada de arquea a eucariotos e é uma proteína essencial em todos os organismos estudados até o momento. Essa proteína está envolvida com vários processos celulares, como o controle da proliferação celular (PARK et al., 1997; PARK, 2006), processo tumorigênico (MANDAL et al., 2015; MELNIKOV et al., 2016) e inflamação (MAIER; OGIHARA et al., 2010; MAIER; TERSEY et al., 2010; ROBBINS et al., 2010).

eIF5A sofre uma modificação pós-traducional única e conservada ao longo da evolução, chamada de hipusinação, a qual é necessária para sua ativação. Essa ocorre em duas etapas consecutivas: primeiro, a enzima desoxi-hipusina sintase (Dys1 em *S. cerevisiae*) transfere uma porção 4-aminobutil da poliamina espermidina a um resíduo específico de lisina em eIF5A (51 em eIF5A de *S. cerevisiae*); em seguida, o resíduo desoxi-hipusina é hidroxilado pela enzima desoxi-hipusina hidroxilase (Lia1 em *S. cerevisiae*), para formar o resíduo hipusina (PARK et al., 2006; PARK et al., 2010; Figura 1).

A enzima desoxi-hipusina sintase é inibida pelo composto N1-guanil-1,7-diamino-heptano (GC7), o qual é um análogo estrutural da poliamina espermidina. Um estudo com a estrutura obtida por cristalografia de desoxi-hipusina sintase mostrou que há a ligação do inibidor GC7 no sítio ativo de desoxi-hipusina sintase (UMLAND et al., 2004).

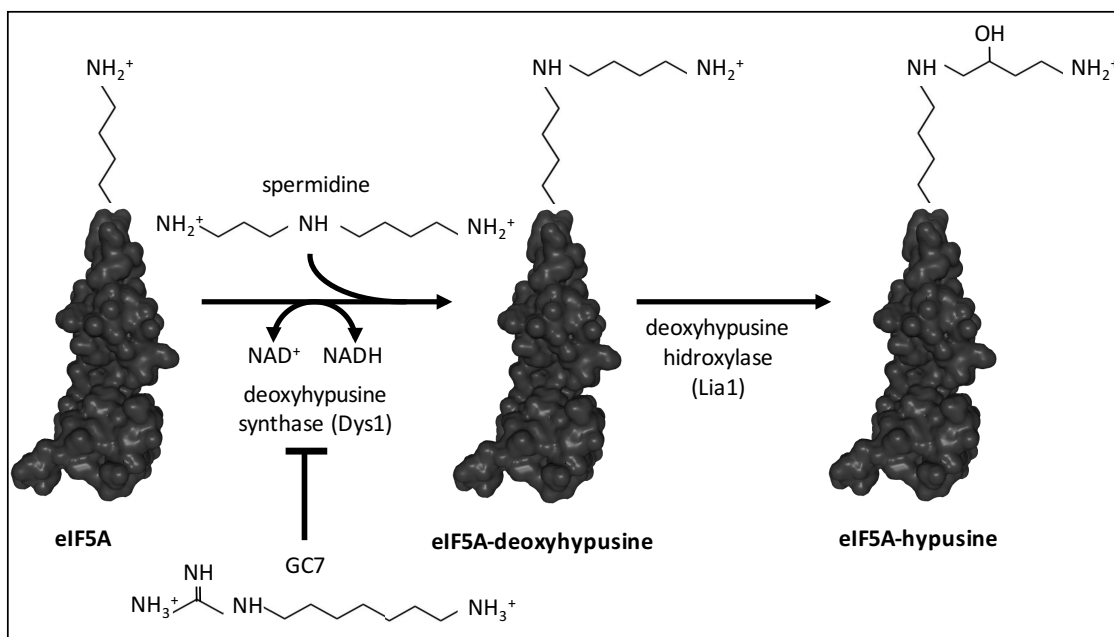


Figura 1. Via da biossíntese do resíduo de aminoácido hipusina no precursor de eIF5A. Esquema simplificado da modificação pós-traducional de eIF5A. A porção 4-aminobutil proveniente da poliamina espermidina é transferida para o resíduo de lisina do precursor inativo de eIF5A, por meio da ação da enzima desoxi-hipusina sintase (Dys1 em levedura). O intermediário resultante, agora contendo desoxi-hipusina, é posteriormente hidroxilado pela enzima desoxi-hipusina hidroxilase (Lia1 em levedura). Dys1 é inibida pelo composto N1-guanil-1,7-diamino-heptano (GC7).

As poliaminas putrescina, espermidina e espermina são moléculas ubíquas em células eucarióticas e estão envolvidas em uma série de processos relacionados com a proliferação celular e sobrevivência celular, atuando através de vários mecanismos diferentes, que podem envolver a ligação ao DNA, RNA, proteínas e fosfolipídios (WATANABE et al., 1991; MIYAMOTO et al., 1993). Recentemente foi demonstrado que a poliamina espermidina incrementa longevidade cronológica em *Saccharomyces cerevisiae* mediante aumento de macroautofagia (EISENBERG et al., 2009) e foram mostrados efeitos cardio protetores dessa poliamina através de aumento da longevidade em camundongos (EISENBERG et al., 2016).

As poliaminas podem ser importadas pelas células a partir do meio externo ou sintetizadas enzimaticamente através de vias metabólicas (PEREZ-LEAL; MERALI, 2012). A via de síntese de poliaminas em *S. cerevisiae* origina-se com a L-ornitina, que é convertida em putrescina pela ornitina descarboxilase (Spe1), uma enzima cuja produção é altamente regulada em

eucariotos. Por sua vez, a putrescina é convertida pela espermidina sintase (também chamada de putrescina-aminopropiltransferase - Spe3) em espermidina, que é subsequentemente utilizada para sintetizar espermina, através da espermina sintase (Spe4). O cofator S-adenosilmetioninamina é obtido a partir da S-adenosilmetionina pela enzima S-adenosilmetionina descarboxilase (Spe2). Tanto espermina, quanto N-acetyl-espermidina mas não espermidina podem ser oxidadas pela ação da poliamina oxidase Fms1, enzima que gera como produto de ambas degradações 3-aminopropanal, usado como substrato na biossíntese de β -alanina e pantotenato (WHITE; GUNYUZLU; TOYN, 2001; LANDRY; STERNGLANZ, 2003) (Figura 2). A via de síntese de poliaminas na célula está submetida a alta regulação mediante a proteína antizima (Oaz1 em *S. cerevisiae*), que é dependente das concentrações intracelulares de poliaminas. Vários estudos recentes mostram um aumento de poliaminas em vários tipos de células tumorais diferentes, assim como, apontam a importância do circuito poliaminas-hipusinação de eIF5A na prevenção e no tratamento contra o câncer (NAKANISHI; CLEVELAND, 2016).

O papel do inibidor GC7 na inibição do crescimento de diferentes linhagens de células eucarióticas e de células tumorais já foi descrito e é bem estabelecido na literatura (PARK et al., 2010; UMLAND et al., 2004). Além disso, estudos recentes demonstram que o co-tratamento com GC7 e cetuximab diminui significativamente a viabilidade de células de câncer de pulmão em comparação com o tratamento apenas com cetuximab (WANG et al., 2016), assim como o co-tratamento com GC7 e gemcitabina diminui a viabilidade em células de adenocarcinoma pancreático (PDAC) e este efeito está relacionado com a inibição de eIF5A (YAO et al., 2017).

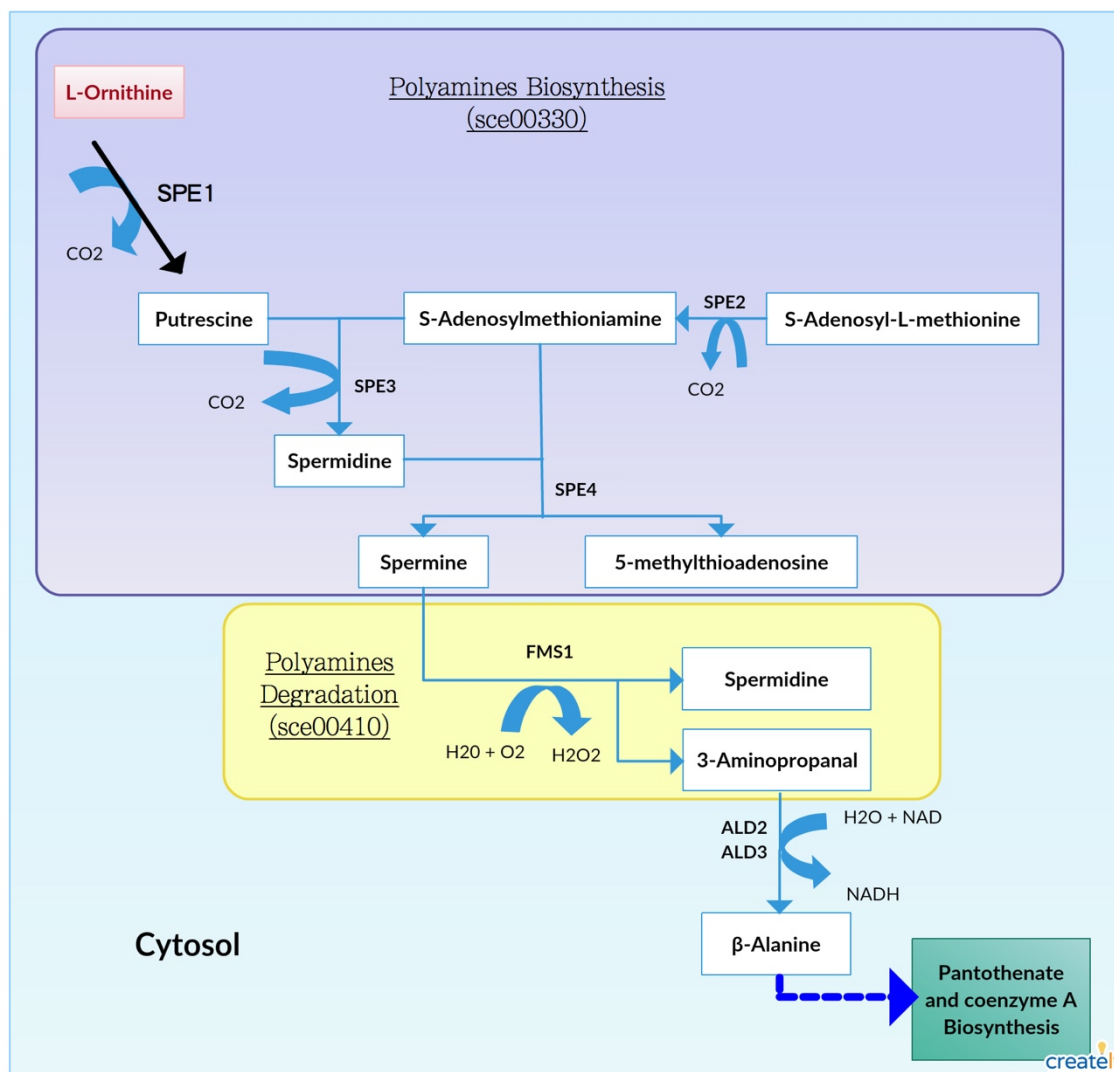


Figura 2. Via de biossíntese e degradação de poliaminas em *S. cerevisiae*. Os nomes dos genes correspondentes às enzimas estão mostrados em preto e maiúscula. As poliaminas aqui são: putrescina, espermidina e espermina. Figura construída a partir de *KEGG PATHWAY Database* (<http://www.kegg.jp>) usando a ferramenta *creately app* (<https://creately.com>). Os códigos dos mapas metabólicos sce00330 e sce00410 mostrados em parênteses correspondem a *arginine and proline metabolism* e *beta-alanine metabolism* respectivamente para o organismo *Saccharomyces cerevisiae*.

Compostos bioativos, tais como o GC7, são largamente utilizados para modular a função de proteínas e podem constituir importantes ferramentas para a compreensão da fisiologia celular, mais especificamente, na função de proteínas celulares específicas, como desoxi-hipusina sintase e eIF5A, assim como podem dar origem a novos fármacos. No entanto, apesar da comprovada atividade de inibição de desoxi-hipusina sintase e, consequentemente, da

maturação de eIF5A, *in vitro* e *in vivo* por GC7, trabalhos recentes demonstraram que desoxi-hipusina sintase não é o único alvo celular de GC7. Em um deles, utilizando cultura de células de mamífero, foi demonstrado que GC7 induz uma parada no início da tradução e que essa parada está relacionada à fosforilação de eIF2 e eIF4E-binding proteins 1 (4E-BP1), assim como o tratamento com GC7 apresentou uma diminuição nos níveis de poliaminas, sugerindo um aumento da antizima, proteína inibidora da via (LANDAU et al., 2010). Por outro lado, *knockdown* de eIF5A por RNAi, nesse mesmo trabalho, induziu parada da elongação da tradução. Dessa forma, apesar de inibir a função de eIF5A, GC7 interfere também com outros processos celulares, isto é, não possui especificidade (LANDAU et al., 2010). Em outro estudo, ficou demonstrado que o tratamento com GC7 causa uma indução de autofagia basal, que é independente da presença de eIF5A, e alterações nos níveis de eIF5A também não influenciam autofagia basal na ausência de GC7 (OLIVERIO et al., 2014). Além disso, apesar de GC7 inibir muito menos o crescimento de *Escherichia coli* em comparação com arqueas, diminuição de 1,3 vezes no tempo de geração em comparação com inibição total do crescimento com GC7 a 1 mM, houve diferença significativa, sugerindo uma ação do GC7 sobre bactéria (MATTIAS JANSSON; MALANDRIN; JOHANSSON, 2000).

A determinação de alvos para drogas e pequenas moléculas bioativas pode ser realizada através do crescimento celular comparativo; a taxa de crescimento é um dos fenótipos mais fáceis de se medir em levedura e, portanto, é a medida mais amplamente utilizada de aptidão celular. Assim, a coleção de nocautes de *S. cerevisiae*, um conjunto de mutantes que abrange todos os genes não essenciais desse organismo, tem permitido a realização de experimentos de larga escala mediante crescimento comparativo (com e sem droga) de cada um dos mutantes da coleção nocaute, como medida fenotípica da sensibilidade ou resistência para a referida droga (KUZMIN et al., 2014). O crescimento relativo de cada linhagem da coleção nas condições com e sem droga gera uma lista de categorização dos genes em função da resposta de crescimento da linhagem mutante para esse gene. Essa lista categorizada de genes cujos mutantes são sensíveis ou resistentes a uma droga fornece um perfil ou "assinatura", que caracteriza o efeito que essa droga tem sobre a

célula (PARSONS et al., 2006). Rastreamentos de quimio-genética em *S. cerevisiae* já foram utilizados em diversos trabalhos para entender o mecanismo de ação de uma série de moléculas biologicamente ativas, assim como para entender sua metabolização e transporte celular (LANTHALER et al., 2011; LEE et al., 2014; BILSLAND et al., 2016;). Desta forma, determinar novos alvos de interação celular de GC7 permitirá avaliar seu grau de especificidade à enzima desoxi-hipusina sintase, assim como poderia elucidar novas vias de metabolização, transporte e extrusão celular do inibidor GC7 (Figura 3).

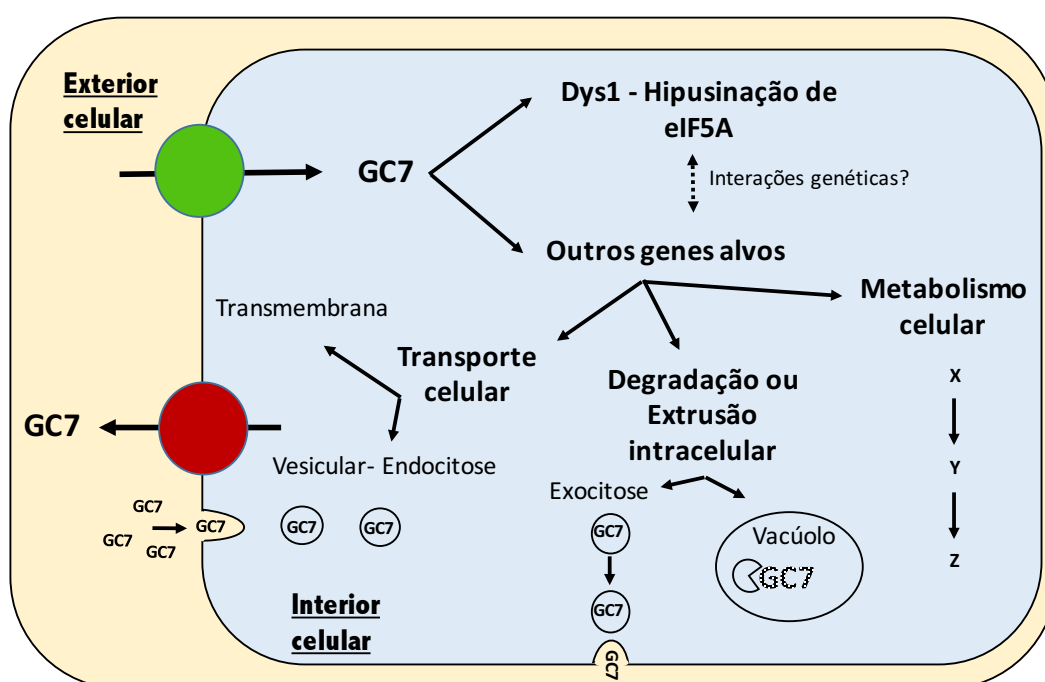


Figura 3. Possíveis processos a identificar mediante rastreamento quimio-genético em *S. cerevisiae*. Círculos verde e vermelho representam proteínas responsáveis pelo transporte transmembrana para o interior e exterior celular, respectivamente, assim como x, y e z proteínas ou enzimas relacionadas ao metabolismo celular. Círculos desenhados em preto representam diferentes compartimentos celulares como endossomo, exossomo e vacúolo.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O presente projeto tem como objetivo geral a busca de novos alvos celulares do composto GC7, utilizando rastreamento quimio-genético em coleções de mutantes de *S. cerevisiae*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.2.1.** Busca de novos alvos celulares do composto GC7, utilizando rastreamento quimio-genético em coleções de mutantes de *S. cerevisiae*.
- 2.2.2.** Confirmação dos resultados obtidos no rastreamento quimio-genético, para linhagens determinadas, em teste de diluição seriada e curva de crescimento quantitativo.
- 2.2.3.** Análises dos *hits* obtidos no rastreamento por Ontologia genética (*Genetic Ontology* - GO).
- 2.2.4.** Quantificação dos níveis de poliaminas na presença e ausência de GC7.
- 2.2.5.** Quantificação de antizima usando repórter de Oaz1.
- 2.2.6.** Sub-rastreamento utilizando ensaio de curva de crescimento de nocautes de genes relacionados a transporte transmembrana.
- 2.2.7.** Avaliar o efeito do inibidor GC7 em macroautofagia.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

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

Linhagem	Genótipo	Finalidade	Origem
Coleção nocautes (BY)	<i>MAT_a his3 leu2 ura3 met15</i> <i>*geneX::kanMX4</i>	rastreamento químio- genético e verificação	Laboratório Dra. Anita Corbett
SVL272 (BY)	<i>MAT_a his3 leu2 met15 ura3</i>	linhagem de partida para VZL1411	Coleção do laboratório
SVL613 (FY)	<i>MAT_a leu2 trp1 ura3 his3</i> <i>dys1::HIS3 [DYS1/TRP/CEN]***</i>	ensaios sensibilidade GC7	Coleção do laboratório
SVL614 (FY)	<i>MAT_a leu2 trp1 ura3 his3</i> <i>dys1::HIS3 [dys1-1/TRP/CEN]***</i>	ensaios sensibilidade GC7	Coleção do laboratório
SVL621 (BY)	<i>MAT_a ade2 ade3 his3 leu2 trp1 ura3</i> <i>lia1::HIS3</i>	linhagem de partida para VZL1414	Coleção do laboratório

VZL1293 (AD1-7)	<i>MATα ura3 his1 Δyor1::hisG Δsnq2::hisG pdr5-Δ2::hisG Δpdr10::his Δpdr11::hisG</i>	ensaios sensibilidade GC7	Rogers et al; 2001
VZL1294 (AD1-9)	<i>MATα ura3 his1 Δyor1::hisG Δsnq2::hisG Pdr5- Δ2::hisG Δpdr10::his Δpdr11::hisG Δpdr15::hisG pdr1- Δ3::hisG</i>	ensaios sensibilidade GC7	Rogers et al; 2001
VZL1295 (US50-18C)	<i>MATα ura3 his1 Δpdr1-3</i>	ensaios sensibilidade GC7	Rogers et al; 2001
VZL1352 (BY)	<i>MATα his3 leu2 ura3 met15 Δsnq2::KI(LEU2) Δpdr3::KI(URA3) Δpdr1::NATMX4</i>	ensaios sensibilidade GC7	Laboratório Dra. Brenda Andrews
VZL1363 (BY)	<i>MATα can1pr::TDH3pr- E2Crimson::Hph::can1Δ::STE2pr- LEU2** lyp1 his3 leu2 ura3 met15 HYP2::natMX4</i>	ensaios sensibilidade GC7; linhagem de partida para VZL1405	Coleção do laboratório

VZL1364 (BY)	<i>MATα can1pr::TDH3pr- E2Crimson::Hph::can1Δ::STE2pr- LEU2** lyp1 his3 leu2 ura3 met15 hyp2-3::natMX4</i>	linhagem de partida para VZL1408, autofagia e transporte	Coleção do laboratório
VZL1405 (BY)	<i>MATα can1pr::TDH3pr- E2Crimson::Hph::can1Δ::STE2pr- LEU2** lyp1 his3 leu2 ura3 met15 HYP2::natMX4 pho8ΔN60::kanMX4</i>	ensaio de Pho8 Δ N60 (autofagia)	Este trabalho
VZL1408 (BY)	<i>MATα can1pr::TDH3pr- E2Crimson::Hph::can1Δ::STE2pr- LEU2** lyp1 his3 leu2 ura3 met15 hyp2-3::natMX4 pho8ΔN60::kanMX4</i>	ensaio de Pho8 Δ N60 (autofagia)	Este trabalho
VZL1411 (BY)	<i>MATα his3 leu2 trp1 ura3 pho8ΔN60::kanMX4</i>	ensaio de Pho8 Δ N60 (autofagia)	Este trabalho
VZL1414 (BY)	<i>MATα ade2 ade3 his3 leu2 trp1 ura3 lia1::HIS3 pho8ΔN60::kanMX4</i>	ensaio de Pho8 Δ N60 (autofagia)	Este trabalho

VZL1417 (BY)	<i>MATα can1pr::TDH3pr- E2Crimson::Hph::can1Δ::STE2pr- LEU2** lyp1 his3 leu2 ura3 met15 HYP2::natMX4 [GFP-ATG8 / URA3]</i>	ensaio de GFP-ATG8 (autofagia)	Este trabalho
VZL1418 (BY)	<i>MATα can1pr::TDH3pr- E2Crimson::Hph::can1Δ::STE2pr- LEU2** lyp1 his3 leu2 ura3 met15 hyp2-3::natMX4 pho8Δ60::kanMX4 [GFP-ATG8 / URA3]</i>	ensaio de GFP-ATG8 (autofagia)	Este trabalho
VZL1421 (BY)	<i>MATα his3 leu2 ura3 met15 atg7Δ::kanMX4 [GFP-ATG8 / URA3]</i>	ensaio de GFP-ATG8 (autofagia)	Este trabalho
VZL1422 (BY)	<i>MATα his3 leu2 ura3 met15 oaz1Δ::kanMX4 [GFP-ATG8 / URA3]</i>	ensaio de GFP-ATG8 (autofagia)	Este trabalho
VZL1423 (BY)	<i>MATα his3 leu2 ura3 met15 spe1Δ::kanMX4 [GFP-ATG8 / LEU2]</i>	ensaio de GFP-ATG8 (autofagia)	Este trabalho

VZL1433 (BY)	<i>MATa his3 leu2 ura3 met15 ura10::KanMX4</i>	borda da coleção ko; utilizado como WT para coleção ko	Laboratório Dra. Brenda Andrews
-----------------	--	---	---------------------------------------

* *geneX* corresponde a cada um dos mutantes contidos na coleção nocaute, totalizando aproximadamente 4.200 diferentes mutantes.

** *STE2pr-LEU2* corresponde ao gene selvagem *LEU2* de *S. cerevisiae*, controlado pelo promotor do gene *STE2* de *S. cerevisiae* (ativo apenas em linhagens do tipo *MATa*), que complementa o nocaute de *LEU2* de *S. cerevisiae*.

*** Linhagens derivadas de diploide do cruzamento FY86 + PSY685 (haploide derivado do cruzamento FY86 + FY23), gerada por inserção do cassete $\Delta dys1::HIS3$ (GALVÃO et al., 2013). FY23: *MATa leu2Δ1 trp1Δ63 ura3-52* (WINSTON; DOLLARD; RICUPERO; HOVASSE, 1995); FY86: *MATalpha his3Δ200 leu2Δ1 ura3-52*; PSY685: *MATa leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ63 ura3-52* (STAGE-ZIMMERMANN et al., 2000).

3.2. Métodos

A manutenção e cultivo das linhagens de *S. cerevisiae*, a composição e o preparo dos meios de cultura e soluções e os protocolos das técnicas utilizadas neste trabalho seguiu os procedimentos padrões descritos nos manuais de laboratório: (AMBERG et al., 2005; AUSUBEL et al., 2003; GUTHRIE; FINK, 1991).

3.2.1. Rastreamento quimio-genético com a coleção de nocautes de *S. cerevisiae*

A coleção de linhagens nocaute de *S. cerevisiae* consiste de 18 placas de meio sólido (YPD + G418 – marca de seleção do gene nocauteado). Cada placa possui 384 posições e cada uma corresponde a uma linhagem de *S. cerevisiae*, contendo um gene especificamente nocauteado, totalizando cerca de 4200 linhagens mutantes.

O repique de todas as linhagens da coleção em diferentes meios de cultura é feito de maneira automatizada, utilizando-se o equipamento Rotor HDA (Singer Instruments). Esse instrumento, além de propagar a coleção, permite ainda que, uma placa de 384 posições seja replicada 4 vezes em

placas de mesmas dimensões, transformando-se em uma placa de 1.536 posições.

Desta forma, as 18 placas da coleção nocaute de *S. cerevisiae* foram crescidas a 30 °C em meios de cultura SC+G418 (300 µg/ml) e SC+G418 (300 µg/ml) + GC7 (1 mM), em formato de 1.536 posições, ou seja, cada linhagem foi estudada em quadruplicata.

A diferença de crescimento entre as duas situações amostrais foi feita de maneira qualitativa, por avaliação visual (Figura 4) e, de maneira quantitativa, através do processamento de imagem automatizado. Para a análise quantitativa, as imagens foto-documentadas na resolução de 600 *dots per inch* (DPI) foram processadas usando o pacote SGAtools (<http://sgatools.ccb.utoronto.ca/about>), que permite a conversão do tamanho relativo das colônias contidas em cada placa em número de pixels. Como a maioria das tecnologias envolvendo análise em larga escala de crescimento celular em meio sólido, as medidas de tamanho de colônia são afetadas por vários interferentes experimentais que reduzem a precisão das estimativas de crescimento. Para corrigir esses interferentes e gerar uma categorização mais precisa, foi colocada nas bordas das placas uma linhagem selvagem (controle), evitando o efeito de competição por nutrientes nas bordas, assim como, permitindo uma posterior normalização interna por placa a partir do tamanho das colônias já quantificadas (Figura 4B).

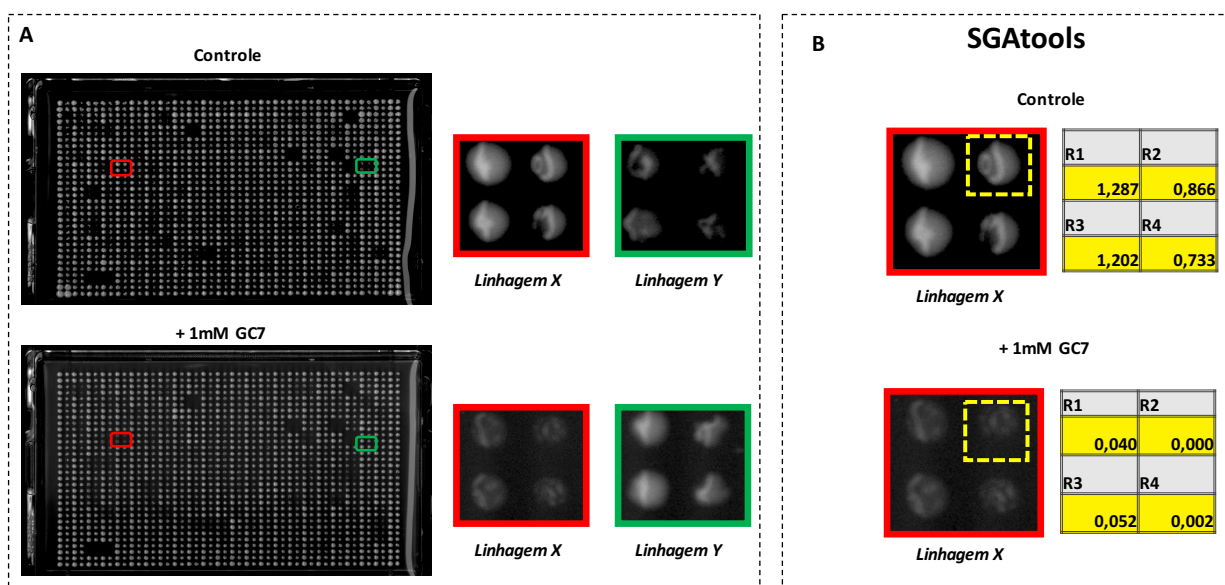


Figura 4. Avaliação visual e quantitativa do crescimento diferencial de mutantes nocautes frente ao GC7. (A) Exemplo de avaliação visual, mostrando a placa controle sem GC7 e a placa contendo 1 mM de GC7. Cada uma dessas placas contém o mesmo conjunto de nocautes, organizados em quatriplicata (formato 1.536). Os quadrados destacados em vermelho e em verde nas placas estão ampliados à direita da sua respectiva placa de origem para melhor visualização do crescimento dos mutantes. (B) Exemplo de quantificação mediante o software SGAtools, após a normalização do tamanho de cada colônia (pixels) pela linhagem controle. R1, R2, R3 e R4 correspondem as replicatas 1, 2, 3 e 4, respectivamente. Os tamanhos de colônias normalizados estão recolhidos nas caixas com fundo amarelo. *Linhagem X* e *Linhagem Y* correspondem com linhagem sensível e resistente a 1 mM de GC7, respectivamente.

3.2.2. Análise quantitativa do rastreamento e definição do *fitness* relativo

A comparação de crescimento de cada linhagem nocaute nos meios controle (sem droga) e teste (com GC7 1 mM) foi realizada da seguinte forma:

1. Determinação do tamanho da colônia, definido de duas maneiras distintas:
 - a. número de pixels de cada colônia – dado bruto;
 - b. número de pixels de cada colônia dividido pela mediana do número de pixels das colônias da placa – dado pré-normalizado;
2. Normalização do tamanho de colônia: razão do tamanho de colônia de linhagens nocaute pela mediana do tamanho de colônia de linhagens selvagens de mesma situação e placa amostral;
3. Determinação de *fitness* relativo (FR): razão do tamanho de colônia normalizado de linhagens nocaute crescidas em meio teste (com GC7) pelo tamanho de colônia normalizado de linhagens nocaute crescidas em meio controle (sem GC7).

Para este estudo, o FR foi calculado de duas formas distintas: a) os valores de dados brutos de número de pixels; b) os valores pré-normalizados.

Teste estatístico *t* foi utilizado nos valores de tamanho de colônia normalizados, para verificar se a diferença de crescimento era significativa, considerando nível de confiabilidade de 0,05.

Para a classificação de linhagens sensíveis e resistentes, foram considerados os seguintes parâmetros:

- a) Valores do FR foram estudados independentemente para cada uma das 4 réplicas experimentais. Assim foram calculados o percentil 5 (P_5) e o percentil 95 (P_{95}) para cada FR. Dessa forma, uma linhagem foi considerada um *hit* de sensibilidade ou resistência, se seu valor de FR nas 4 réplicas estivessem coincidentemente nas extremidades das curvas de distribuição do *Fitness* Relativo de todo o rastreamento. Em outras palavras, definem-se como sensíveis as linhagens que apresenta um FR compreendido entre o valor mínimo e o P_5 e que estejam coincidentes nas 4 replicatas, e resistentes, as linhagens com um FR compreendido entre P_{95} e o valor máximo. *T-student* foi realizada para a devida confirmação estatística da qualidade da análise por percentis, aceitando no mínimo 95% de confiança.
- b) para análises utilizando os dados de número de pixels pré-normalizados, linhagens que apresentaram, nas quatro réplicas, um FR menor que 1, foram consideradas sensíveis, enquanto que FR maior que 1 representam as linhagens resistentes.

3.2.3. Teste de diluição seriada

As linhagens de *S. cerevisiae* foram crescidas a 25 ou 30°C em 10 mL de meio adequado até aproximadamente $1-2 \times 10^7$ células/mL. Após centrifugação a 3.000 xg por 10 min e remoção do meio de cultura, as células foram suspensas na concentração de aproximadamente $2-5 \times 10^8$ células/mL ($OD_{600nm}=5,0$). Uma alíquota de 200 μ L dessa suspensão foram transferidos para um poço de microplaca (96 poços) e a suspensão diluída serialmente (1:10) em meio líquido apropriado. Utilizando um pipetador multicanal, 2,5 μ L da suspensão original e das diluições foram aplicados nos meios de cultura sem e com 1 ou 2 mM de GC7. Em seguida, as placas foram incubadas na temperatura indicada até a observação de crescimento.

3.2.4. Teste de curva de crescimento quantitativa

As linhagens selecionadas, foram crescidas a 30°C em 10 mL de meio adequado até aproximadamente $1-2 \times 10^7$ células/mL. Em seguida, as linhagens foram diluídas para uma concentração de partida de aproximadamente $1-2 \times 10^6$ células/mL ($OD_{600nm}=0,1-0,2$). 150 μ L destas diluições foram transferidos em

triplicata para poços de microplaca em formato de 96 poços de fundo chato - SPL (código 004393) contendo ou não 1 mM de aminoguanidina junto com as diferentes concentrações de GC7 usadas nesse trabalho e especificadas nas figuras. G418 (300 µg/ml) foi adicionado quando necessário. Os valores da OD_{600nm} foram registrados periodicamente a cada 10 ou 30 min, por um período total de 12-15 ou 24 horas pelo equipamento Infinite 200 Pro (TECAN).

3.2.5. Análise das curvas de crescimento

Uma vez realizadas as curvas de crescimento das linhagens selecionadas, essas foram analisadas através do uso do pacote *growthcurver.R* (SPROUFFSKE; WAGNER, 2016), o qual permitiu uma análise mais completa das curvas de crescimento, assim como, uma melhor interpretação biológica das mesmas. Esse pacote do R permite o uso da equação logística de crescimento:

$$N(t) = \frac{K}{1 + \left(\frac{K - N0}{N0} \right) e^{rt}}$$

$N(t)$ = número de células no tempo t . $N0$ = número de células no tempo 0
 K = tamanho máximo da população. r = taxa de crescimento intrínseca

E encontra os melhores valores para $N0$, K e r mediante o uso do algoritmo não linear de mínimos quadrados *Levenberg-Marquardt algorithm* (LMA). Além dos parâmetros já mencionados, o parâmetro tempo de geração (*doubling time*) foi calculado mediante o pacote da seguinte forma:

$$t_{DT} = \frac{\ln 2}{r}$$

t_{DT} = tempo de geração $\ln 2$ = logaritmo natural r = taxa de crescimento

Os pacotes auxiliares *readxl.R* (WICKHAM et al., 2016) e *RStudio.R* (RSTUDIO TEAM, 2016), entre outros, foram usados para facilitar estas análises. Estes parâmetros de crescimento celular foram amplamente utilizados em diferentes estudos recentes pois facilitam a interpretação biológica dos dados experimentais (HASENBRINK et al., 2005; MARULLO et al., 2009;

BILSLAND et al., 2016; DODGSON et al., 2016;). Desta forma, os parâmetros tempo de geração (*doubling time*) e capacidade de carga (K) (Figura 5) tornam-se muito interessantes para a comparação do crescimento celular das diferentes linhagens nas condições da ausência ou presença do composto GC7. Assim, nesse estudo, foram definidas linhagens sensíveis aquelas que apresentaram uma diminuição na capacidade de carga ou incremento no tempo de geração. Pelo mesmo princípio foram consideradas linhagens resistentes, aquelas linhagens que apresentaram um aumento na capacidade de carga ou diminuição no tempo de geração. Em todos os casos, a significância estatística foi verificada utilizando o teste *t-student* para $n=3$ e aceitando no mínimo um 95% de confiança. Os parâmetros analisados neste trabalho, assim como o respetivo *p-value* se encontram descritos no Anexo I. *Script* para o pacote R encontra-se descrito no Anexo II.

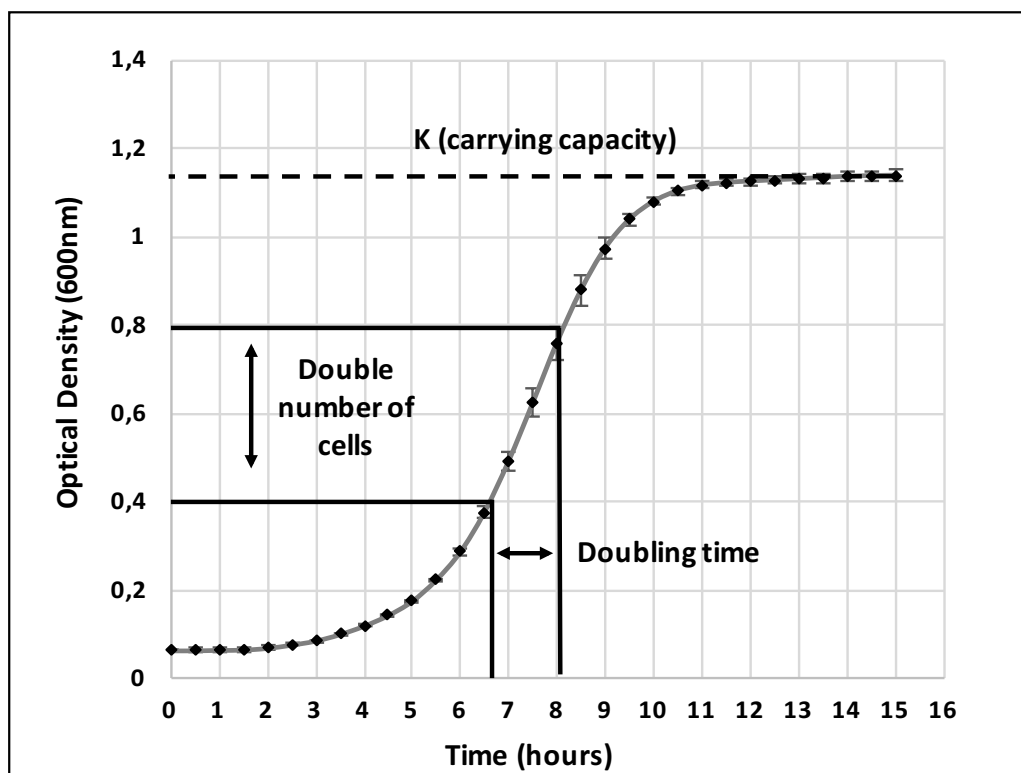


Figura 5. Curva de crescimento da linhagem WT ($\Delta ura10$). A linhagem usada como WT nas comparações das curvas de crescimento foi diluída em triplicata para $1-2 \times 10^6$ células/mL; em seguida, foi crescida por um período de 15 horas em agitação constante. Os valores de DO_{600nm} foram registrados a cada 30 minutos. Valores de DO_{600nm} foram convertidos pelo *simple moving average* (SMA) para suavizar a curva. Cada ponto representa a *media $\pm$ S.E.M.*, $n = 3$. Capacidade de carga e tempo de geração (*doubling time*) são destacadas para um melhor entendimento do significado biológico dos parâmetros escolhidos.

3.2.6. Quantificação de poliaminas intracelulares

3.2.6.1. Extração de poliaminas

As linhagens selecionadas foram crescidas a 30°C em 10 mL de meio SC até aproximadamente $1-2 \times 10^7$ células/mL. Em seguida, as linhagens foram diluídas para uma concentração de partida de $1-2 \times 10^6$ células/mL e crescidas na ausência ou presença de GC7 1 mM até atingirem 1-1,2 DO_{600nm} . Imediatamente, as células foram centrifugadas e lavadas 3 vezes com H_2O Mili-Q estéril para tirar o excesso de poliaminas presentes no meio de cultura. Em seguida, as células foram ressuspensas em 100 μL de TCA 5% (ácido tricloroacético) e lisadas em uma proporção 1:4 de *beads* de vidro para células, usando o equipamento Fast-Prep em 3 pulsos de 25 s, seguido de 1 min em

gelo. Após a extração, os extratos foram clarificados mediante centrifugação por 15 min a 10.600 xg e os clarificados estocados a -20°C.

3.2.6.2. Derivatização de poliaminas

Os padrões das poliaminas putrescina, espermidina e espermina, em uma concentração de 10 mM (TCA 5%), assim como os clarificados contendo as poliaminas intracelulares (TCA 5%), foram submetidos à derivatização química com o composto cloreto de dansila. Para isto, 100 µL dos padrões ou clarificados (TCA 5%) foram derivatizados com 200 µL de cloreto de dansila (6 mg/mL em acetona) e, após a adição de 10 mg de carbonato de sódio, a reação foi realizada por 16 horas à temperatura ambiente no escuro, como descrito anteriormente em (PARK et al., 2010). Após isso, os padrões e os extratos celulares contendo as poliaminas derivatizadas foram extraídos com 200 µL de tolueno e, em seguida, o solvente foi submetido à evaporação e as amostras foram estocadas no escuro na geladeira até o momento da análise.

3.2.6.3. Quantificação de poliaminas

A análise dos níveis de poliaminas foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As amostras contendo os padrões de poliaminas ou as poliaminas intracelulares derivatizadas foram ressuspensas em 100 µL de acetonitrila (ACN) por sonicação e imediatamente analisadas por CLAE usando uma Coluna C-18 Phenomenex Luna 5 µm 250 x 4,6 mm d.i.; eluição com gradiente de ACN:H₂O 70-100% em 40 min; fluxo 1,0 mL/min, detector UV 254 nm utilizando o equipamento Cromatógrafo Líquido Shimadzu Prominence Analítico. Bombas: LC-20AT; Autosampler: SIL-20A; Forno de coluna: CTO-20A; Detector: SPD-M20A e Controladora: CBM-20A. Obtidos os cromatogramas dos extratos celulares, quantificados em unidades de fluorescência relativa (254nm), foram quantificadas as áreas dos picos cromatográficos, correspondentes para cada uma das poliaminas derivatizadas presentes nos extratos, utilizando o software *LC-solutions*.

3.2.7. Ensaio enzimático Pho8Δ60 (ALP assay)

Este ensaio permite a quantificação de macroautofagia através da atividade de fosfatase alcalina de Pho8. A proteína Pho8 encontra-se naturalmente no Retículo Endoplasmático (RE) e é transportada mediante via secretória para o vacúolo, onde é ativada por proteólise, permitindo sua atividade de fosfatase alcalina. Pho8Δ60 trata-se de uma proteína truncada dos primeiros 60 aminoácidos, incluindo o peptídeo sinal para RE deletados. Assim, Pho8Δ60 permanece no citoplasma e a única via pela qual é transportada para o vacúolo é através de macroautofagia. Dessa forma, é possível quantificar a desfosforilação do substrato α -naftill fosfato por Pho8Δ60 no vacúolo mediante ensaio espectrofotométrico, pois o produto α -naftol quando excitado a 345 nm emite luz a 472 nm (TORGGLER; PAPINSKI; KRAFT, 2017). Assim, a quantidade de fluorescência emitida é diretamente proporcional ao fluxo macroautofágico (KAINZ et al., 2017). As linhagens selecionadas foram geradas em colaboração com o Dr. Agustín Hernández López por recombinação homóloga a partir do produto de PCR de pYM-N14 (JANKE et al., 2004) usado como molde (resistência para G418) e os oligonucleotídeos PHO8-SP1

(TATCAGCATACGGGACATTATTTGAACGCGCATTAGCAGCcggtacgctgcaggctg) e PHO8-SP2

(TCACGAAGAATATGACATTCTTCTTCTTGTGTGATGCAGAcatcgatgaattctctgcg). Os mutantes foram confirmados por PCR usando os oligos AHL-PHO8D60-Check-fwd (GCCGAATTCATGTCTGCATCACACAAGAAG) e AHL-PHO8D60-rev (CGCCTTGAGGGTAGAAATGG) como descrito em (NODA; KLIONSKY, 2008) (Anexo III). Estas linhagens selecionadas foram crescidas em meio SC contendo ou não GC7 1 mM, imediatamente lisadas e tiveram sua atividade de Pho8Δ60 medida como descrito anteriormente. Como controle positivo da atividade de Pho8Δ60, a macroautofagia foi induzida por depleção de nitrogênio por 1 h.

3.2.8. Transformação de levedura

Inicialmente, uma colônia de *S. cerevisiae* foi inoculada em 5 mL de meio apropriado e incubada a 25°C sob agitação por um período de 16 h. Após esse período, 500 µL da cultura foram centrifugados a 16.000 xg por 5 s. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1 mL de LiAc 100 mM e incubadas sob agitação por 15 minutos a 25°C. Terminado esse período, as células foram centrifugadas na condição anterior por 5 s e os seguintes componentes foram sequencialmente adicionados: 480 µL de PEG 4000 (50%), 72 µL de LiAc 1 M, 100 µL de DNA carregador (DNA de espermatozoides de salmão; 2 mg/mL), 5 µL de DNA plasmidial a ser transformado e 63 µL de água Milli-Q estéril. O conteúdo foi ressuspendido e logo em seguida incubado por 20 min a 42°C para choque térmico. As células foram centrifugadas a 16.000 xg por 10 s e ressuspensas em 100 µL de água Milli-Q estéril. A seguir, foram plaqueadas em meio seletivo e incubadas na temperatura adequada até a obtenção de colônias.

3.2.9. Western blot

As linhagens de interesse foram diluídas para uma concentração de partida de 0,1 DO_{600nm}, se necessário nesse momento foram ou não tratadas com veículo (ácido acético 100 µM), GC7 ou espermidina. Em seguida, foram crescidas em meio seletivo a 30 °C por 12 h. Nesse momento, se necessário, foi induzida macroautofagia por depleção de nitrogênio, através da transferência para meio de cultura YNB + glicose por 2 h como descrito em (KAINZ et al., 2017). Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em 200 µL de tampão (Tris HCl pH 7,5 20 mM; DTT 2 mM; PMSF 2 mM; coquetel de inibidor de protease PLAC; EDTA 2 mM) e lisadas sob agitação após adição de aproximadamente 5 mg de *glass beads*, utilizando o equipamento Fast-Prep em 3 pulsos de 25 s seguido de 1 min em gelo. O extrato foi clarificado por centrifugação a 10.600 xg a 4°C, por 15 min e a concentração de proteína total foi determinada pelo método Bradford.

As amostras proteicas foram separadas por eletroforese em gel de poliácridamida na presença de SDS (SDS-PAGE) e transferidas (utilizando transferência semiseca) para membrana de nitrocelulose. A membrana foi

bloqueada à temperatura ambiente por 30 min em tampão PBST (PBS 1X, 0.25% Tween-20) contendo 10% de leite desnatado, sob agitação. Em seguida, as membranas foram incubadas com uma diluição adequada de soro primário em PBST por 2 h à temperatura ambiente. Após esse período, as membranas foram lavadas por 6 min, quatro vezes com PBST e incubadas novamente com anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase, diluído corretamente em PBST por 45 min à temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram lavadas por 6 min, quatro vezes com PBST e foram tratadas com reagentes quimioluminescentes (ECL-GE Healthcare) e reveladas utilizando o equipamento C-Digit (LI-COR 3600). Anticorpos policlonais anti-*rabbit* usados: anti-eIF5A (1:15.000), anti:Pub1(1:15.000), anti-hypusine (1:2.000) e anti-GFP (1:2.000).

3.2.10. Cruzamento, esporulação e dissecação de *S. cerevisiae*

A técnica descrita a seguir foi realizada na obtenção de todas as linhagens utilizadas nos testes de interação genética.

3.2.10.1. Cruzamento

A linhagem haploide VZL1364 (*hyp2-3*) contendo o cassete de seleção para Norseotrisina (*NatMX4*) foi cruzada com as linhagens $\Delta ubp3$, $\Delta bre5$ e $\Delta fen2$, todas elas contendo o cassete de seleção para G418 (*KanMX4*) na superfície de ágar YPD e incubadas por uma noite a 25°C. A seleção de diplóides foi feita pela transferência, com veludo estéril, do crescimento obtido na placa de YPD para uma placa de YPD + G418 (300 µg/ml) + norseotrisina (100 µg/ml). As placas foram incubadas a 25°C. O crescimento obtido foi repassado para o mesmo meio seletivo, para isolamento de colônias dos diplóides.

3.2.10.2 Esporulação

Após seleção adequada dos diplóides, foi preparado um inóculo do mesmo em 10 mL de meio S-SPO líquido (2,5 g de extrato de levedura; 15 g acetato de potássio; 40 mg de adenina, uracila e tirosina; 20 mg de histidina, leucina, lisina, triptofano, metionina e arginina; 100 mg de fenilalanina e 350 mg

de treonina em 1 litro de água destilada) e incubado a 25°C, sobre agitação, até a formação de ascos (10 a 15 dias).

3.2.10.3. Dissecção

Foram centrifugados momentaneamente 200 µL das culturas submetidas à esporulação. Os sobrenadantes foram removidos e as células ressuspensas em 100 µL de sorbitol 20%. As quebras das paredes dos ascos se deram com a adição (por reação) de 1,5 µL de zimoliase (10µg/µL, β-glucuronidase) e incubação da reação a 37°C por 10 min. Em seguida, foi adicionado (por reação) 1 mL de sorbitol 20% para diluir a reação de digestão. As células correspondentes as diferentes linhagens de interesse, ficaram estocadas na geladeira até a dissecção. A dissecção dos ascos foi realizada, utilizando microscópio de dissecção (MSM 400 Singer Instruments), em placa de meio YPD, que posteriormente foi incubada a 25°C até o crescimento dos haploides separadamente.

3.2.10.4. Caracterização de tétrades

As marcas de resistência para as diferentes drogas (G418 e nourseotricina) foram usadas para o correto genotipagem em meio YPD das diferentes linhagens haploides geradas por meiose. Assim, foram selecionadas por resistência as duas drogas as linhagens haploides carregadoras das duplas mutações de interesse como seguem: *hyp2-3/Δubp3*, *hyp2-3/Δbre5* e *hyp2-3/Δfen2*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Efeitos de GC7 em *S. cerevisiae* e rastreamento quimio-genético

Inicialmente, para realização do rastreamento quimio-genético com GC7 utilizando *S. cerevisiae*, foi decidida a concentração a ser utilizada no meio de cultura. A concentração usual de GC7 em cultura de células de mamíferos, considerando a experiência de nosso laboratório com a linhagem de macrófago de camundongo RAW264.7, tem sido de, no máximo, 100-150 μM . Até estas concentrações, observamos efeitos biológicos como inibição da proliferação celular e redução importante da hipusinação e mais de 80% de viabilidade celular em RAW264.7 (ALMEIDA JUNIOR et al., 2014). Apesar de existir um artigo na literatura descrevendo a redução de hipusinação em *S. cerevisiae* com 50 μM de GC7 (após 20 h de incubação), nenhum resultado foi mostrado sobre o crescimento celular (GENTZ; BLATCH; DORRINGTON, 2009). No entanto, testes em *S. cerevisiae* em nosso laboratório não demonstraram diferença de crescimento detectável a menos de 1 mM de GC7 (dados não mostrados). Como pode ser visto na Figura 6 (painéis A, B e F) a concentração de 1 mM de GC7 induz uma redução de crescimento na linhagem selvagem, afeta significativamente o crescimento de um mutante de *elf5A* (*hyp2-3*) e gera uma inibição clara da hipusinação *in vivo*. Desta forma, decidimos conduzir o rastreamento quimio-genético com a coleção de nocautes de *S. cerevisiae* com 1 mM de GC7. Juntamente com 1 mM de GC7. Curiosamente, o nocaute da enzima da segunda etapa da via da hipusinação ($\Delta lia1$), desoxi-hipusina hidroxilase, apresentou muito pouco ou praticamente nenhum fenótipo de crescimento na presença de GC7 2 mM (Figura 6C). No entanto, mais surpreendente foi o resultado obtido com um mutante da enzima da primeira etapa da via (*dys1-1*), desoxi-hipusina sintase, que teve seu fenótipo de menor crescimento suprimido por GC7 2 mM (Figura 6 painéis D e E). Este mutante possui fenótipo bastante severo, pois cresce apenas a 25 °C na presença de suporte osmótico de sorbitol 1M (GALVÃO et al., 2013). Este último resultado era totalmente não esperado e pode estar envolvido com a estabilização da versão mutada da proteína Dys1 neste mutante, o qual apresenta uma grande depleção (GALVÃO et al., 2013). Dys1 forma um tetrâmero, o qual não possui todos os sítios ativos ocupados ao mesmo tempo

por eIF5A não hipusina (BOK LEE et al., 1999; HOON LEE; UM; HEE PARK, 2001), então, ocupação de 2 ou 3 sítios ativos por GC7 poderiam estabilizar a enzima mutada, enquanto o quarto sítio estaria disponível para a reação de desoxi-hipusinação. Ensaios futuros serão necessários para verificar esta hipótese.

Para garantir a maior abrangência de resultados e minimizar a ocorrência de falso-negativos, após a realização do rastreamento quimio-genético, foram realizadas duas análises diferentes dos dados (como descrito nos itens 3.2.2 de Materiais e Métodos), o que resultou em um total de 96 linhagens nocautes consideradas sensíveis (*hits* sensíveis) e 107 linhagens nocautes consideradas resistentes (*hits* resistentes) quando crescidos em meio com GC7 1 mM e comparado com o meio sem GC7 (Tabela 2). O efeito de GC7 1 mM na redução do crescimento do selvagem (*Δura10* - borda do rastreamento) pode ser visto no gráfico da Figura 7, em que as colônias mostram uma clara redução em sua mediana (valores absolutos de pixels) de tamanho.

A análise de Ontologia genética (GO) dos mutantes sensíveis ou resistentes ao GC7 foi feita utilizando a ferramenta *online Gene Ontology (GO) Term Finder*, foram buscados os enriquecimentos de termos para *Process*, *Component* e *Function*. Para os *hits* sensíveis, destacamos encontrados como enriquecidos, com *false discovery rate* (FDR) igual a zero e *p-value* menor que 0,05, os termos de GO: *amine biosynthetic process*; *carboxylic acid biosynthetic process*; e *polyamine biosynthetic process* (lista completa no Anexo IV - termFinderResult PROCESS sensíveis GC7). Não foram encontrados termos de GO enriquecidos para *Function* ou *Component* para os *hits* sensíveis. Por outro lado, para os *hits* resistentes, foram encontrados enriquecidos termos de GO para *Process* e para *Component*, sendo que também não foi encontrado enriquecimento para *Function* neste caso. Destacamos a seguir alguns termos de GO enriquecidos, com *false discovery rate* (FDR) igual ou menor que 0,01 e *p-value* menor que 0,05, para *Process*: *intracellular pH reduction*; *vacuolar acidification*; *proton-transporting V-type ATPase complex assembly* (lista completa no Anexo V - termFinderResult PROCESS resistentes GC7). E destacamos também para *Component* (com *false discovery rate* (FDR) igual ou menor que 0,01 e *p-value* menor que 0,05): *large ribosomal subunit*; *Doa10p*

ubiquitin ligase complex; vacuolar proton-transporting V-type ATPase complex
(lista completa no Anexo VI - termFinderResult COMPONENT resistentes GC7)

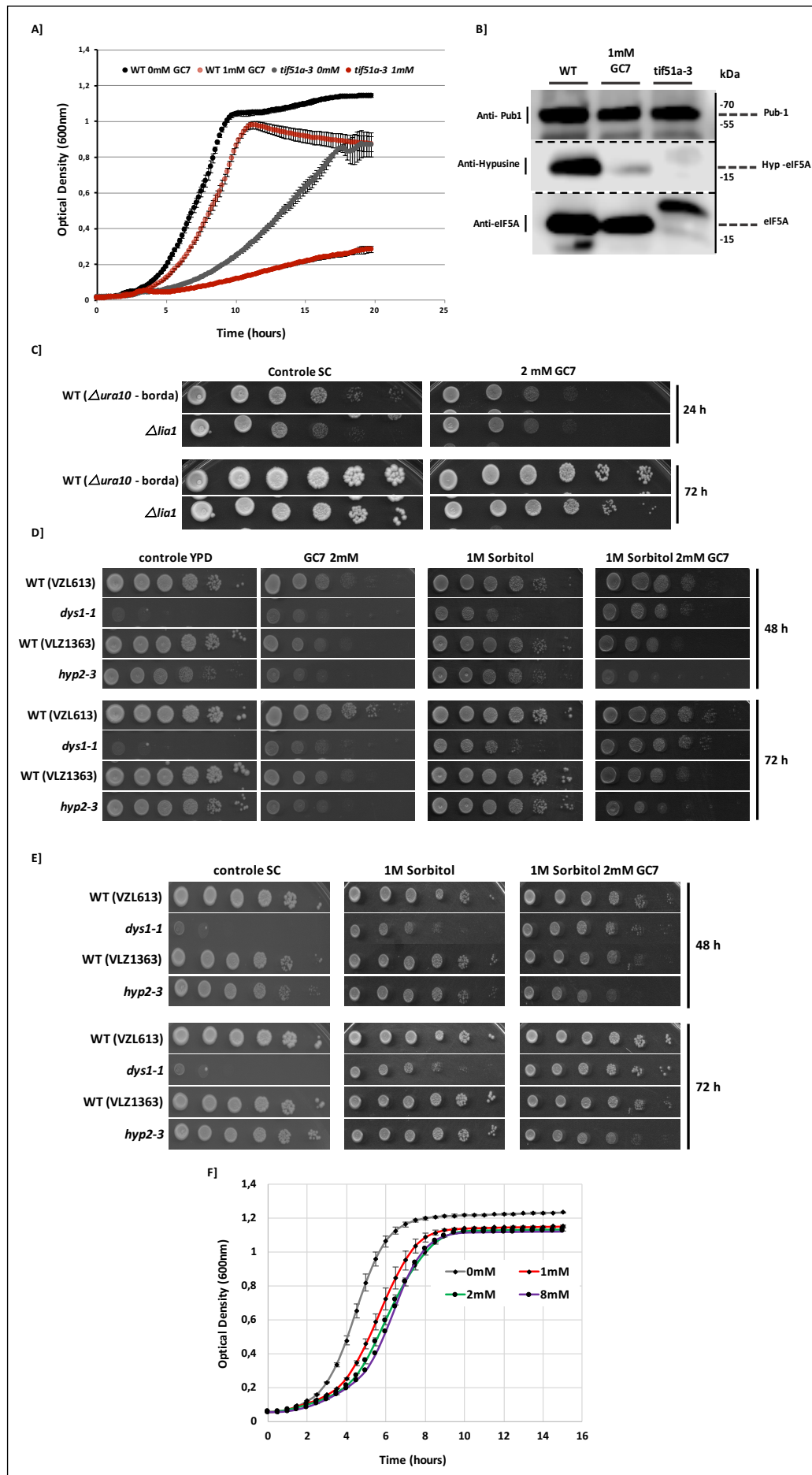


Figura 6. Efeito do GC7 no crescimento celular do selvagem (WT) e de mutantes de eIF5A (*hyp2-3*), Dys1 (*dys1-1*) e Lia1 (Δ *lia1*) e sobre a hipusinação. (A e F) As linhagens selecionadas foram diluídas em triplicata para 10^6 células/mL e crescidas na presença ou ausência do composto GC7, nas concentrações indicadas na figura, por um período de 20 (A) ou 15 (F) horas sob agitação constante. Os valores de DO_{600nm} foram registrados a cada 10 (A) ou 30 (F) min e posteriormente convertidos por *simple moving average* (SMA) para suavizar a curva. As curvas de crescimento foram representadas e os valores de cada ponto são mostrados como a *media* $\pm$ *S.E.M*, *n*= 3. (B) *Western blot* dos extratos proteicos (40 μ g) das linhagens indicadas, após 12 h de crescimento na presença ou ausência do composto GC7. Anticorpos policlonais usados: anti-eIF5A total; anti-hipusina; e anti-Pub1 (controle de carregamento). (C, D e E) As linhagens selecionadas foram diluídas de forma seriada 1:10 e transferidas para os meios de cultura sólidos indicados em diferentes tempos.

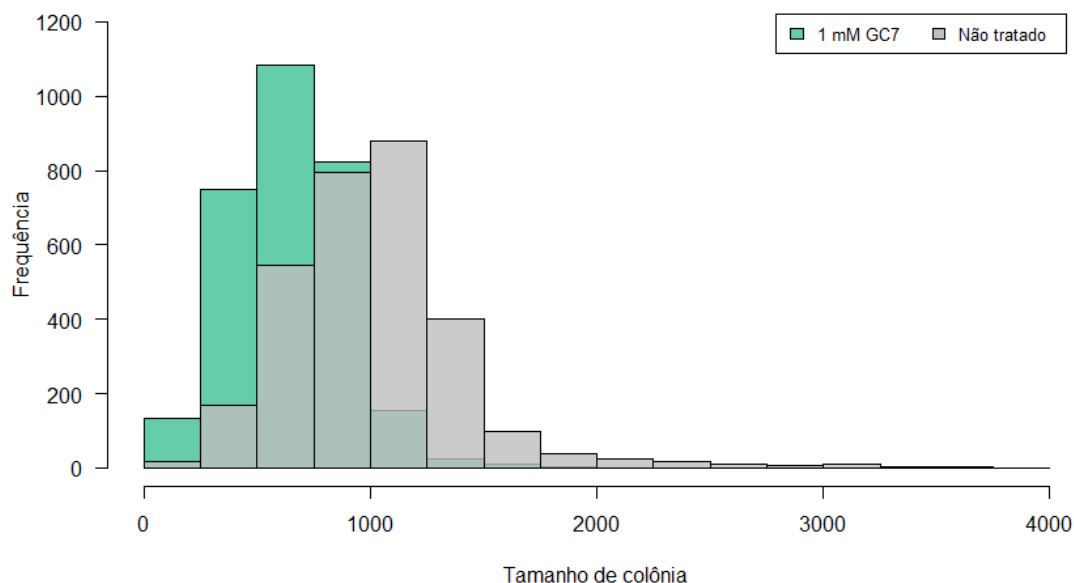


Figura 7. Efeito do GC7 1 mM no crescimento celular do selvagem utilizado como borda das placas do rastreamento quimio-genético. Os valores absolutos dos tamanhos de colônia (número absoluto de pixels) da borda selvagem (Δ *ura10*) foram considerados em função de cada colônia escaneada e sua frequência.

4.2. Predição dos efeitos de GC7 independentes de eIF5A

Quando um composto bioativo inibe uma proteína específica, o efeito biológico gerado é similar ao efeito de mutações que levam à perda de função do gene para esta proteína específica, de forma que as interações quimio-genéticas observadas apresentam um perfil de similaridade às interações genéticas observadas para mutações do gene alvo (PIOTROWSKI et al., 2017). Então, uma vez que GC7 é conhecidamente um inibidor de desoxi-hipusina sintase e demonstramos aqui que ocorre inibição de hipusinação de eIF5A por GC7 1 mM em *S. cerevisiae*, analisamos se os *hits* sensíveis e os *hits* resistentes também interagem geneticamente com mutantes dos genes de eIF5A ou de suas enzimas modificadoras.

Para tanto, utilizamos os dados de interação genética disponíveis online na ferramenta *TheCellMap* (COSTANZO et al., 2016; USAJ et al., 2017). Como pode ser visto na Figura 8, entre os genes com nocautes testados para GC7 (resultados finais de sensíveis e resistentes - Tabela 2), existem genes com interação genética negativa com a via de hipusinação e que são sensíveis a GC7, o que sugere um possível efeito indireto de GC7 via eIF5A (grupo 7). Por outro lado, existem genes cujos nocautes são afetados por GC7, mas que não apresentam interação genética com eIF5A (grupos 1-5) ou a interação genética vai no sentido contrário da relação com GC7 (grupo 6). Por fim, nem todo gene com interação com a via de hipusinação mostrou alteração do crescimento na presença de GC7 (grupos 8-10).

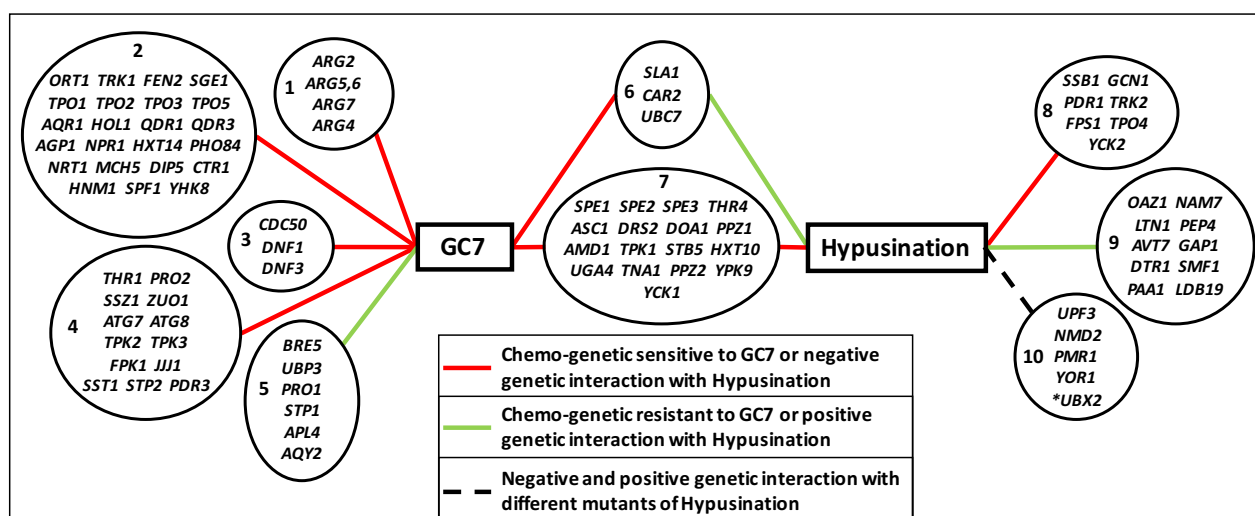


Figura 8. Interações quimio-genéticas encontradas para o composto GC7 e interações genéticas descritas para a via de hipusinação em *S. cerevisiae*. As interações quimio-genéticas para o composto GC7, assim como as interações genéticas descritas para a via de hipusinação, e os grupos de genes **1-10** contendo os diferentes grupos de genes foram construídos a partir dos fenótipos de nocautes confirmados e descritos na **Tabela 2**. **1-4** Grupo de genes cujos nocautes apresentaram sensibilidade ao composto GC7: **1-** Via de síntese de arginina; **2-** Transporte transmembrana; **3-** Atividade flipase; **4-** Outros genes verificados. O grupo **5** é composto por genes cujos nocautes apresentaram resistência ao composto GC7. **6.** Grupo de genes cujos nocautes apresentaram sensibilidade ao composto GC7 e há interação genética positiva descrita desses genes com a via de hipusinação. **7.** Grupo de genes cujos nocautes apresentaram sensibilidade ao composto GC7 e há interação genética negativa descrita com a via de hipusinação. **8.** Grupo de genes que apresentam interação genética descrita com hipusinação e em cujos nocautes o tratamento com GC7 não demonstrou efeito no crescimento. **9.** Grupo de genes que apresentam interação genética positiva com hipusinação e em cujos nocautes o tratamento com GC7 não demonstrou efeito no crescimento. **10.** Grupo de genes que apresentam interação genética negativa e positiva descrita com diferentes mutantes da hipusinação e em cujos nocautes o tratamento com GC7 não demonstrou efeito no crescimento à exceção de **UBX2* no qual o tratamento com GC7 apresentou sensibilidade. Traços vermelhos representam sensibilidade quimio-genética para o composto GC7 ou interação genética negativa com a via da hipusinação. Traços verdes representam resistência ao composto GC7 ou interação genética positiva com a via de hipusinação. Traços pretos descontínuos representam interações genéticas negativas e positivas com a via de hipusinação.

4.3. Efeito do GC7 na via de síntese de poliaminas

Foram identificados no rastreamento como sensíveis ao GC7 os nocautes das enzimas S-adenosilmetionina sintase ($\Delta spe2$) e espermidina sintase ($\Delta spe3$), ou seja, nocautes de genes diretamente responsáveis pelos níveis celulares de espermidina, análoga estrutural de GC7, e com a qual esse compete na ligação ao sítio ativo da enzima Dys1 (UMLAND et al., 2004). A enzima ornitina descarboxilase (Spe1) é a responsável pela primeira reação enzimática da via e, por isto, trata-se da enzima submetida a maior regulação de todas (MOUNCE et al., 2017). Esta regulação é feita mediante uma proteína conhecida como antizima (Oaz1), a qual interage fisicamente com Spe1, estimulando sua degradação pelo proteossomo. Após analisadas as interações

genéticas descritas entre os genes da síntese da hipusina e os genes da síntese de poliaminas (COSTANZO et al., 2016) (Figura 8), consideramos necessário verificar além destes, os mutantes do regulador de *Spe1*, $\Delta oaz1$, assim como $\Delta spe4$ (espermina sintase), abarcando assim as 4 principais enzimas na via de biossíntese de poliaminas e a principal proteína reguladora desta via em *S. cerevisiae* (Figura 9). Como pode ser visto, os mutantes $\Delta spe1$, $\Delta spe2$ e $\Delta spe3$ demonstraram clara inibição do crescimento em teste de diluição seriada e curva de crescimento. A linhagem $\Delta spe4$ apresentou uma pequena diferença apenas na curva de crescimento e a linhagem $\Delta oaz1$ não apresentou diferença na curva de crescimento e ambos não demonstraram uma clara inibição no ensaio de diluição seriada (Figura 9). Tanto os resultados encontrados nos mutantes $\Delta spe1$, $\Delta spe2$, $\Delta spe3$, quanto nos mutantes $\Delta spe4$ e $\Delta oaz1$ eram de se esperar, pois os genes *SPE1*, *SPE2* e *SPE3* apresentam interação genética negativa com *HYP2* e *DYS1*. Da mesma forma, não encontramos interação genética descrita para *SPE4* com genes da síntese de hipusina, mas encontramos que *OAZ1* apresenta interação genética positiva com *HYP2* (COSTANZO et al., 2016) (Figura 8).

Após os resultados exibidos na Figura 9, cabe questionar se o efeito do GC7 na via de síntese de poliaminas trata-se de um efeito apenas indireto do GC7 via eIF5A, ou se GC7 também interfere diretamente na via de biossíntese de poliaminas, como mostrado anteriormente em um estudo em cultura de células de mamífero, e apresentado na Introdução (LANDAU et al., 2010).

Desta forma, foram determinados os níveis de poliaminas através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e o tratamento com GC7 diminuiu os níveis intracelulares de putrescina. Os mutantes $\Delta spe1$, $\Delta spe2$ e $\Delta spe3$ e $\Delta spe4$ foram usados como controles da diminuição dos níveis intracelulares de poliaminas (Figura 10).

Além da observação em cultura de célula de mamífero (fibroblasto murino NIH3T3) e neste trabalho (Figura 10) de que GC7 é capaz de afetar os níveis de poliaminas, foram encontrados no rastreamento aqui descrito genes de vias *upstream* (*ARG2* e *ARG5,6*) à via de síntese de poliaminas (Tabela 2). Desta forma, decidimos testar se nocautes de outros genes de vias *upstream* e *downstream* à via de poliaminas também apresentavam diferença de comportamento em comparação ao selvagem frente ao GC7.

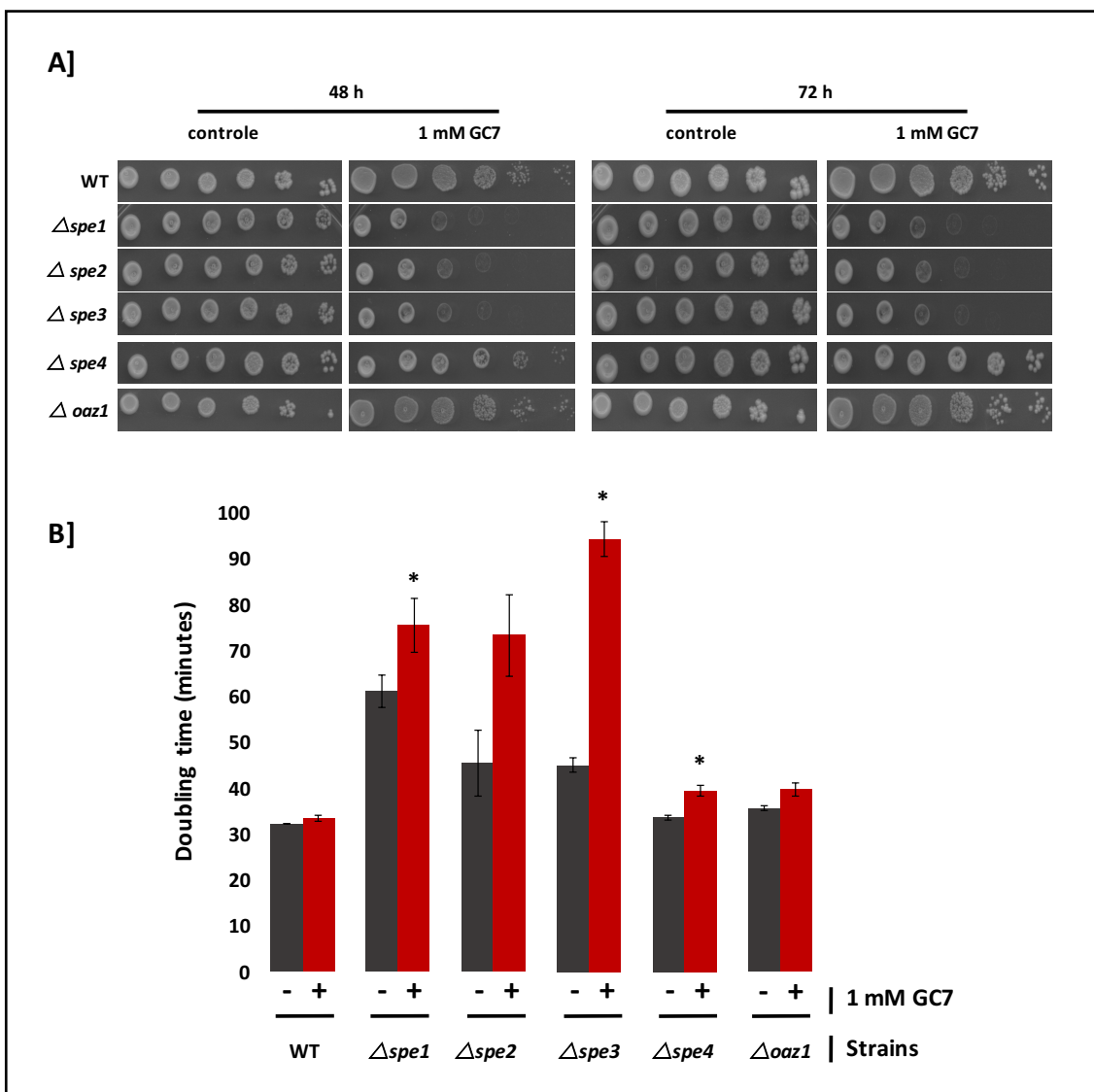


Figura 9. Efeito do GC7 no crescimento celular de mutantes da via de síntese de poliaminas. (A) As linhagens selecionadas (selvagem - WT, $\Delta spe1$, $\Delta spe2$, $\Delta spe3$, $\Delta spe4$ e $\Delta oaz1$) foram diluídas de forma seriada 1:10 e transferidas para meio SC sem e com GC7 1 mM. Os resultados mostram o crescimento a 48 e 72 h. (B) As mesmas linhagens foram diluídas em triplicata para 10^6 células/mL e crescidas por um período de 15 horas em agitação constante. Os valores de DO_{600nm} foram medidos a cada 30 min e analisados mediante o pacote *growtcurver.R*, permitindo a obtenção do parâmetro tempo de geração. Os valores são mostrados como a $media \pm S.E.M$, $n=3$, [*] $p-value < 0,05$ para *T-student test*.

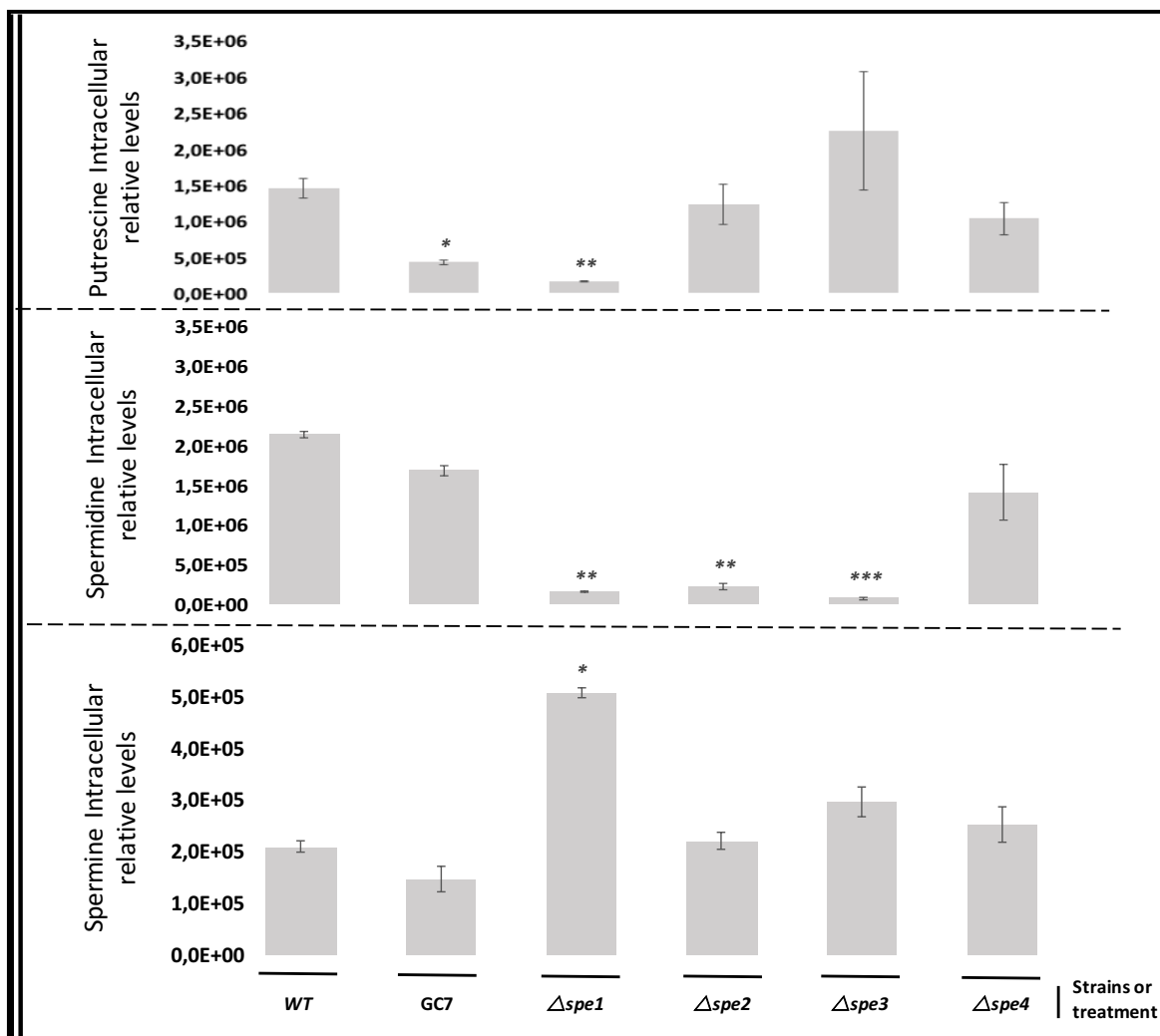


Figura 10. Quantificação relativa de poliaminas intracelulares das linhagens selecionadas e efeito do GC7 nos níveis intracelulares de poliaminas no selvagem. Níveis relativos de poliaminas para as linhagens selecionadas (selvagem (WT), selvagem+GC7 1 mM (GC7), $\Delta spe1$, $\Delta spe2$, $\Delta spe3$, $\Delta spe4$). A quantificação relativa dos níveis de poliaminas foi feita através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e posterior quantificação da área correspondente ao pico cromatográfico para cada poliamina, em cada uma das linhagens selecionadas. A quantificação dos níveis foi feita em triplicata biológica e as colunas representam $media \pm S.E.M$, $n= 3$, [*] p -value<0,05, [**] p -value<0,001, [***] p -value<0,0005 para T -student test.

Foi verificado o possível efeito do GC7 em algumas linhagens de nocautes responsáveis pela via de biossíntese de ornitina na mitocôndria e as vias de síntese e degradação de arginina no citosol, assim como linhagens nocautes de genes responsáveis pelas primeiras etapas da via de síntese de prolina, já que todas essas enzimas poderiam estar contribuindo com os níveis

de ornitina intracelulares (Figura 2). Após analisadas as interações genéticas destas vias em relação à via de hipusina, apenas existe registrado pelo SGD uma interação genética positiva (*hyp2-3 Δpaa1*) (*TheCellMap*) e negativa (*dys1* (*high throughput* com mutante não informado) *Δarg7*) (SZAPPANOS et al., 2011), portanto, o possível efeito do GC7 em mutantes para estes genes poderia ser independente de eIF5A e relacionado ao fato de GC7 diminuir os níveis de putrescina na célula (Figura 10).

Interessantemente, todos os nocautes testados da via de síntese de ornitina a partir de glutamato na mitocôndria (*Δarg2*, *Δarg5,6* e *Δarg7*) e de seu transportador para o citoplasma (*Δort1*) se mostraram sensíveis ao GC7, assim como os mutantes dos genes envolvidos com a biossíntese de arginina a partir de ornitina no citoplasma (*Δarg3* e *Δarg4*) (Figura 11). A linhagem *Δcar2* apresentou sensibilidade ao composto GC7, enquanto a diferença de crescimento de *Δcar1* não foi significativa. Uma vez que Car2 produz ornitina a partir de um derivado da via de prolina, os mutantes das primeiras etapas desta via, *Δpro1* e *Δpro2* foram testados por curva de crescimento. A linhagem *Δpro2* se mostrou sensível a GC7 e, curiosamente, a linhagem *Δpro1* se mostrou resistente (Figura 11 e Figura 16). Além de atuar na via de biossíntese de prolina, a proteína Pro1 (gama-glutamil quinase) também está envolvida com ribofagia induzida por depleção de nitrogênio, juntamente com as 2 proteínas Bre5 e Ubp3 (TATEHASHI; WATANABE; TAKAGI, 2016) cujos nocautes mostraram o mesmo fenótipo que *Δpro1* (resultados apresentados abaixo, no item 4.5). O mutante *Δfms1*, cuja enzima é a única poliamina oxidase conhecida em *S. cerevisiae*, mostrou diferença significativa na capacidade de carga (Anexo I) mas não em teste de diluição seriada em meio sólido (Figura 12).

Além destes, o nocaute de *FEN2*, gene que codifica para o transportador de pantotenato (simporter H⁺-pantotenato), se mostrou muito sensível a GC7, fenocopiando a interação genética de letalidade sintética de *Δfen2 Δspe1* e *Δfen2 Δspe2* (HARRISON et al., 2007). A via de síntese do pantotenato depende da via de poliaminas (Figura 2) e, conseqüentemente, o bloqueio da síntese de poliaminas somado ao bloqueio da obtenção de pantotenato do meio extracelular gera letalidade. Por outro lado, GC7 não afeta o crescimento das linhagens *Δecm31* e *Δpan6* (Figura 12) (que também são sinteticamente

letais com $\Delta fen2$ (HARRISON et al., 2007; OLZHAUSEN; SCHÜBBE; SCHÜLLER, 2009), pois, na presença de *FEN2*, mesmo diminuídas as quantidades de poliaminas, a célula capta pantotenato do meio externo. É importante ressaltar que $\Delta fen2$ não apresenta interação genética descrita para a via de hipusinação e que confirmamos este dado com o mutante *hyp2-3* (Figura 12B), o que reforça a ideia de ser uma ação de GC7 independente de eIF5A.

Por outro lado, para elucidar o potente efeito do GC7 na linhagem nocaute para *FEN2*, conduzimos experimentos de competição em curva de crescimento, suplementando o meio de cultura com 100 μ M de espermina ou β -alanina na presença de 100 μ M de GC7 na linhagem $\Delta fen2$. Os resultados mostraram que a suplementação de β -alanina, mas não espermina, resgatou o fenótipo de letalidade apresentado por $\Delta fen2$ na presença do GC7, demonstrando o efeito *off-target* do composto GC7 na biossíntese de β -alanina e pantotenato, vias *downstream* da biossíntese de poliaminas (dados não mostrados).

Todos estes resultados reforçam a importância do efeito celular de GC7 na biossíntese de poliaminas.

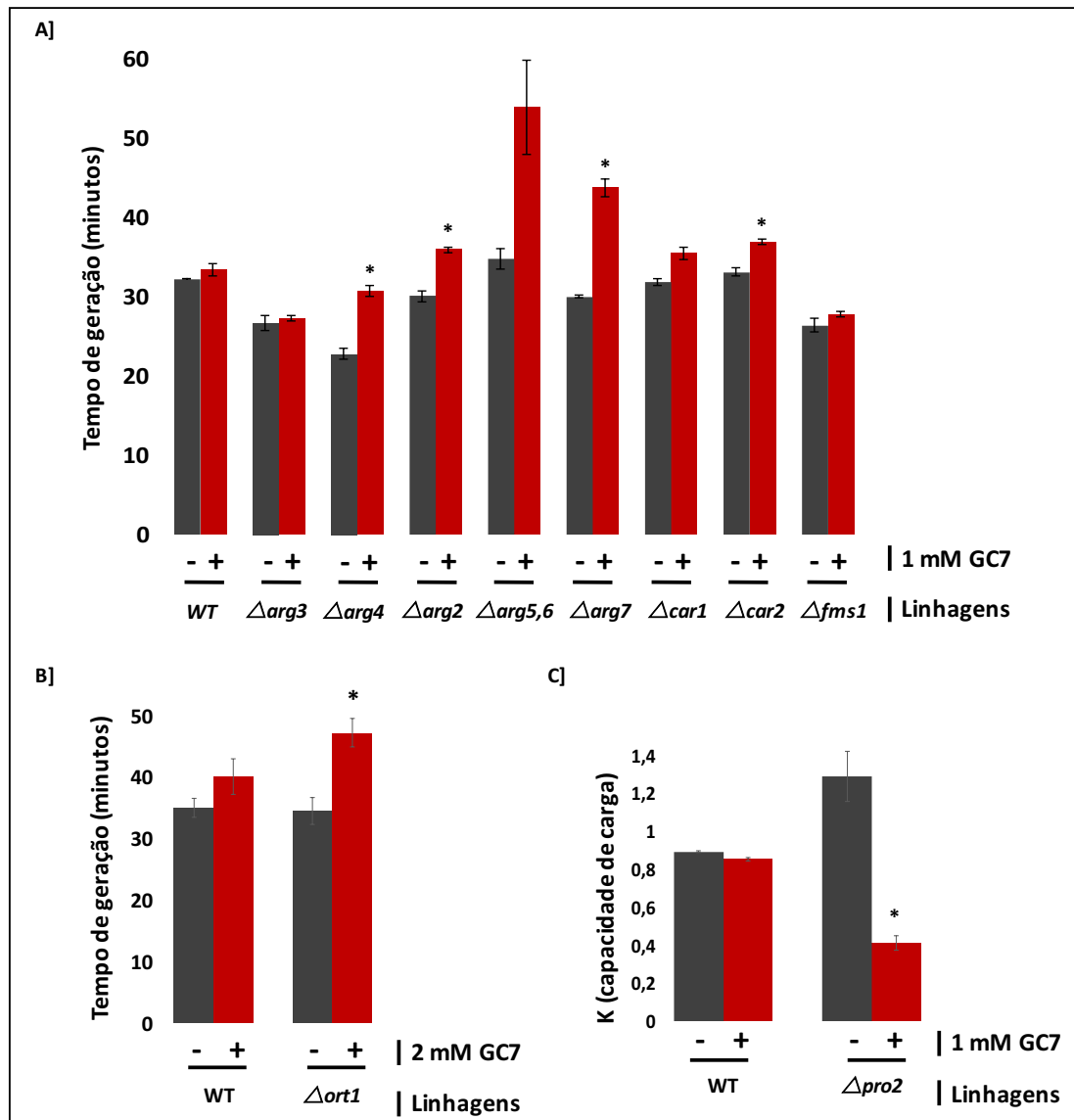


Figura 11. Efeito do GC7 no crescimento celular de nocautes de mutantes *downstream* e *upstream* da via de síntese de poliaminas. A e B): As linhagens selecionadas foram diluídas em triplicata para $1-2 \times 10^6$ células/mL e crescidas por um período de 15 horas sem e com GC7 em agitação constante. Os valores de DO_{600nm} foram registrados a cada 30 minutos e analisados mediante o pacote *growtcurver.R* permitindo a obtenção dos parâmetros *K* e *tempo de geração*. Os valores de *K* e *tempo de geração* são mostrados como a *media* $\pm$ *S.E.M*, $n = 3$, [*] $p\text{-value} < 0,05$ para *T-student test*.

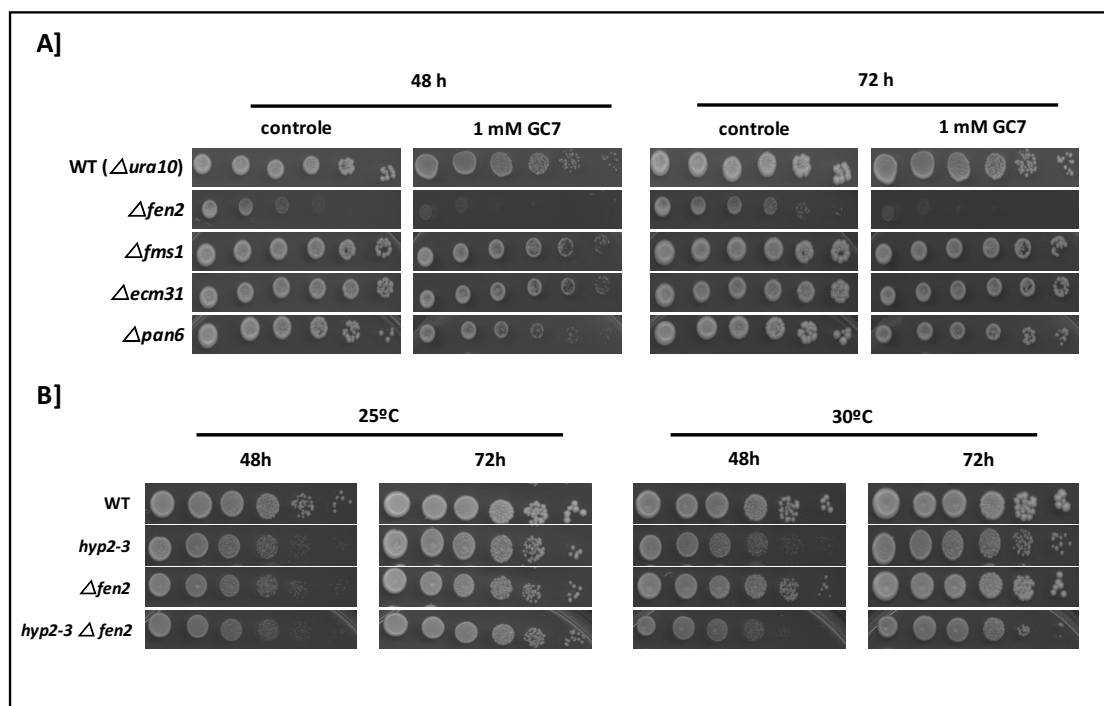


Figura 12. Efeito do GC7 no crescimento celular de nocautes de mutantes relacionados à biossíntese e transporte de pantotenato. As linhagens selecionadas foram diluídas de forma seriada 1:10 e transferidas para os meios de cultura SC (A) ou YPD (B) sem e com 1 mM de GC7. (A) A temperatura do crescimento foi 30°C. Os resultados mostram o crescimento no tempo indicado.

4.4. Efeito do GC7 sobre mutantes de transporte transmembrana

No intuito de realizar uma análise o mais completa possível a respeito do transporte de GC7 entre os compartimentos celulares e extracelular, além dos dados do rastreamento quimio-genético, foram selecionadas linhagens contendo nocautes para vários transportadores conhecidos.

Entre os resultados obtidos no rastreamento e confirmados por curva de crescimento, está o de sensibilidade a GC7 mostrada pela linhagens $\Delta trk1$ (Figura 13). A proteína Trk1, junto com seu parálogo Trk2, e as proteínas reguladoras Ppz1 e Ppz2, abarcam o maior complexo de transporte de K^+ (potássio iônico) de alta afinidade em *S. cerevisiae* (RUIZ et al., 2004). Em primeiro lugar, foram verificadas as interações genéticas descritas entre os genes para eIF5A (*HYP2*) e síntese de hipusina (*DYS1* e *LIA1*) e os genes *TRK1*, *TRK2*, *PPZ1* e *PPZ2*. Foram descritas interações genéticas sintéticas negativas entre: *hyp2-2* e *trk2*; *hyp2-ts* e *ppz1*; *hyp2-3* e *ppz2*; *hyp2-ts* e *ppz2* (TheCellMap - <http://thecellmap.org/>, Figura 8). Além disso, o nocaute de *TRK1*

leva a uma sensibilidade a espermina, higromicina B e tetrametilamônio, moléculas não relacionadas estruturalmente, mas todas catiônicas (BARRETO et al., 2011). Desta forma, a sensibilidade destes nocautes poderia ser explicada pela interação indireta via eIF5A ou devido a uma hiperpolarização celular, o que poderia levar a uma maior entrada de GC7 na célula.

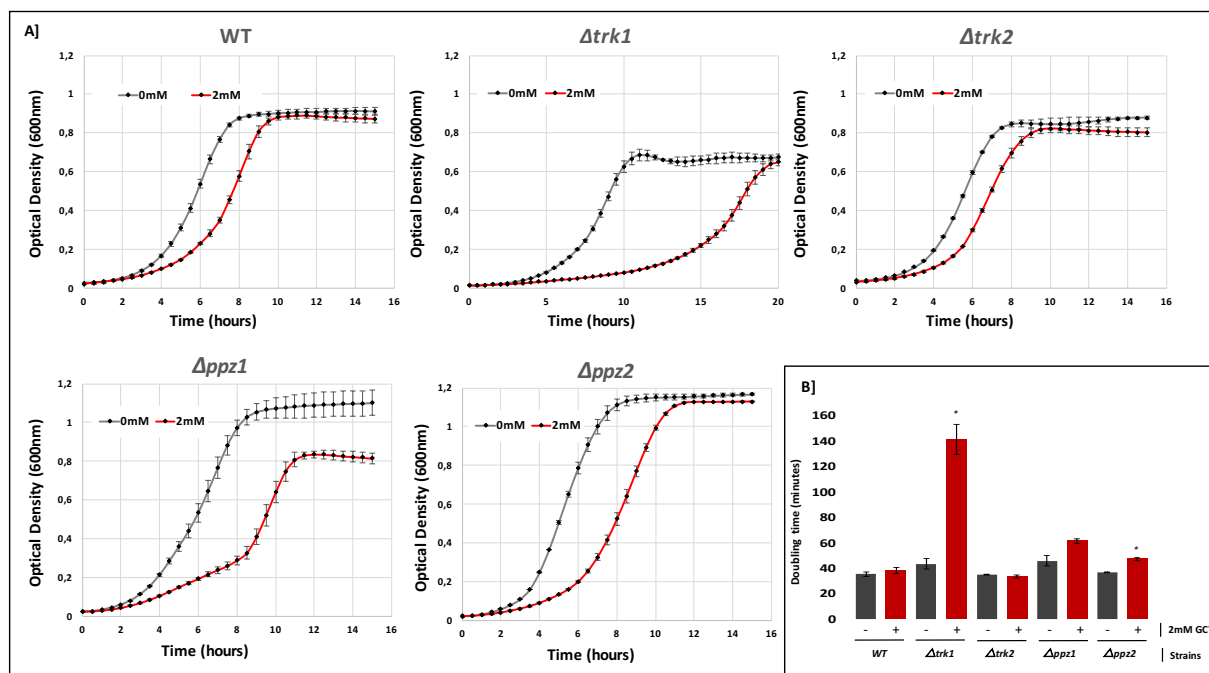


Figura 13. Efeito do GC7 no crescimento celular das linhagens relacionadas a Trk1.

(A) As linhagens selecionadas foram diluídas em triplicata para 10^6 células/mL e crescidas na presença ou ausência de 2 mM de GC7 por um período de 15 h (a exceção de $\Delta trk1$) em agitação constante. Os valores de DO_{600nm} foram registrados a cada 30 min e posteriormente convertidos por *simple moving average* (SMA) para suavizar a curva. (B) Os valores de DO_{600nm} foram medidos a cada 30 min e analisados mediante o pacote *growthcurver.R*, permitindo a obtenção do parâmetro *tempo de geração*. Os valores são mostrados como a *media* $\pm$ *S.E.M.*, $n = 3$, [*] p -value < 0,05 para *T-student* test.

É importante ressaltar que encontramos como sensíveis ao GC7 a maior parte (8/12) das linhagens nocautes cujos genes são constituintes da família de transportadores multidrogas/multixenobióticos DHA1, formada por um total de 12 genes (DIAS et al., 2010). Os mutantes $\Delta aqr1$, $\Delta qdr1$, $\Delta qdr3$, $\Delta yhk8$ e $\Delta hol1$ apresentaram sensibilidade ao GC7, assim como as linhagens nocautes para os genes *TPO1-TPO3*. Os transportadores TPO (Transporter of POLyamines) (IGARASHI; KASHIWAGI, 2010) e Qdr3 (TEIXEIRA et al., 2010) são,

responsáveis pela excreção de poliaminas intracelulares. Desta forma a sensibilidade exibida pelas linhagens $\Delta tpo1$ (apenas em YPD), $\Delta tpo2$, $\Delta tpo3$ e $\Delta qdr3$ ao GC7 sugere que ele também seja um substrato para esses transportadores, provavelmente por sua similaridade estrutural (Figura 14). Além destes, um nocaute $\Delta sge1$, gene membro da família DAG (subfamília DHA2), relacionado de forma distante à família DHA1, também mostrou sensibilidade a GC7. As famílias DHA1 e DAG compreendem transportadores do tipo *drug:H⁺ antiporters*. Por outro lado, transportadores MDR (*multidrug resistance*) do tipo *Plasma membrane ATP-binding cassette (ABC)*, como *PDR5*, *PDR10*, *YOR1* e *SNQ2*, não tiveram seus nocautes sensíveis a GC7 (dados não mostrados). Por fim, destacamos que apenas o nocaute de *STB5*, o fator de transcrição que controla genes relacionados a MDR, foi sensível a GC7, enquanto outros nocautes relacionados (DOS SANTOS et al., 2014; NISHIDA-AOKI et al., 2015) como *PDR1*, *PDR3* (parálogo de *PDR1*), *PDR8*, *YRR1* (parálogo de *PDR8*), *CAD1*, *YAP1* (parálogo de *CAD1*), *YRM1*, *RDR1* e *RPN4* não apareceram no rastreamento ou foram confirmados como não sensíveis ao GC7 (*PDR1*, *PDR3* e *YAP1*) (resultados não mostrados). Além disso, linhagens com nocautes em vários genes de transportadores de efluxo e *PDR1* e/ou *PDR3* também não apresentaram grande diferença de crescimento nos meios sem e com GC7 (Figura 15). Curiosamente, na Figura 15, o selvagem US50-18C se mostrou muito mais sensível ao GC7 que o selvagem da coleção de nocautes (*Aura10*). No entanto, esta não é uma linhagem comumente utilizada pela comunidade científica e o *background* genético desta linhagem (cruzamento de DRI9-T8 e 2229-5C) não está determinado. O resultado das linhagens US50-18C, AD1-7 e AD1-9 (ROGERS et al., 2001) não era esperado, uma vez que grande parte das drogas testadas em *S. cerevisiae* sofrem ação destes genes (PIOTROWSKI et al., 2017). Ainda, existe interação genética sintética negativa de *hyp2-ts Δstb5* e *hyp2-3 Δstb5*, o que pode significar um efeito de GC7 dependente de eIF5A (*TheCellMap*, Figura 8).

Além de transportadores de efluxo citoplasmático da membrana celular, nocautes para dois genes de transportadores de poliaminas para compartimentos intracelulares foram identificados como sensíveis a GC7: *Δuga4* e *Δtpo5*. *Uga4* é um transportador de putrescina, envolvido na sua degradação mediante transporte do citoplasma para o vacúolo e *Tpo5* é um

transportador de putrescina e espermidina, presente em vesículas *post-Golgi* (Figura 14). A sensibilidade destes nocautes, assim como daqueles logo acima, sugere que GC7 seja um substrato destes transportadores. No caso de Uga4 também existe um confundidor que é a interação genética sintética negativa de *hyp2-3 Δuga4* (*TheCellMap*, Figura 8).

Outro transportador possivelmente envolvido com a desintoxicação celular por GC7 pode ser Ypk9, pois o nocaute de seu gene também mostrou sensibilidade a GC7 (Figura 14). Ypk9 é uma proteína transmembrana vacuolar predita como uma ATPase de transporte do tipo P, no entanto, sem substrato conhecido e o nocaute do seu gene apresenta sensibilidade a vários íons de metais, principalmente de metais pesados (GITLER et al., 2009; SCHMIDT et al., 2009).

Interessantemente os nocautes *Δstp1* e *Δstp2* apresentaram, respectivamente, resistência e sensibilidade ao GC7 (Figura 14). Esses genes são parálogos e codificam fatores de transcrição citoplasmáticos, que em resposta ao processamento proteolítico do complexo sensor de aminoácidos externos (Ssy1p-Ptr3p-Ssy5p), se dirigem ao núcleo, onde ativam a transcrição de vários genes relacionados ao transporte de aminoácidos. No entanto, a redundância funcional de Stp1 e Stp2 é parcial e enquanto ambos ativam a transcrição de *BAP2* e *BAP3* (genes para permeases de alta afinidade para leucina) e *MUP1* (gene para permease de alta afinidade para metionina), Stp1 e Stp2 possuem efeitos diferentes na indução de *AGP1* (permease de baixa afinidade para diferentes amino ácidos). Além disso, a transcrição de *DIP5* (gene para permease de alta afinidade para amino ácidos dicarboxílicos) é dependente apenas de Stp2 e a de *TAT1* (gene para permease de valina, leucina, isoleucina, tyrosine, triptofano e histidina), apenas de Stp1. Curiosamente, apenas Stp1, mas não Stp2, regula positivamente a transcrição de *TPO1* sob indução com ácido benzoico (ZHANG et al., 2018; ABDEL-SATER et al., 2004; PENNACCHIETTI et al., 2009; TUMUSIIME et al., 2011; TANAKA; MUKAI, 2015). Uma vez que *Δagp1* e *Δtpo1* se mostraram sensíveis a GC7, é possível que a relação de Stp1 e Stp2 com GC7 seja via estes transportadores. O fato de *Δstp1* e *Δstp2* terem resultado em fenótipos opostos quanto a GC7 pode ser devido à complexa relação que existe entre esses dois genes. Outros fatores que também atuam nesta via, Ssy1, Ssy5 e Ptr3,

upstream a Stp1 e Stp2 (ZHANG et al., 2018), não puderam ser testados, pois codificam genes essenciais e não dispomos de mutantes condicionais destes genes.

Ainda relacionado a transportadores de amino ácidos, o nocaute *Δnpr1* foi identificado como sensível a GC7. Npr1 é uma proteína quinase que participa da via de TORC1, exercendo uma regulação positiva em permeases de amino ácidos na membrana plasmática, como Gap1 (permease de amino ácidos, ornitina, citrulina, putrescina e espermidina), Tat2 (permease de alta afinidade para triptofano e tirosina), Can1 (permease para arginina), Lyp1 (permease para lisina) e da permease para uracila Fur4 (SCHMIDT et al., 1998; DE CRAENE; SOETENS; ANDRÉ, 2001; MACGURN et al., 2011). Desta forma, é possível que o fenótipo de sensibilidade de *Δnpr1* esteja relacionado a uma menor presença de transportadores permeases na membrana plasmática.

Um resultado que está de acordo com o de *Δnpr1* é descrito a seguir. Apesar de *Δcan1* e *Δlyp1* separadamente não mostrarem sensibilidade a GC7, se compararmos os selvagens VZL613 e VZL1363 (Figura 6 - 72 h), os quais são ambos do *background* genético S288C, percebemos uma diferença significativa de crescimento em GC7, que pode ser atribuída ao fato de VZL1363 possuir genótipo *Δcan1 Δlyp1*.

Outros genes de transportadores de nutrientes foram identificados como tendo seus nocautes sensíveis a GC7: *HNM1* (permease para colina, etanolamina e carnitina - correlacionados estruturalmente); e *MCH5* (permase para riboflavina - vitamina B2 - necessária para processos dependentes de FAD). Para este genes não existem interações genéticas com eIF5A ou hipusinação.

Além *Δnpr1*, nocautes de outros genes relacionados a endocitose ou tráfego intracelular de vesículas também se mostraram como sensíveis (*Δcdc50* e *Δsla1*) ou resistente (*Δapl4*) a GC7 (Figura 14). Cdc50 é uma proteína endossomal que está relacionada com a função de flipase de fosfolipídeos de Drs2 e seus mutantes apresentam defeitos de polaridade celular e crescimento polarizado, portanto, afeta o ciclo celular (MISU et al., 2003; SAITO, 2004). Sla1 é uma proteína envolvida com endocitose através da regulação de formação de citoesqueleto de actina cortical (*actin cortical patches*) (HOWARD et al., 2002; WARREN et al 2002). Apl4 é o componente

gama-adaptina da subunidade maior associada a clatrina (AP-1), a qual se liga diretamente à clatrina e está envolvida no transporte vesicular de endocitose (PANEK et al., 1997). É interessante ressaltar que Cdc50 tem uma função na ativação de Drs2, que é essencial para a curvatura da membrana e formação de vesículas envoltas de clatrina a partir do endossomo primário para o *trans*-Golgi (SAKANE; YAMAMOTO; TANAKA, 2006). Por outro lado, Sla1, assim como Apl4, também interage fisicamente com clatrina e é essencial para localização e concentração de clatrina nos locais de endocitose (MA et al., 2009). Finalmente, é proposto que Npr1 atue de forma dependente de AP-1 (Apl2+Apl4) para promover o tráfego de Gap1 de endossomos para o *trans*-Golgi, o que resultaria em maiores níveis de Gap1 por conta de evitar a ida para a degradação no vacúolo (O'DONNELL et al., 2010). Entre estes, apenas $\Delta sla1 hyp2-3$ resulta em uma interação genética positiva, que seria o resultado oposto ao visto para sensibilidade de $\Delta sla1$ a GC7, portanto, não deve estar relacionado a eIF5A.

Por fim, podemos concluir que foram identificados apenas possíveis transportadores para o exterior da célula que podem ter GC7 como substrato, como Tpo1, Tpo2, Tpo3, Aqr1, Qdr1, Qdr3, Yhk8 e Hol1, ou para fora do citoplasma, como Tpo5, Uga4 e Ypk9. Nenhum transportador de nutriente foi identificado como resistente a GC7, de forma que seu transportador para dentro da célula continua não identificado.

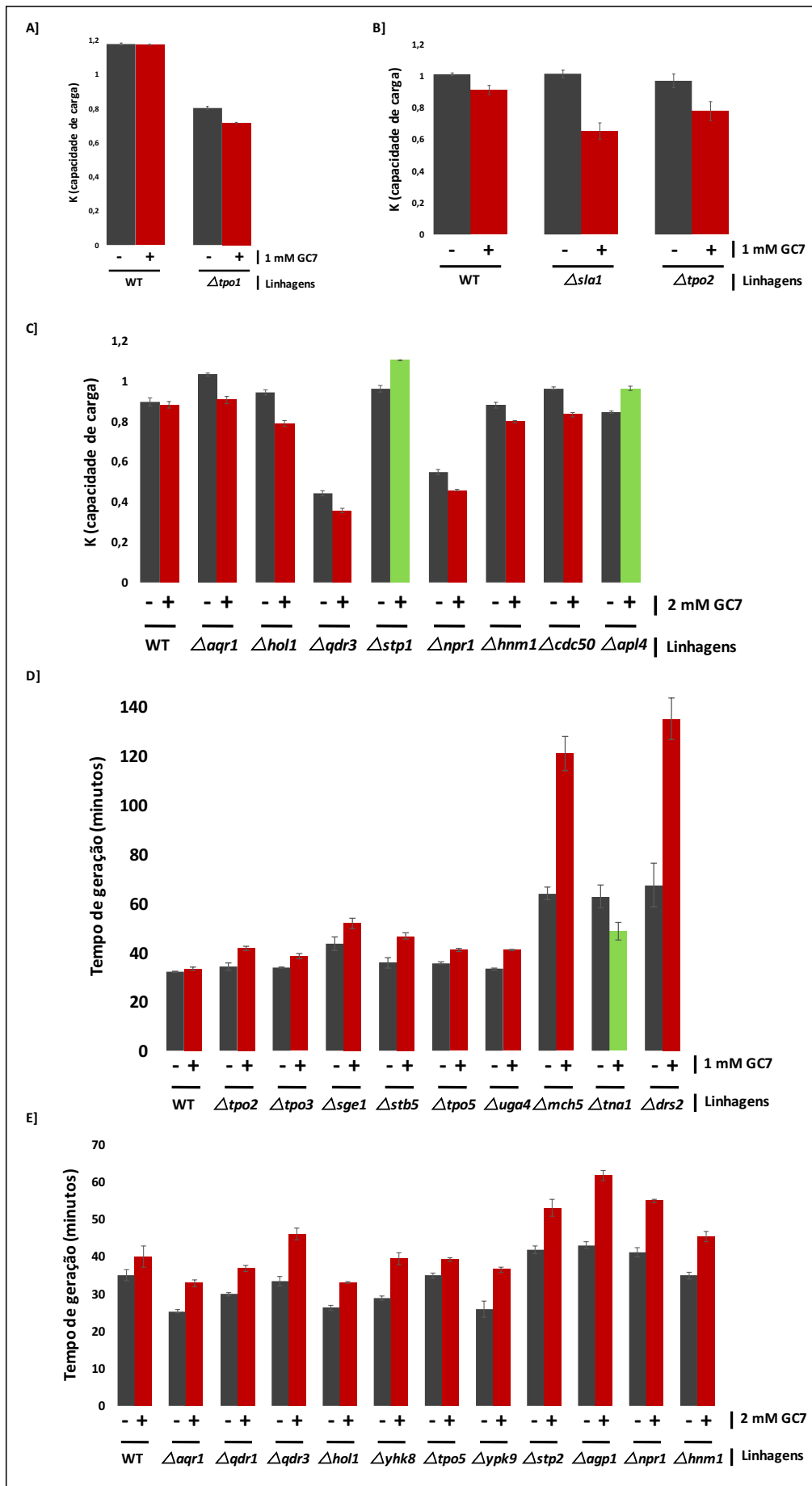


Figura 14. Efeito do GC7 no crescimento celular de linhagens relacionadas a transporte transmembrana. As linhagens selecionadas foram diluídas em triplicata para $1-2 \times 10^6$ células/mL e crescidas na presença ou ausência de GC7 (1-2 mM) por um período de 12 ou 15 horas sob agitação constante. Os valores de DO_{600nm} foram registrados a cada 10 ou 30 minutos e analisados mediante o pacote *growtcurver.R* permitindo a obtenção dos parâmetros *K* e *tempo de geração*, os quais são mostrados como a *media* $\pm$ *S.E.M*, *n*= 3. Todas as linhagens mostradas, à exceção do WT, apresentaram um *p-value*<0,05 quando realizada a prova *T-student*. A temperatura do ensaio foi de 30°C e o meio de cultura utilizado SC, exceto de (A), que foi realizado em YPD.

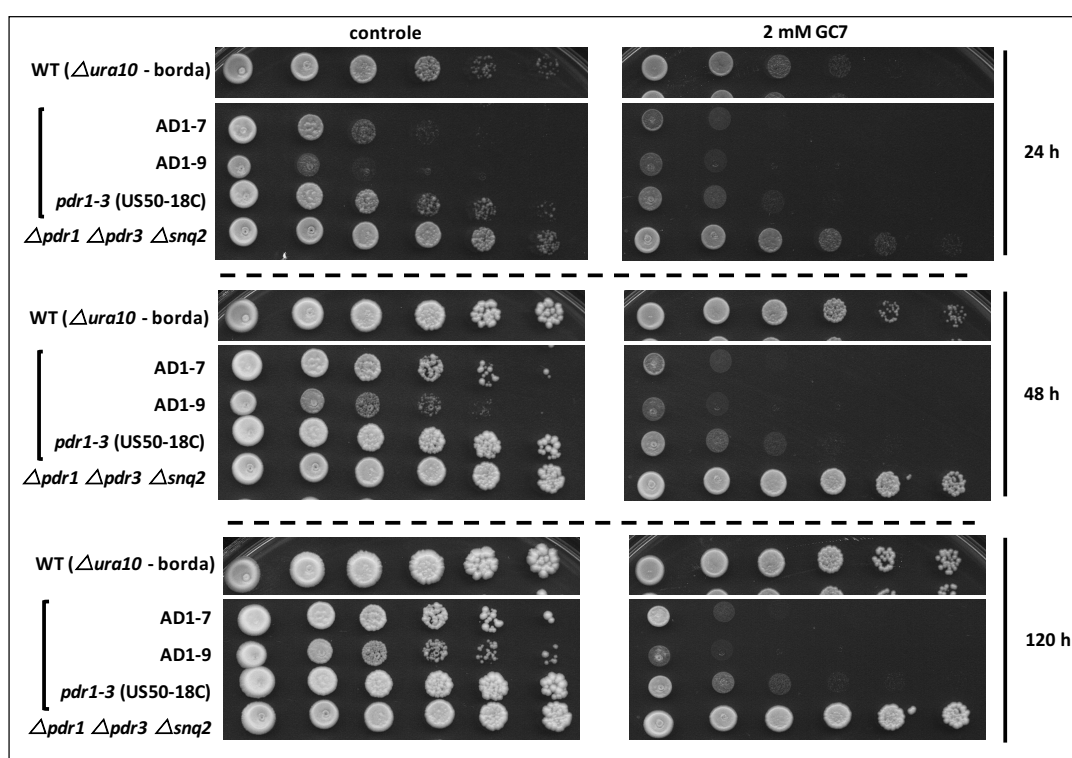


Figura 15. Efeito do GC7 no crescimento celular das linhagens relacionadas a transportadores MDR (*multidrug resistance*) do tipo *Plasma membrane ATP-binding cassette (ABC)*. As linhagens selecionadas foram diluídas de forma seriada 1:10 e transferidas para o meio de cultura SC sem e com 2 mM de GC7. A temperatura do crescimento foi de 30°C. Os resultados mostram o crescimento no tempo indicado.

4.5. Efeito de GC7 em autofagia

Os nocautes *Δbre5* e *Δubp3* encontrados no rastreamento como resistentes ao GC7 formam parte de um complexo desubiquitinase envolvido em vários processos celulares como: reparo do DNA a partir de junções de extremidades não homólogas (NHEJ), em que a ausência dos genes do complexo diminui o reparo do DNA (BILSLAND et al., 2007); mitofagia (tipo de autofagia celular seletiva), na qual os mutantes nulos para o complexo se apresentaram como reguladores negativos de mitofagia (MÜLLER et al., 2015) e ribofagia, que se trata de outro tipo de autofagia celular seletiva, na qual os ribossomos são reciclados ou degradados mediante autofagia seletiva, e a presença do complexo Ubp3-Bre5 torna-se essencial para a correta liberação da proteína Rpl25 no vacúolo (KRAFT et al., 2008; OSSAREH-NAZARI et al., 2014). Desta forma, após a resistência exibida pela linhagem *Δbre5* no rastreamento em larga escala, testamos o efeito do composto GC7 nos nocautes constituintes do outro membro do complexo: Ubp3. Além do complexo Ubp3-Bre5, a proteína Pro1 também foi demonstrada recentemente como outro fator envolvido na autofagia seletiva de ribossomos (TATEHASHI; WATANABE; TAKAGI, 2016), e, desta forma, também testamos *Δpro1* frente a GC7. Assim, encontramos que os nocautes de *Δubp3* e *Δpro1* também demonstram resistência ao composto GC7 (Figura 16). Nota-se que o fenótipo mostrado pelas linhagens mutantes para o complexo Ubp3-Bre5 e Pro1 não se trata apenas de um fenótipo de resistência e sim, de aumento no crescimento celular na presença do GC7 em comparação com a ausência (Figura 16).

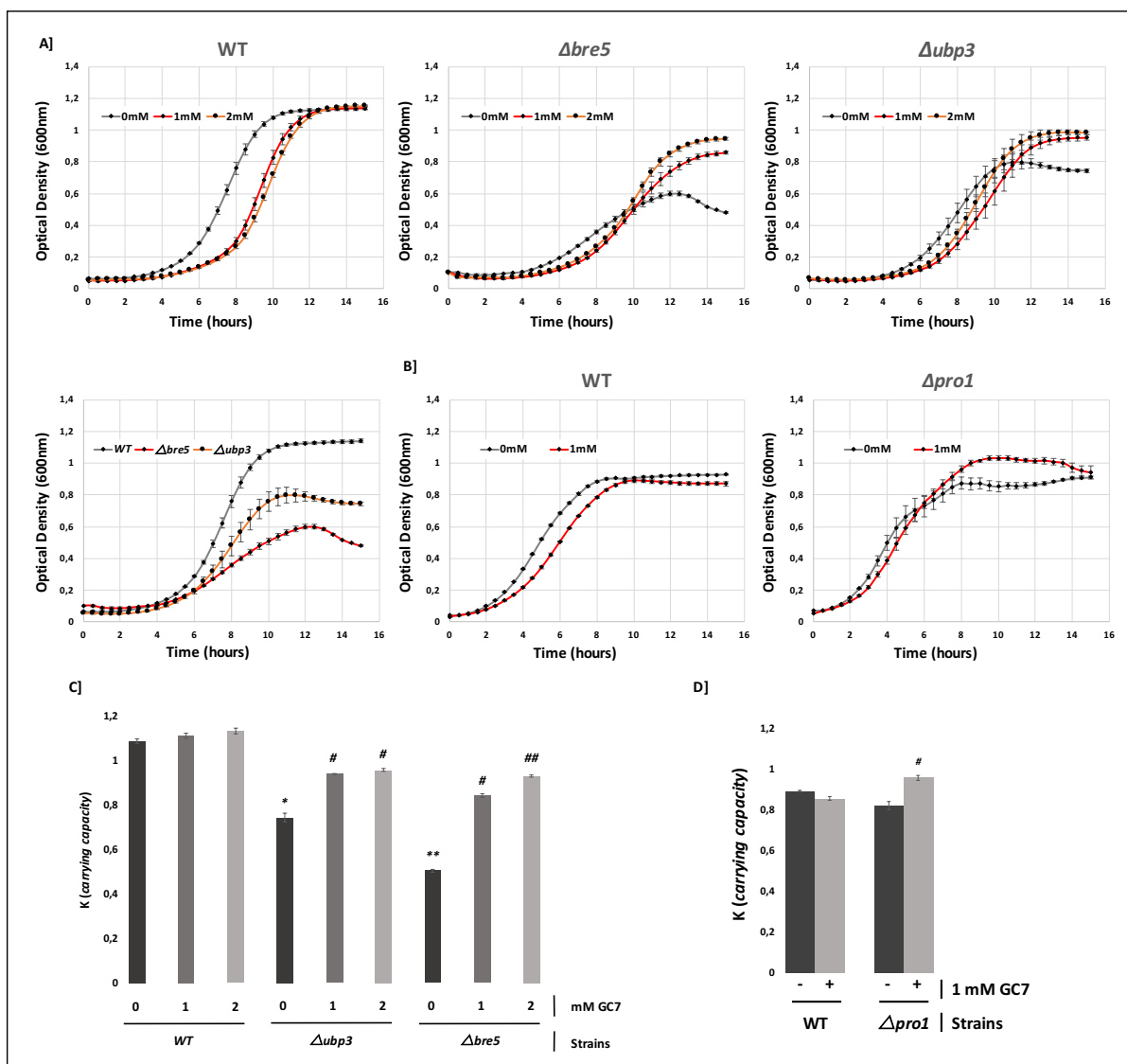


Figura 16. Efeito do GC7 no crescimento celular das linhagens relacionadas a ribofagia.

(A e B) As linhagens selecionadas foram diluídas em triplicata para 10^6 células/mL e crescidas na presença ou ausência de de GC7 nas concentrações indicadas por um período de 15 horas em agitação constante. Os valores de DO_{600nm} foram registrados a cada 30 min e posteriormente sometidos para *simple moving average* (SMA) para suavizar a curva. (C e D) Os valores de K (capacidade de carga) foram calculados e analisados mediante o pacote *growthcurver.R* e são mostrados como a *media* $\pm$ *S.E.M*, $n = 3$, [*] $p\text{-value} < 0,05$, [**] $p\text{-value} < 0,001$ para *T-student* test (efeito da mutação) e [#] $p\text{-value} < 0,001$, [##] $p\text{-value} < 0,0001$ para *T-student* quando medido o efeito do tratamento.

Em relação ao efeito do GC7 em macroautofagia ou autofagia não específica, encontramos controvérsia na literatura, pois um estudo em cultura de células de mamífero (linhagem 2FTGH de fibrossarcoma humano) mostrou

aumento da autofagia basal (macroautofagia) após tratamento com GC7 e esse efeito não foi reproduzido pela depleção de eIF5A-1 por siRNA (OLIVERIO et al., 2014). No entanto, outro estudo em *Drosophila melanogaster* demonstrou que o mutante da segunda etapa de hipusinação (hidroxilação da desoxi-hipusina) *nero* (Lia1 em *S. cerevisiae*) apresentou um incremento na autofagia basal e, neste caso, *knockdown* de eIF5A por siRNA gerou um efeito similar (PATEL et al., 2009).

Desta forma, para obter uma primeira aproximação do efeito do GC7 e contrastar os resultados controversos apresentados nos diferentes trabalhos, avaliamos o efeito do GC7 em macroautofagia por ensaios de Pho8ΔN60 e GFP-Atg8 (experimentos realizados em colaboração com o Dr. Agustín Hernandez Lopez). O ensaio de Pho8ΔN60 permite avaliar a liberação de vesículas de conteúdo citoplasmático no vacúolo, pois a atividade fosfatase alcalina (ALP) da enzima Pho8Δ60 apenas é ativada no vacúolo. Assim, a atividade ALP é diretamente proporcional à transferência de Pho8Δ60 do citoplasma para o vacúolo, a qual somente acontece via macroautofagia (KAINZ et al., 2017). Após geração das linhagens de interesse contendo a deleção cromossomal *pho8ΔN60*, encontramos que o tratamento com GC7 a 1 mM incrementa significativamente a atividade enzimática de ALP em comparação com o não tratado (Figura 17B), provando que o tratamento com GC7 aumenta autofagia não específica em *S. cerevisiae* e sugerindo ser independente de eIF5A, pois os mutantes de eIF5A (*hyp2-3*) e de desoxi-hipusina hidroxilase (*Δlia1*), apesar de mostrarem um pequeno incremento na atividade ALP, este não é significativo (Figura 17, painéis C e D). Desta forma nos perguntamos se o incremento do composto GC7 na atividade ALP, ou seja, se o aumento da liberação vesicular não específica no vacúolo poderia estar relacionado com a degradação intracelular do composto GC7.

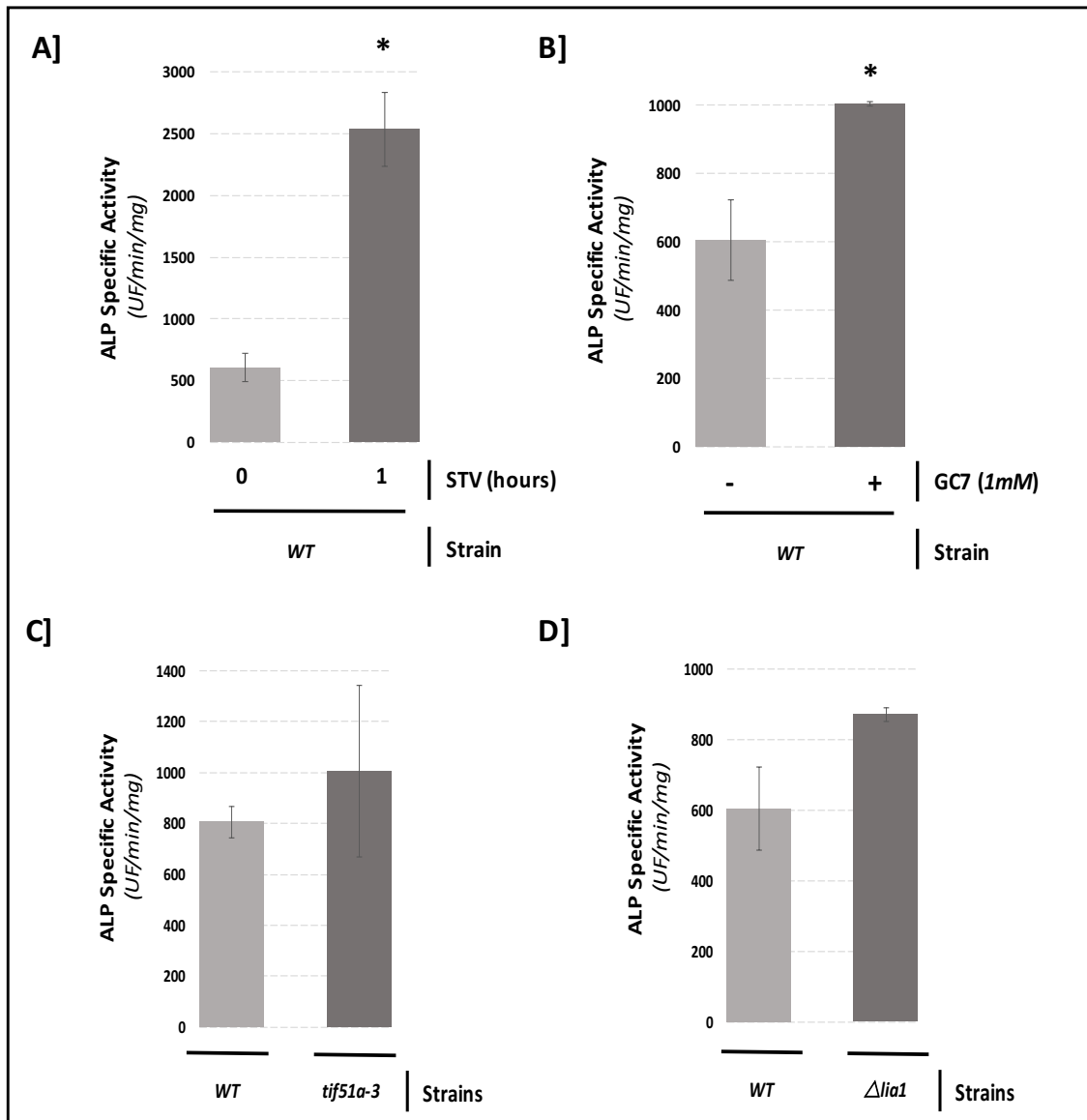


Figura 17. Efeito do GC7 1 mM na macroautofagia através da atividade enzimática fosfatase alcalina (ALP) de *Pho8ΔN60*. As figuras A, B, C e D representam a atividade enzimática específica ALP da enzima *Pho8ΔN60* em unidades de fluorescência relativas normalizadas pela massa de proteína (mg) e o tempo de reação (30 min). As colunas representam a *media* $\pm$ *S.E.M*, *n*= 2. [*] *p-value*<0,05 para a prova estatística *T-student* nas diferentes condições experimentais. (A e B) Tratamento com 1 mM GC7 ou indução de “starvation” por depleção de nitrogênio por 1 hora na linhagem controle VZL1411. (C e D) Diferentes linhagens mutantes com seus respectivos controles (C) WT (VZL1405), *hyp2-3* (VZL1408) e (D) WT (VZL1411), $\Delta lia1$ (VZL1414).

Foi também iniciada a realização do ensaio de GFP-Atg8. Durante a indução de autofagia, o N-terminal de Atg8 é conjugado à fosfoetanolamina e fica associado ao autofagossomo nas superfícies interna e externa deste. Uma

vez que realizada a fusão do autofagossomo com o vacuolo, Atg8 é rapidamente degradado, mas GFP é resistente à hidrólise vacuolar e pode ser quantificado como uma medida do fluxo macroautofágico (KAINZ et al., 2017). Como pode ser visto na Figura 18, a indução de *starvation* pela transferência para meio sem nitrogênio resulta no aumento de macroautofagia, revelado pelo aumento na clivagem de GFP de Atg8. Por outro lado, esta clivagem praticamente não acontece na ausência de Atg7, que a enzima responsável pela conjugação de Atg8 com fosfoetanolamina (DELORME-AXFORD et al., 2015). Por outro lado, usamos como controle positivo o tratamento com espermidina, uma vez que esta é um potente indutor de autofagia (EISENBERG et al., 2009; MORSELLI et al., 2011). Nessas condições, encontramos que o tratamento com GC7 parece inibir autofagia por este ensaio (na ausência de indução de *starvation*) e que o veículo (ácido acético 100 μ M) incrementa a clivagem de GFP-ATG8 em comparação com o WT sem veículo. Dessa forma, nos perguntamos se a depleção de espermidina intracelular poderia estar causando inibição de autofagia e observamos, em um primeiro experimento, que $\Delta spe1$ causa um efeito parecido com o de $\Delta atg7$, nas condições em que este ensaio foi realizado. Finalmente, o mutante *hyp2-3* de eIF5A não parece apresentar qualquer diferença do selvagem. Estes dados ainda precisam ser confirmados com um maior número de replicatas.

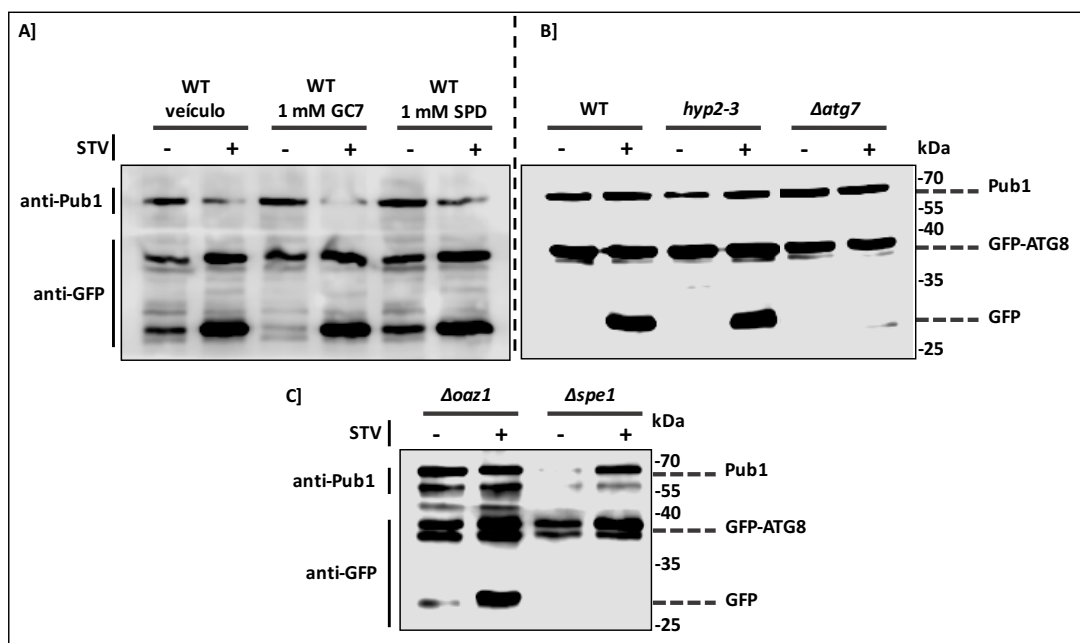


Figura 18. Efeito do GC7 sobre a clivagem de GFP-Atg8. (A, B e C) *Western blots* dos extratos proteicos (40 μ g) das linhagens selecionadas após 12 h de crescimento na presença ou ausência do veículo (ácido acético 100 μ M), 1 mM de GC7 (em ácido acético 100 μ M) ou 1 mM de espermidina (em água). Anti-Pub1 foi utilizado como controle de carregamento. STV (*starvation*) foi induzida por depleção de nitrogênio por 2 h. (A) Mostra o resultado de 2 experimentos independentes realizados em 2 dias diferentes. (B) Mostra o resultado de 3 experimentos independentes realizados conjuntamente. (C) Mostra o resultado do experimento realizado apenas 1 vez.

Os nocautes $\Delta bre5$, $\Delta ubp3$ e $\Delta pro1$ não possuem interação genética positiva com mutantes de *HYP2*, *DYS1* ou *LIA1*, mas existe interação genética negativa em *hyp2-3 $\Delta bre5$* , que é justamente o contrário do esperado e sugere que a relação de GC7 com a via de ribofagia seja independente de eIF5A (*TheCellMap*; Figura 19) e os níveis de eIF5A não estão alterados nos mutantes de $\Delta bre5$ e $\Delta ubp3$ (Figura 19). Além disso, existe interação genética negativa para os seguintes pares de nocautes para $\Delta sam3 \Delta bre5$ e $\Delta spe2 \Delta bre5$ (COSTANZO et al., 2010) e (*TheCellMap*), sugerindo que não é o efeito de depleção de poliaminas que afeta positivamente o crescimento de $\Delta bre5$.

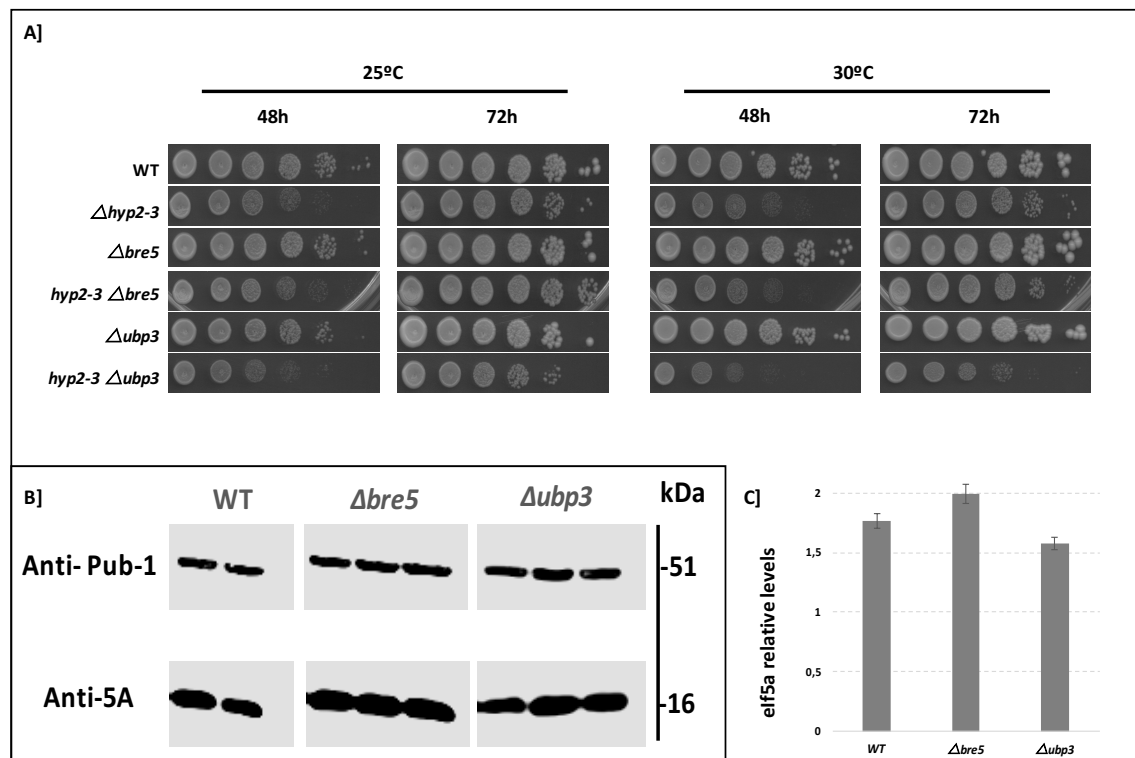


Figura 19. Interações genéticas de $\Delta bre5$ e $\Delta ubp3$ com $hyp2-3$ e níveis de eIF5A em $\Delta bre5$ e $\Delta ubp3$. (A) As linhagens indicadas foram diluídas de forma seriada 1:10 e transferidas para os meios de cultura YPD e crescidas nas temperaturas e tempos indicados. (B) *Western blots* dos extratos proteicos (10 μ g) das linhagens selecionadas são mostrados, após o crescimento até 1-1,2 DO_{600nm}. Anti-Pub1 foi utilizado como controle de carregamento. (C) A quantificação das bandas foi realizada utilizando o software *image-J* e os níveis proteicos de eIF5A total foram calculadas normalizando por níveis proteicos de Pub1. Resultados são mostrados para n=2 (WT) e n=3 para $\Delta bre5$ e $\Delta ubp3$.

Outros nocautes de genes relacionados a autofagia apareceram como sensíveis a GC7: *DOA1* (proteína envolvida com degradação mediada por ubiquinação e necessária para ribofagia); *ATG7* (proteína necessária para autofagia geral e ribofagia); *ATG8* (regulador de Atg1 e diretamente envolvida com autofagia) (TYLER; JOHNSON, 2018 ; OSSAREH-NAZARI et al., 2010). Faz-se necessário dizer aqui que existe uma interação genética negativa no duplo mutante *hyp2-ts $\Delta doa1$* , que seria um confundidor desta ação de GC7 (*TheCellMap*, Figura 8).

Finalmente, nocautes de outros genes relacionados a ubiquitinação ou autofagia apareceram no rastreamento (Tabela 2):

- 1- Resistentes: *UBI4* (ubiquitina) - não confirmado; *CUE1* (*Ubiquitin-binding protein*; proteína da membrana do ER que recruta Ubc7) - não confirmado;
- 2- Sensíveis: *UBX2* (fator envolvido com *ER-associated protein degradation* (ERAD)) - confirmado; *UBC7* (envolvido com *ER-associated protein degradation* (ERAD)) - confirmado.

No entanto, estes genes não parecem estar diretamente envolvidos em ribofagia e alguns apresentam interação genética similar com mutantes de eIF5A ou de hipusinação (Tabela 2 e Figura 8).

4.6. Efeito de GC7 sobre outras vias

Uma série de outros mutantes foram identificados no rastreamento quimio-genético ou testados por diluição seriada ou curva de crescimento (Tabela 2).

Entre eles, vale destacar que vários genes relacionados com acidificação vacuolar tiveram seus nocautes identificados como resistentes a GC7. Apesar de não termos confirmado estes mutantes, podem estar relacionados a um mecanismo de degradação de GC7.

Outro dado que nos chamou atenção foi a sensibilidade a GC7 dos nocautes de *THR1* e *THR4* (dados não mostrados), os quais são essenciais para a síntese de treonina (MANNHAUPT et al., 1990; RAMOS; CALDERÓN, 1994). No entanto, existe uma interação genética negativa no duplo mutante *hyp2-ts Δthr4*, que pode indicar que o fenótipo de sensibilidade a GC7 pode ser dependente de eIF5A (*TheCellMap*; Figura 8). Não existem dados para o nocaute *Δthr1* no *TheCellMap*.

Os nocautes de dois genes que atuam no processo de *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD / complexo Nam7-Upf3-Nmd2), *Δnam7* e *Δupf3*, apresentaram sensibilidade a GC7 (dados não mostrados). Este complexo NMD restringe a tradução de mRNAs contendo códons de terminação prematuros gerados por erros da transcrição, pseudogenes, mRNAs contendo introns, mRNAs contendo uORFs e mRNAs regulados por *Programmed Frameshifting* (PRF) (CELIK et al., 2017). O PRF é controlado por sequências específicas que induzem a mudança da janela de leitura durante a elongação da tradução e estão presentes em mRNAs endógenos e de vírus. Uma vez que a antizima (Oaz1) possui um PRF controlado pelos níveis celulares de poliaminas (KURIAN et al., 2011), a redução do funcionamento deste complexo poderia aumentar os níveis de Oaz1, o que aumenta a degradação de Spe1, reduzindo os níveis de poliaminas. A verificação dos níveis de Oaz1, Spe1 e poliaminas nos mutantes de NMD poderia esclarecer esta hipótese.

4.7. Competição GC7- espermidina

Após a importante inibição da hipusinação demonstrado pelo tratamento com 1 mM de GC7 (Figura 6) e sendo a enzima desoxi-hipusina sintase o único alvo bem estabelecido para este composto, nos perguntamos se a suplementação de espermidina poderia reverter o fenótipo de sensibilidade no crescimento celular gerado por GC7, uma vez que um trabalho mostrou que a principal função da espermidina seria a hipusinação de eIF5A (CHATTOPADHYAY; PARK; TABOR, 2007). Assim, verificamos o efeito de

espermidina (SPD) no crescimento celular da linhagem controle *Δura10* e encontramos que 1, 2 e 4 mM de espermidina apresentaram um efeito positivo no crescimento. No entanto, 8 e 15 mM de espermidina se mostraram como concentrações prejudiciais, sendo que 15 mM de espermidina levou à letalidade (Figura 20). Por outro lado, a adição de 1 mM de GC7 aboliu qualquer efeito positivo gerado por suplementação de SPD nas concentrações de 1, 2 ou 4 mM, prevalecendo o efeito de GC7 e, inclusive, levou a uma piora do crescimento a 4 e 8 mM de SPD (Figura 20). Dessa forma, não foi confirmada nossa hipótese inicial, e nenhuma das concentrações de SPD utilizadas reverteu o fenótipo no crescimento celular na presença de 1 mM de GC7, estes resultados poderiam ser explicados em parte ao fato do GC7 ter uma constante de dissociação (K_d) 60 vezes menor que a SPD para o tetrâmero da enzima desoxi-hipusina sintase (HOON LEE; HEE PARK, 2000). O resultado mais surpreendente foi a baixa toxicidade celular apresentada pelo tratamento com GC7 em *S. cerevisiae*, pois 15 mM de GC7 demonstrou apenas um atraso no crescimento celular (Figura 20B). Este último dado poderia explicar não ter identificado de maneira clara transportadores responsáveis pela entrada ou extrusão do inibidor, assim como sugerem que os efeitos celulares demonstrados para o composto GC7 poderiam ir além da sua similaridade estrutural com a poliamina espermidina.

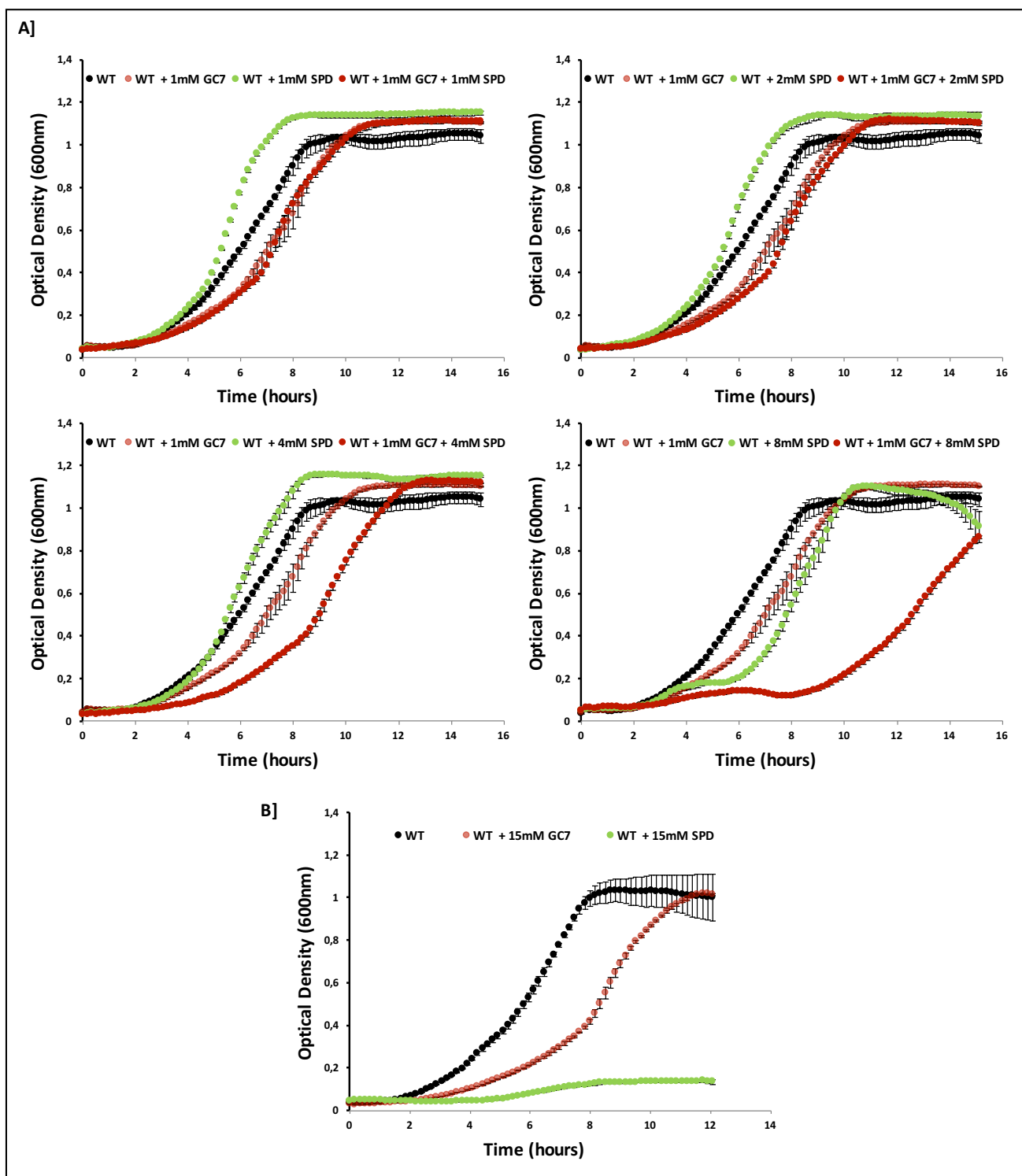


Figura 20. Ensaio de competição GC7-espermidina. (A e B) As linhagens seleccionadas foram diluídas em triplicata para 10^6 células/mL e crescidas na presença ou ausência de de GC7 e ou SPD nas concentrações indicadas por um período de 12 (B) ou 15 (A) horas em agitação constante. Os valores de DO_{600nm} foram registrados a cada 10 min e posteriormente sometidos para *simple moving average* (SMA) para suavizar a curva. Cada ponto é mostrado como a *media* $\pm$ *S.E.M*, $n=3$.

Tabela 2. Linhagens encontradas sensíveis ou resistentes ao GC7 a traves do rastreamento quimio-genético e ensaios confirmatórios (*)

Biological process	Gene systematic name	Gene standard name	Gene name	Hit from screens	Ortholog human gene	Complementation by human ortholog	Hypusine genetic interaction	Confirmation
Arginine biosynthesis pathway	YMR062C	<i>ARG7</i>	Arginine requiring	não	não	não	não	SD(1)
Arginine biosynthesis pathway	YHR018C	<i>ARG4</i>	Arginine requiring	não	sim	não	não	GC(1)
Arginine biosynthesis pathway	YJL088W	<i>ARG3</i>	Arginine requiring	não	sim	não	não	GC(1)
Arginine degradation pathway	YLR438W	<i>CAR2</i>	Catabolism of Arginine	não	sim	sim	2	GC(1)
Autophagy	YBL078C	<i>ATG8</i>	AuTophaGy related	não	sim	não	não	GC(1)
Autophagy / Ribophagy	YHR171W	<i>ATG7</i>	AuTophaGy related	não	sim	não	não	GC(1)
Flipasse activity	YMR162C	<i>DNF3</i>	Drs2 Neo1 Family	não	sim	não	não	GC(1)
Flipasse activity	YER166W	<i>DNF1</i>	Drs2 Neo1 Family	não	sim	não	não	GC(1)
Flipasse activity	YCR094W	<i>CDC50</i>	Cell Division Cycle	não	sim	sim	não	GC(2)
nonsense-mediated mRNA decay (NMD)	YGR072W	<i>UPF3</i>	UP Frameshift	não	sim	não	2, 4	SD(1)
nonsense-mediated mRNA decay (NMD)	YMR080C	<i>NAM7</i>	Nuclear Accommodation of Mitochondria	não	sim	sim	2	SD(1)
Others tested	YIL015W	<i>BAR1</i>	BARrier to the alpha factor response	não	sim	não	não	GC(1)
Others tested	YML016C	<i>PPZ1</i>	Protein Phosphatase Z	não	não	não	1	GC(2)
Others tested	YDR436W	<i>PPZ2</i>	Protein Phosphatase Z	não	não	não	1	GC(2)
Others tested	YHR006W	<i>STP2</i>	protein with similarity to Stp1p	não	não	não	não	GC(2)
Others tested	YJL164C	<i>TPK1</i>	Takashi's Protein Kinase	não	sim	sim	1	GC(2)
Others tested	YPL203W	<i>TPK2</i>	Takashi's Protein Kinase	não	sim	sim	não	GC(2)
Others tested	YKL166C	<i>TPK3</i>	Takashi's Protein Kinase	não	sim	sim	não	GC(2)
Others tested	YHR135C	<i>YCK1</i>	Yeast Casein Kinase I homolog	não	sim	não	1	GC(2)
Pantothenate biosynthesis pathway	YMR020W	<i>FMS1</i>	Fenpropimorph-resistance Multicopy Suppressor	não	sim	não	não	SD(1)
Polyamines biosynthesis pathway	YLR146C	<i>SPE4</i>	Spermidine auxotroph	não	sim	não	não	SD(1)
Proline biosynthesis pathway	YOR323C	<i>PRO2</i>	PROline requiring	não	sim	não	não	GC(1)
Ribophagy	YKL213C	<i>DOA1</i>	Degradation Of Alpha	não	sim	não	1	GC(1)
ribosomal protein of 40S	YMR116C	<i>ASC1</i>	Absence of growth Suppressor of Cyp1	não	sim	não	1, 3*	SD(1)
ribosome-associated chaperone; Ssz1-Ssb1/2-Zuo1 complex	YGR285C	<i>ZUO1</i>	Zuotin	não	sim	sim	não	SD(1)
Transmembrane transport	YOR291W	<i>YPK9</i>	Yeast PARK9	não	sim	não	1, 3	GC(2)
Transmembrane transport	YDL210W	<i>UGA4</i>	Utilization of GABA	não	sim	não	1	GC(1)
Transmembrane transport	YKL174C	<i>TPO5</i>	Transporter of POLYamines	não	sim	não	não	GC(1)
Transmembrane transport	YML123C	<i>PHO84</i>	PHOSphate metabolism	não	não	não	não	GC(1)
Transmembrane	YOR071C	<i>NRT1</i>	Nicotinamide	não	não	não	não	GC(1)

transport			Riboside Transporter					
Transmembrane transport	YNL183C	<i>NPR1</i>	Nitrogen Permease Reactivator	não	sim	não	não	GC(2)
Transmembrane transport	YOR306C	<i>MCH5</i>	MonoCarboxylate transporter Homolog	não	não	não	não	GC(1)
Transmembrane transport	YNL318C	<i>HXT14</i>	HeXose Transporter	não	sim	não	não	GC(1)
Transmembrane transport	YFL011W	<i>HXT10</i>	HeXose Transporter	não	sim	não	1	GC(1)
Transmembrane transport	YGL077C	<i>HNM1</i>	Hyper-resistance to Nitrogen Mustard	não	sim	não	não	GC(2)
Transmembrane transport	YPR124W	<i>CTR1</i>	Copper TRansport	não	sim	sim	não	GC(1)
Transmembrane transport	YCL025C	<i>AGP1</i>	high-Affinity Glutamine Permease	não	sim	não	não	GC(2)
Transmembrane transport - DHA1 family	YHR048W	<i>YHK8</i>	Presumed antiporter of the major facilitator superfamily	não	não	não	não	GC(2)
Transmembrane transport - DHA1 family	YPR156C	<i>TPO3</i>	Transporter of POlyamines	não	não	não	não	GC(1)
Transmembrane transport - DHA1 family	YGR138C	<i>TPO2</i>	Transporter of POlyamines	não	não	não	não	GC(1)
Transmembrane transport - DHA1 family	YLL028W	<i>TPO1</i>	Transporter of POlyamines	não	não	não	não	GC(1)
Transmembrane transport - DHA1 family	YBR043C	<i>QDR3</i>	QuiniDine Resistance	não	não	não	não	GC(2)
Transmembrane transport - DHA1 family	YIL120W	<i>QDR1</i>	QuiniDine Resistance	não	não	não	não	GC(2)
Transmembrane transport - DHA1 family	YNR055C	<i>HOL1</i>	HistidinOI	não	não	não	não	GC(2)
Transmembrane transport - DHA1 family	YNL065W	<i>AQR1</i>	Acids Quinidine Resistance	não	não	não	não	GC(2)
Arginine degradation pathway	YPL111W	<i>CAR1</i>	Catabolism of Arginine	não	sim	não	não	SD(1)
Autophagy	YPL154C	<i>PEP4</i>	carboxyPEPTidase Y-deficient	não	sim	não	2	GC(1)
Flipasse activity MDR	YDR093W	<i>DNF2</i>	Drs2 Neo1 Family	não	sim	não	não	GC(1)
transcription factor MDR	YML007W	<i>YAP1</i>	Yeast AP-1	não	sim	não	não	SD(2)
transcription factor	YBL005W	<i>PDR3</i>	Pleiotropic Drug Resistance	não	não	não	não	GC(1)
Methionine and S-adenosyl methionine biosynthesis pathway	YDR502C	<i>SAM2</i>	S- AdenosylMethionine requiring	não	sim	não	não	SD(1)
Methionine and S-adenosyl methionine biosynthesis pathway	YLR180W	<i>SAM1</i>	S- AdenosylMethionine requiring	não	sim	não	não	SD(1)
Methionine and S-adenosyl methionine biosynthesis pathway	YLR017W	<i>MEU1</i>	Multicopy Enhancer of UAS2	não	sim	sim	não	SD(1)
nonsense- mediated mRNA decay (NMD)	YHR077C	<i>NMD2</i>	Nonsense-mediated MRNA Decay	não	sim	não	2, 4	SD(1)
Others tested	YBL009W	<i>ALK2</i>	along with its paralog, ALK1, required for proper	não	sim	não	não	GC(2)

			spindle positioning and nuclear segregation following mitotic arrest					
Others tested	YDR283C	<i>GCN2</i>	General Control Nonderepressible	não	sim	não	não	SD(2)
Others tested	YOR322C	<i>LDB19</i>	Low Dye Binding	não	sim	não	2	GC(2)
others tested	YDR071C	<i>PAA1</i>	PolyAmine Acetyltransferase	não	sim	não	2	SD(1)
Others tested	YKL198C	<i>PTK1</i>	Putative serine/Threonine protein Kinase	não	sim	não	não	GC(1)
Others tested	YJR059W	<i>PTK2</i>	Putative serine/Threonine protein Kinase	não	sim	não	não	GC(1)
Others tested	YOR049C	<i>RSB1</i>	Resistance to Sphingoid long- chain Base	não	não	não	não	GC(1)
Others tested	YMR216C	<i>SKY1</i>	SRPK1-like Kinase in Yeast	não	sim	sim	não	GC(2)
Others tested	YNL154C	<i>YCK2</i>	Yeast Casein Kinase	não	sim	não	1	GC(2)
Pantothenate biosynthesis pathway	YIL145C	<i>PAN6</i>	Pantothenate biosynthesis	não	não	não	não	SD(1)
Pantothenate biosynthesis pathway	YBR176W	<i>ECM31</i>	ExtraCellular Mutant	não	não	não	não	SD(1)
Plasma membrane ATP- binding cassette (ABC) transporter	YOR153W	<i>PDR5</i>	Pleiotropic Drug Resistance	não	sim	sim	não	GC(1)
Plasma membrane ATP- binding cassette (ABC) transporter	YOR328W	<i>PDR10</i>	Pleiotropic Drug Resistance	não	sim	sim	não	GC(1)
Polyamines biosynthesis pathway	YPL052W	<i>OAZ1</i>	Ornithine decarboxylase Antizyme	não	não	não	2	SD(1)
Ribophagy	YMR247C	<i>LTN1</i>	RING domain mutant Killed by Rtf1 deletion	não	sim	não	2	GC(2)
ribosome- associated chaperone; Ssz1-Ssb1/2- Zuo1 complex	YDL229W	<i>SSB1</i>	Stress-Seventy subfamily B	não	sim	não	4	SD(1)
Transcription factor	YEL009C	<i>GCN4</i>	General Control Nonderepressible	não	sim	não	não	SD(2)
Transmembrane transport	YPL265W	<i>DIP5</i>	Dlcarboxylic amino acid Permease	não	sim	não	não	GC(2)
Transmembrane transport	YGR281W	<i>YOR1</i>	Yeast Oligomycin Resistance	não	sim	sim	2, 4	GC(1)
Transmembrane transport	YKR050W	<i>TRK2</i>	TRansport of potassium (K)	não	não	não	1	GC(2)
Transmembrane transport	YJL093C	<i>TOK1</i>		não	sim	não	não	GC(1)
Transmembrane transport	YBR069C	<i>TAT1</i>	Tyrosine and tryptophan Amino acid Transporter	não	sim	não	não	GC(2)
Transmembrane transport	YOL122C	<i>SMF1</i>	Suppressor of Mitochondria import Function	não	sim	não	2	GC(1)
Transmembrane transport	YKR093W	<i>PTR2</i>	Peptide TRansport	não	sim	não	não	GC(1)
Transmembrane transport	YGL167C	<i>PMR1</i>	Plasma Membrane ATPase Related	não	sim	sim	2, 4	GC(2)
Transmembrane transport	YGL006W	<i>PMC1</i>	Plasma Membrane Calcium	não	sim	não	não	GC(2)
Transmembrane transport	YLL061W	<i>MMP1</i>	S-MethylMethionine Permease	não	sim	não	não	GC(1)
Transmembrane transport	YNL268W	<i>LYP1</i>	LYsine-specific Permease	não	sim	não	não	SD(1)

Transmembrane transport	YOL103W	<i>ITR2</i>	myo-Inositol TRansporter	não	sim	não	não	GC(1)
Transmembrane transport	YNR072W	<i>HXT17</i>	HeXose Transporter	não	sim	não	não	GC(1)
Transmembrane transport	YKR039W	<i>GAP1</i>	General Amino acid Permease	não	sim	não	2	GC(2)
Transmembrane transport	YLL043W	<i>FPS1</i>	fdp1 Suppressor	não	sim	não	1	GC(1)
Transmembrane transport	YMR319C	<i>FET4</i>	FErrous Transport	não	não	não	não	GC(1)
Transmembrane transport	YHL016C	<i>DUR3</i>	Degradation of URea	não	sim	não	não	SD(1)
Transmembrane transport	YEL063C	<i>CAN1</i>	CANavanine resistance	não	sim	não	não	GC(2)
Transmembrane transport	YNL275W	<i>BOR1</i>	BORon transporter	não	sim	não	não	GC(1)
Transmembrane transport	YIL088C	<i>AVT7</i>	Amino acid Vacuolar Transport	não	sim	não	2	GC(1)
Transmembrane transport	YPR201W	<i>ARR3</i>	ARsenicals Resistance	não	não	não	não	GC(1)
Transmembrane transport	YFL050C	<i>ALR2</i>	ALuminum Resistance	não	não	não	não	GC(1)
Transmembrane transport	YNL270C	<i>ALP1</i>	arginine transporter; expression is normally very low and it is unclear what conditions would induce significant expression (CAN1 paralog)	não	sim	não	não	GC(1)
Transmembrane transport - DHA1 family	YOR273C	<i>TPO4</i>	Transporter of POLyamines	não	não	não	1	SD(1)
Transmembrane transport - DHA1 family	YIL121W	<i>QDR2</i>	QuiniDine Resistance	não	não	não	não	GC(1)
Transmembrane transport - DHA1 family	YBR008C	<i>FLR1</i>	FLuconazole Resistance	não	não	não	não	GC(2)
Transmembrane transport - DHA1 family	YBR180W	<i>DTR1</i>	DiTyRosine	não	não	não	2	GC(2)
Transmembrane transport - DHA2 subfamily	YML116W	<i>ATR1</i>	AminoTriazole Resistance	não	não	não	não	GC(1)
Transmembrane transport	YGR260W	<i>TNA1</i>	Transporter of Nicotinic Acid	não	não	não	1, 3	GC(1)
MDR transcription factor	YGL013C	<i>PDR1</i>	Pleiotropic Drug Resistance	não	não	não	4	GC(1)
Others tested	YPR029C	<i>APL4</i>	clathrin Adaptor Protein complex Large chain	não	sim	não	não	GC(2)
Others tested	YDR463W	<i>STP1</i>	Species-specific tRNA Processing	não	não	não	não	GC(2)
Plasma membrane ATP-binding cassette (ABC) transporter	YDR011W	<i>SNQ2</i>	Sensitivity to 4-NitroQuinoline-N-oxide	não	sim	sim	não	GC(1)
Proline biosynthesis pathway	YDR300C	<i>PRO1</i>	PROline requiring	não	não	não	não	GC(1)
Transmembrane transport	YLL052C	<i>AQY2</i>	AQUaporin from Yeast	não	sim	não	não	GC(1)
Co-chaperone that stimulates the ATPase activity of Ssa1p	YNL227C	<i>UJ1</i>	J-protein (Type III)	resistant	sim	não	não	GC(1)
Others tested	YMR022W	<i>UBC7</i>	UBiquitin-Conjugating enzyme	resistant	sim	sim	2	GC(1)
Others tested	YML013W	<i>UBX2</i>	UBiquitin regulatory X	resistant	sim	não	1, 5	GC(1)

Ribophagy	YER151C	<i>UBP3</i>	UBiquitin-specific Protease	resistant	sim	não	não	GC(1)
Ribophagy	YNR051C	<i>BRE5</i>	BREfeldin A sensitivity	resistant	sim	não	não	GC(1)
Resistant HIT Not confirmed	YJL200C	<i>ACO2</i>	ACOnitase	resistant	sim	sim	não	-
Resistant HIT Not confirmed	YNL148C	<i>ALF1</i>	ALpha tubulin Folding	resistant	sim	não	não	-
Resistant HIT Not confirmed	YDR525W	<i>API2</i>	APIcal	resistant	não	não	não	-
Resistant HIT Not confirmed	YIL040W	<i>APQ12</i>	APical growth revealed by Quantitative morphological analysis	resistant	não	não	não	-
Resistant HIT Not confirmed	YNR019W	<i>ARE2</i>	Acyl-coenzyme A: cholesterol acyl transferase-Related Enzyme	resistant	sim	não	não	-
Resistant HIT Not confirmed	YGL157W	<i>ARI1</i>	Aldehyde Reductase Intermediate, subclass of SDR	resistant	sim	não	não	-
Resistant HIT Not confirmed	YOR141C	<i>ARP8</i>	Actin-Related Protein	resistant	sim	não	não	-
Resistant HIT Not confirmed	YLR242C	<i>ARV1</i>	ARE2 Required for Viability	resistant	sim	sim	não	-
Resistant HIT Not confirmed	YMR098C	<i>ATP25</i>	ATPase	resistant	não	não	não	-
Resistant HIT Not confirmed	YPR057W	<i>BRR1</i>	Bad Response to Refrigeration	resistant	não	não	1, 4	-
Resistant HIT Not confirmed	YGR157W	<i>CHO2</i>	CHOLine requiring	resistant	não	não	1, 5	-
Resistant HIT Not confirmed	YMR264W	<i>CUE1</i>	Coupling of Ubiquitin conjugation to ER degradation	resistant	sim	não	não	-
Resistant HIT Not confirmed	YGL078C	<i>DBP3</i>	Dead Box Protein	resistant	sim	não	1	-
Resistant HIT Not confirmed	YHR011W	<i>DIA4</i>	Digs Into Agar	resistant	sim	não	não	-
Resistant HIT Not confirmed	YCL058C	<i>FYV5</i>	Function required for Yeast Viability	resistant	não	não	não	-
Resistant HIT Not confirmed	YGL020C	<i>GET1</i>	Guided Entry of Tail-anchored proteins	resistant	sim	sim	não	-
Resistant HIT Not confirmed	YLR293C	<i>GSP1</i>	Genetic Suppressor of Prp20-1	resistant	sim	não	2, 4	-
Resistant HIT Not confirmed	YER014W	<i>HEM14</i>	HEME biosynthesis	resistant	sim	não	não	-
Resistant HIT Not confirmed	YJR055W	<i>HIT1</i>	Hlgh Temperature growth	resistant	sim	não	não	-
Resistant HIT Not confirmed	YIL110W	<i>HPM1</i>	Histidine Protein Methyltransferase shares with	resistant	sim	não	não	-
Resistant HIT Not confirmed	YLR309C	<i>IMH1</i>	Integrins and Myosins significant Homology	resistant	não	não	não	-
Resistant HIT Not confirmed	YIR005W	<i>IST3</i>	Increased Sodium Tolerance	resistant	sim	não	1	-
Resistant HIT Not confirmed	YAL024C	<i>LTE1</i>	Low Temperature Essential	resistant	sim	não	1	-
Resistant HIT Not confirmed	YIL094C	<i>LYS12</i>	LYSine requiring	resistant	sim	não	não	-
Resistant HIT Not confirmed	YPR051W	<i>MAK3</i>	MAintenance of Killer	resistant	sim	não	2	-
Resistant HIT Not confirmed	YDL078C	<i>MDH3</i>	Malate DeHydrogenase	resistant	sim	não	1	-
Resistant HIT Not confirmed	YJR074W	<i>MOG1</i>	Multicopy suppressor Of ts Gsp1	resistant	sim	sim	não	-
Resistant HIT Not confirmed	YGR023W	<i>MTL1</i>	Mid-Two Like	resistant	não	não	não	-
Resistant HIT Not confirmed	YGR159C	<i>NSR1</i>		resistant	sim	não	não	-
Resistant HIT	YKL057C	<i>NUP120</i>	NUclear Pore	resistant	sim	não	não	-

Not confirmed								
Resistant HIT	YAL068C	<i>PAU8</i>	seriPAUperin	resistant	não	não	não	-
Not confirmed								
Resistant HIT	YOR158W	<i>PET123</i>	PETite colonies	resistant	não	não	não	-
Not confirmed								
Resistant HIT	YHR034C	<i>PIH1</i>	Protein Interacting with Hsp90	resistant	sim	não	não	-
Not confirmed								
Resistant HIT	YER185W	<i>PUG1</i>	Protoporphyrin Uptake Gene	resistant	não	não	não	-
Not confirmed								
Resistant HIT	YLR414C	<i>PUN1</i>	Plasma membrane protein Upregulated during Nitrogen stress	resistant	não	não	não	-
Not confirmed								
Resistant HIT	YCR036W	<i>RBK1</i>	RiBoKinase	resistant	sim	não	não	-
Not confirmed								
Resistant HIT	YGL158W	<i>RCK1</i>	Radiation sensitivity Complementing Kinase	resistant	sim	não	não	-
Not confirmed								
Resistant HIT	YLR248W	<i>RCK2</i>	Radiation sensitivity Complementing Kinase	resistant	sim	não	não	-
Not confirmed								
Resistant HIT	YDR195W	<i>REF2</i>	RNA End Formation	resistant	não	não	não	-
Not confirmed								
Resistant HIT	YPL066W	<i>RGL1</i>	Rho1 GEF Localizing	resistant	não	não	não	-
Not confirmed								
Resistant HIT	YIL118W	<i>RHO3</i>	Ras HOmolog	resistant	sim	não	1	-
Not confirmed								
Resistant HIT	YEL024W	<i>RIP1</i>	Rieske Iron-sulfur Protein	resistant	sim	não	1	-
Not confirmed								
Resistant HIT	YKL006W	<i>RPL14A</i>	Ribosomal Protein of the Large subunit	resistant	sim	não	2	-
Not confirmed								
Resistant HIT	YMR242C	<i>RPL20A</i>	Ribosomal Protein of the Large subunit	resistant	sim	não	não	-
Not confirmed								
Resistant HIT	YLR061W	<i>RPL22A</i>	Ribosomal Protein of the Large subunit	resistant	sim	não	1	-
Not confirmed								
Resistant HIT	YDR471W	<i>RPL27B</i>	Ribosomal Protein of the Large subunit	resistant	sim	não	não	-
Not confirmed								
Resistant HIT	YGL076C	<i>RPL7A</i>	Ribosomal Protein of the Large subunit	resistant	sim	não	não	-
Not confirmed								
Resistant HIT	YHL033C	<i>RPL8A</i>	Ribosomal Protein of the Large subunit	resistant	sim	não	1	-
Not confirmed								
Resistant HIT	YDL130W	<i>RPP1B</i>	Ribosomal Protein P1 Beta	resistant	sim	não	2	-
Not confirmed								
Resistant HIT	YML026C	<i>RPS18B</i>	Ribosomal Protein of the Small subunit	resistant	sim	não	não	-
Not confirmed								
Resistant HIT	YLL041C	<i>SDH2</i>	Succinate DeHydrogenase	resistant	sim	sim	não	-
Not confirmed								
Resistant HIT	YLR403W	<i>SFP1</i>	Split Finger Protein	resistant	sim	não	não	-
Not confirmed								
Resistant HIT	YGR112W	<i>SHY1</i>	SURF Homolog of Yeast	resistant	sim	não	não	-
Not confirmed								
Resistant HIT	YBR266C	<i>SLM6</i>	Synthetic Lethal with Mss4	resistant	não	não	não	-
Not confirmed								
Resistant HIT	YJL151C	<i>SNA3</i>	Sensitivity to NA+	resistant	não	não	não	-
Not confirmed								
Resistant HIT	YDR186C	<i>SND1</i>	Srp-iNDependent targeting	resistant	não	não	não	-
Not confirmed								
Resistant HIT	YBR289W	<i>SNF5</i>	Sucrose NonFermenting	resistant	sim	não	2	-
Not confirmed								
Resistant HIT	YDR392W	<i>SPT3</i>	SuPpressor of Ty's	resistant	sim	não	não	-
Not confirmed								
Resistant HIT	YHR041C	<i>SRB2</i>	Suppressor of RNA polymerase B	resistant	não	não	1	-
Not confirmed								
Resistant HIT	YCL037C	<i>SRO9</i>	Suppressor of rho3	resistant	sim	não	não	-
Not confirmed								
Resistant HIT	YPR086W	<i>SUA7</i>	Suppressor of Upstream AUG	resistant	sim	não	1, 4	-
Not confirmed								
Resistant HIT	YMR039C	<i>SUB1</i>	SUPpressor of TFIIIB mutations	resistant	sim	sim	1	-
Not confirmed								
Resistant HIT	YNR004W	<i>SWM2</i>	Synthetic With mud2-delta	resistant	não	não	1	-
Not confirmed								
Resistant HIT	YPL157W	<i>TGS1</i>	TrimethylGuanosine Synthase	resistant	sim	não	não	-
Not confirmed								
Resistant HIT	YOL006C	<i>TOP1</i>	TOPoisomerase	resistant	sim	sim	não	-
Not confirmed								
Resistant HIT	YLL039C	<i>UBI4</i>	Ubiquitin	resistant	sim	não	não	-

Not confirmed								
Resistant HIT	YPL234C	VMA11	Vacuolar Membrane	resistant	sim	não	não	-
Not confirmed			Atpase					
Resistant HIT	YHR026W	VMA16	Vacuolar Membrane	resistant	sim	não	não	-
Not confirmed			Atpase					
Resistant HIT	YGR105W	VMA21	Vacuolar Membrane	resistant	sim	não	não	GC(1)
Not confirmed			Atpase					
Resistant HIT	YHR060W	VMA22	Vacuolar Membrane	resistant	sim	não	não	-
Not confirmed			Atpase					
Resistant HIT	YEL027W	VMA3	Vacuolar Membrane	resistant	sim	não	5	-
Not confirmed			Atpase					
Resistant HIT	YLR447C	VMA6	Vacuolar Membrane	resistant	sim	não	não	-
Not confirmed			Atpase					
Resistant HIT	YKL119C	VPH2	Vacuolar pH	resistant	sim	não	não	-
Not confirmed								
Resistant HIT	YLR396C	VPS33	Vacuolar Protein	resistant	sim	não	não	-
Not confirmed			Sorting					
Resistant HIT	YDR027C	VPS54	Vacuolar Protein	resistant	sim	não	5	-
Not confirmed			Sorting					
Resistant HIT	YJR044C	VPS55	Vacuolar Protein	resistant	sim	não	não	-
Not confirmed			Sorting					
Resistant HIT	YDR369C	XRS2	X-Ray Sensitive	resistant	não	não	1	-
Not confirmed								
Resistant HIT	YNL044W	YIP3	Ypt-Interacting	resistant	sim	não	não	-
Not confirmed			Protein					
Resistant HIT	YBL094C			resistant	não	não	não	-
Not confirmed								
Resistant HIT	YDR042C			resistant	não	não	2	-
Not confirmed								
Resistant HIT	YEL068C			resistant	não	não	não	-
Not confirmed								
Resistant HIT	YER119C-A			resistant	não	não	não	-
Not confirmed								
Resistant HIT	YER186C			resistant	não	não	não	-
Not confirmed								
Resistant HIT	YGL109W			resistant	não	não	não	-
Not confirmed								
Resistant HIT	YGL159W			resistant	sim	não	1	-
Not confirmed								
Resistant HIT	YGR111W			resistant	não	não	não	-
Not confirmed								
Resistant HIT	YGR272C			resistant	não	não	não	-
Not confirmed								
Resistant HIT	YNR014W			resistant	não	não	1	-
Not confirmed								
Resistant HIT	YPL102C			resistant	não	não	2	-
Not confirmed								
Resistant HIT	YMR072W	ABF2	ARS-Binding Factor	resistant	não	não	não	-
Not confirmed								
Resistant HIT	YBR128C	ATG14	AuTophagy related	resistant	não	não	não	-
Not confirmed								
Resistant HIT	YGL121C	GPG1	G Protein Gamma	resistant	não	não	não	-
Not confirmed								
Resistant HIT	YMR021C	MAC1	Metal binding	resistant	não	não	não	-
Not confirmed			ACTivator					
Resistant HIT	YOL003C	PFA4	Protein Fatty	resistant	sim	sim	não	-
Not confirmed			Acyltransferase					
Resistant HIT	YDR137W	RGP1	Reduced Growth	resistant	sim	não	não	-
Not confirmed			Phenotype					
Resistant HIT	YFL036W	RPO41	RNA POLYmerase	resistant	sim	não	não	-
Not confirmed								
Resistant HIT	YGL115W	SNF4	Sucrose	resistant	sim	não	1, 2	-
Not confirmed			NonFermenting					
Resistant HIT	YJL138C	TIF2	Translation Initiation	resistant	sim	não	não	-
Not confirmed			Factor					
Resistant HIT	YDR495C	VPS3	Vacuolar Protein	resistant	sim	não	não	-
Not confirmed			Sorting					
Resistant HIT	YKL118W			resistant	não	não	não	-
Not confirmed								
Resistant HIT	YPR050C			resistant	não	não	2	-
Not confirmed								
Sensitive HIT	YCR088W	ABP1	Actin Binding	sensitive	sim	não	1	-
Not confirmed			Protein					
Sensitive HIT	YGR037C	ACB1	Acyl-CoA-Binding	sensitive	sim	não	não	-
Not confirmed								
Sensitive HIT	YLR131C	ACE2	Activator of CUP1	sensitive	sim	não	1	-

Not confirmed	Expression							
Sensitive HIT Not confirmed	YFL039C	ACT1	ACTin	sensitive	sim	não	1, 2, 3, 4, 5	-
Sensitive HIT Not confirmed	YDL073W	AHK1	Associated with HKr1	sensitive	não	não	não	-
Sensitive HIT Not confirmed	YNR030W	ALG12	Asparagine-Linked Glycosylation	sensitive	sim	sim	não	-
Sensitive HIT Not confirmed	YLR133W	CKI1	Choline Kinase	sensitive	sim	não	não	-
Sensitive HIT Not confirmed	YNR010W	CSE2	Chromosome SEgregation	sensitive	não	não	não	-
Sensitive HIT Not confirmed	YBR042C	CST26	Chromosome STability	sensitive	sim	não	2	-
Sensitive HIT Not confirmed	YIL036W	CST6	Chromosome STability	sensitive	sim	não	1	-
Sensitive HIT Not confirmed	YDL160C	DHH1	DEAD box Helicase Homolog	sensitive	sim	não	não	-
Sensitive HIT Not confirmed	YGR093W	DRN1	Debranching enzyme-associated RiboNuclease	sensitive	sim	não	não	-
Sensitive HIT Not confirmed	YKR054C	DYN1	DYNein	sensitive	sim	não	2	-
Sensitive HIT Not confirmed	YMR299C	DYN3	DYNein	sensitive	não	não	não	-
Sensitive HIT Not confirmed	YKL204W	EAP1	EIF4E-Associated Protein	sensitive	não	não	não	-
Sensitive HIT Not confirmed	YLR372W	ELO3	fatty acid ELONGation	sensitive	sim	sim	4	-
Sensitive HIT Not confirmed	YLR233C	EST1	Ever Shorter Telomeres	sensitive	sim	não	1	-
Sensitive HIT Not confirmed	YBR026C	ETR1	2-Enoyl Thioester Reductase	sensitive	sim	sim	2	-
Sensitive HIT Not confirmed	R0010W	FLP1	FLiPase	sensitive	não	não	não	-
Others tested	YGL195W	GCN1	General Control Nonderepressible	sensitive	sim	não	1, 4	GC(1)
Sensitive HIT Not confirmed	YNL199C	GCR2	GlyColysis Regulation	sensitive	não	não	não	-
Sensitive HIT Not confirmed	YNL153C	GIM3	Gene Involved in Microtubule biogenesis	sensitive	sim	não	2, 5	-
Sensitive HIT Not confirmed	YML094W	GIM5	Gene Involved in Microtubule biogenesis	sensitive	sim	não	5	-
Sensitive HIT Not confirmed	YER020W	GPA2	G Protein Alpha subunit	sensitive	sim	não	não	-
Sensitive HIT Not confirmed	YPR160W	GPH1	Glycogen PHosphorylase	sensitive	sim	não	não	-
Sensitive HIT Not confirmed	YBR121C	GRS1	Glycyl-tRNA Synthase	sensitive	sim	sim	não	-
Sensitive HIT Not confirmed	YDL010W	GRX6	GlutaRedoXin	sensitive	não	não	1	-
Sensitive HIT Not confirmed	YDR420W	HKR1	Hansenula mrakii Killer toxin Resistant	sensitive	não	não	não	-
Others tested	YGL194C	HOS2	Hda One Similar Integrity of Mitochondrial Genome	sensitive	sim	não	não	GC(1)
Sensitive HIT Not confirmed	YCR046C	IMG1	Integrity of Mitochondrial Genome	sensitive	sim	não	não	-
Sensitive HIT Not confirmed	YDL115C	IWR1	Interacts With RNA polymerase II	sensitive	não	não	não	-
Sensitive HIT Not confirmed	YLR347C	KAP95	KAryoPherin	sensitive	sim	não	1, 2	-
Sensitive HIT Not confirmed	YKL008C	LAC1	Longevity-Assurance gene Cognate (LAG1 Cognate)	sensitive	sim	sim	1	-
Sensitive HIT Not confirmed	YLL049W	LDB18	Low Dye Binding	sensitive	não	não	1, 4	-
Sensitive HIT Not confirmed	YMR252C	MLO1	Mitochondrially Localized protein	sensitive	não	não	não	-
Sensitive HIT Not confirmed	YER068W	MOT2	Modulator Of Transcription Multicopy	sensitive	sim	não	não	-
Sensitive HIT Not confirmed	YOR288C	MPD1	suppressor of PDI1 deletion	sensitive	sim	não	não	-

Sensitive HIT Not confirmed	YKL098W	MTC2	Maintenance of Telomere Capping	sensitive	não	não	não	-
Sensitive HIT Not confirmed	YBR255W	MTC4	Maintenance of Telomere Capping	sensitive	não	não	não	-
Others tested	YPL070W	MUK1	coMpuTationally- linked to Kap95	sensitive	sim	não	não	GC(1)
Sensitive HIT Not confirmed	YKL151C	NNR2	Nicotinamide Nucleotide Repair	sensitive	sim	não	não	-
Sensitive HIT Not confirmed	YMR091C	NPL6	Nuclear Protein Localization	sensitive	sim	não	não	-
Sensitive HIT Not confirmed	YHL020C	OPI1	OverProducer of Inositol	sensitive	sim	sim	não	-
Sensitive HIT Not confirmed	YCL043C	PDI1	Protein Disulfide Isomerase	sensitive	sim	não	não	-
Sensitive HIT Not confirmed	YNL264C	PDR17	Pleiotropic Drug Resistance	sensitive	não	não	não	-
Sensitive HIT Not confirmed	YCR044C	PER1	protein Processing in the ER	sensitive	sim	não	1	-
Sensitive HIT Not confirmed	YNL097C	PHO23	PHOSphate metabolism	sensitive	sim	não	não	-
Sensitive HIT Not confirmed	YNL082W	PMS1	PostMeiotic Segregation	sensitive	sim	sim	1	-
Sensitive HIT Not confirmed	YDL188C	PPH22	Protein PHosphatase	sensitive	sim	não	não	-
Sensitive HIT Not confirmed	YDR028C	REG1	REsistance to Glucose repression	sensitive	não	não	não	-
Sensitive HIT Not confirmed	YPL024W	RMI1	RecQ Mediated genome Instability	sensitive	não	não	1	-
Sensitive HIT Not confirmed	YPR065W	ROX1	Regulation by OXYgen	sensitive	sim	não	2	-
Sensitive HIT Not confirmed	YNL105W	RRT16	Regulator of rDNA Transcription	sensitive	não	não	1	-
Sensitive HIT Not confirmed	YGR215W	RSM27	Ribosomal Small subunit of Mitochondria	sensitive	sim	não	não	-
Sensitive HIT Not confirmed	YDL025C	RTK1	Ribosome biogenesis and TRNA synthetase- associated Kinase	sensitive	sim	não	não	-
Sensitive HIT Not confirmed	YDR388W	RVS167	Reduced Viability on Starvation	sensitive	não	não	1	-
Sensitive HIT Not confirmed	YHR079C- A	SAE3	Sporulation in the Absence of spo Eleven	sensitive	não	não	1	-
Sensitive HIT Not confirmed	YOR035C	SHE4	Swi5p-dependent HO Expression	sensitive	sim	não	4	-
Sensitive HIT Not confirmed	YNL032W	SIW14	Synthetic Interaction with Whi2	sensitive	não	não	1, 4	-
Sensitive HIT Not confirmed	YMR179W	SPT21	SuPpressor of Ty	sensitive	não	não	não	-
Sensitive HIT Not confirmed	YNL224C	SQS1	SQuelch of Splicing suppression	sensitive	sim	não	não	-
Sensitive HIT Not confirmed	YBR126C	TPS1	Trehalose-6- Phosphate Synthase	sensitive	não	não	1	-
Sensitive HIT Not confirmed	YDR007W	TRP1	TRyPtophan	sensitive	não	não	não	-
Others tested	YMR223W	UBP8	UBiquitin-specific processing Protease	sensitive	sim	não	não	GC(1)
Sensitive HIT Not confirmed	YLR417W	VPS36	Vacuolar Protein Sorting	sensitive	sim	não	não	-
Sensitive HIT Not confirmed	YHR161C	YAP1801	Yeast Assembly Polypeptide	sensitive	sim	não	não	-
Sensitive HIT Not confirmed	YJL056C	ZAP1	Zinc-responsive Activator Protein	sensitive	sim	não	não	-
Others tested	YML035C	AMD1	AMP Deaminase	sensitive	sim	não	4	GC(1)
Arginine biosynthesis pathway	YJL071W	ARG2	Arginine requiring	sensitive	sim	não	não	SD(1)
Arginine biosynthesis pathway	YER069W	ARG5,6	Arginine requiring	sensitive	sim	não	não	SD(1)
Flipasse activity	YAL026C	DRS2	Deficiency of Ribosomal Subunits	sensitive	sim	não	1	GC(1)

Transmembrane transport	YCR028C	<i>FEN2</i>	FENpropimorph resistance	sensitive	não	não	não	SD(1)
Others tested	YNR047W	<i>FPK1</i>	FliPase Kinase 1	sensitive	sim	sim	não	GC(1)
Transmembrane transport	YOR130C	<i>ORT1</i>	ORnithine Transporter	sensitive	sim	sim	não	GC(2)
Transmembrane transport - DHA2 subfamily (DAG family)	YPR198W	<i>SGE1</i>	Suppression of Gal11 Expression	sensitive	não	não	não	GC(1)
Others tested	YBL007C	<i>SLA1</i>	Synthetic Lethal with ABP1	sensitive	sim	não	2	SD(1)
Polyamines biosynthesis pathway	YKL184W	<i>SPE1</i>	Spermidine auxotroph	sensitive	sim	não	1, 3	SD(1)
Polyamines biosynthesis pathway	YOL052C	<i>SPE2</i>	Spermidine auxotroph	sensitive	sim	não	1, 3	SD(1)
Polyamines biosynthesis pathway	YPR069C	<i>SPE3</i>	Spermidine auxotroph	sensitive	sim	não	1, 3, 4	SD(1)
Transmembrane transport	YEL031W	<i>SPF1</i>	Sensitivity to Pichia Farinosa killer toxin	sensitive	sim	não	não	GC(1)
ribosome-associated chaperone; Ssz1-Ssb1/2-Zuo1 complex	YHR064C	<i>SSZ1</i>		sensitive	sim	não	não	SD(1)
MDR transcription factor	YHR178W	<i>STB5</i>	Sin Three Binding protein	sensitive	não	não	1	GC(1)
Threonine biosynthesis pathway	YHR025W	<i>THR1</i>	THReonine requiring	sensitive	não	não	não	SD(1)
Threonine biosynthesis pathway	YCR053W	<i>THR4</i>	THReonine requiring	sensitive	sim	não	1	SD(2)
Transmembrane transport	YJL129C	<i>TRK1</i>	TRansport of potassium (K)	sensitive	não	não	não	GC(2)
Sensitive HIT	YLR278C			sensitive	não	não	1	-
Not confirmed	YLR149C			sensitive	não	não	5	-
Sensitive HIT	YMR253C			sensitive	sim	não	5	-
Not confirmed	YDR008C			sensitive	não	não	não	-
Sensitive HIT	YJL017W			sensitive	não	não	não	-
Not confirmed	YLR236C			sensitive	não	não	não	-
Sensitive HIT	YLR280C			sensitive	não	não	não	-
Not confirmed	YML009W-B			sensitive	não	não	não	-
Sensitive HIT	YNL057W			sensitive	não	não	não	-
Not confirmed	YPR197C			sensitive	não	não	não	-
Sensitive HIT	YNL198C			sensitive	não	não	não	-
Not confirmed								

***Legenda:**

Sensibilidade ou resistência: Linhagens foram consideradas sensíveis mediante diminuição do crescimento no SPOT, ou foram consideradas sensíveis e resistentes quando apresentaram diferença significativa (tratado versus não tratado) na capacidade de carga (K) ou tempo de geração (DT).

Gene standard name:

gene resistência

gene sensibilidade

gene resultado contrário na confirmação comparado com o *screen*

Complementation (A partir da informação registrada no *yeastmine* - Ortologos de levedura que complementan humano ou humano que complementan o gene de levedura):

Hypusination genetic interaction (A partir da informação registrada em *thecellmap*):

Negative genetic interaction with HYP2	1
Positive genetic interaction with HYP2	2
Negative genetic interaction with DYS1	3
Negative genetic interaction with LIA1	4
Positive genetic interaction with LIA1	5

Confirmation assays: Serial Dilution in 1 or 2 mM GC7 - SD(1) or SD(2)
Growth Curve in 1 or 2 mM GC7 - GC(1) or GC(2)

5. CONCLUSÕES

Em conjunto, os resultados obtidos neste trabalho sugerem ou evidenciam o efeito do inibidor de hipusinação GC7 no crescimento celular de diferentes linhagens mutantes, abarcando alguns processos celulares como: transporte transmembrana, tráfego intracelular e metabolismo, além de diversos complexos celulares (Figura 21).

O fenótipo de sensibilidade ao composto GC7 apresentado pelos diferentes mutantes da via de síntese de poliaminas, assim como, a diminuição dos níveis de poliaminas intracelulares mostrados na linhagem selvagem na presença de GC7 evidenciam, em conjunto, o efeito *off target* apresentado pelo composto GC7 na via de síntese de poliaminas (Figura 21).

O atraso no crescimento celular, mostrado pela ausência de Trk1 na presença do inibidor GC7, sugere que GC7 poderia estar sendo transportado mais eficientemente quando há hiperpolarização da membrana plasmática (Figura 21).

Os resultados de sensibilidade ao GC7 exibidos por mutantes pertencentes a família de proteínas transportadoras multidrogas *DHA1 family*, assim como o resultado de resistência mostrado pela linhagem mutante do transportador Tna1, sugerem que o composto GC7 é um substrato para estes transportadores (Figura 21).

A resistência/supressão ao GC7 mostrada pelas linhagens nocautes do complexo desubiquitinasse Ubp3-Bre5, assim como em Pro1, sugerem que o tratamento com GC7 melhora o crescimento celular de mutantes envolvidos com ribofagia (Figura 21).

Os resultados de baixa toxicidade mostrados pelo inibidor GC7 e comparados com a espermidina, somado ao fato de que estas moléculas apresentaram efeitos contrários em autofagia, sugerem que apesar da semelhança estrutural de ambas moléculas, a qual leva uma potente inibição de eIF5A na presença do GC7, os efeitos celulares do inibidor devem ir além do mimetismo com a poliamina espermidina no panorama celular eucariótico de *S. cerevisiae*.

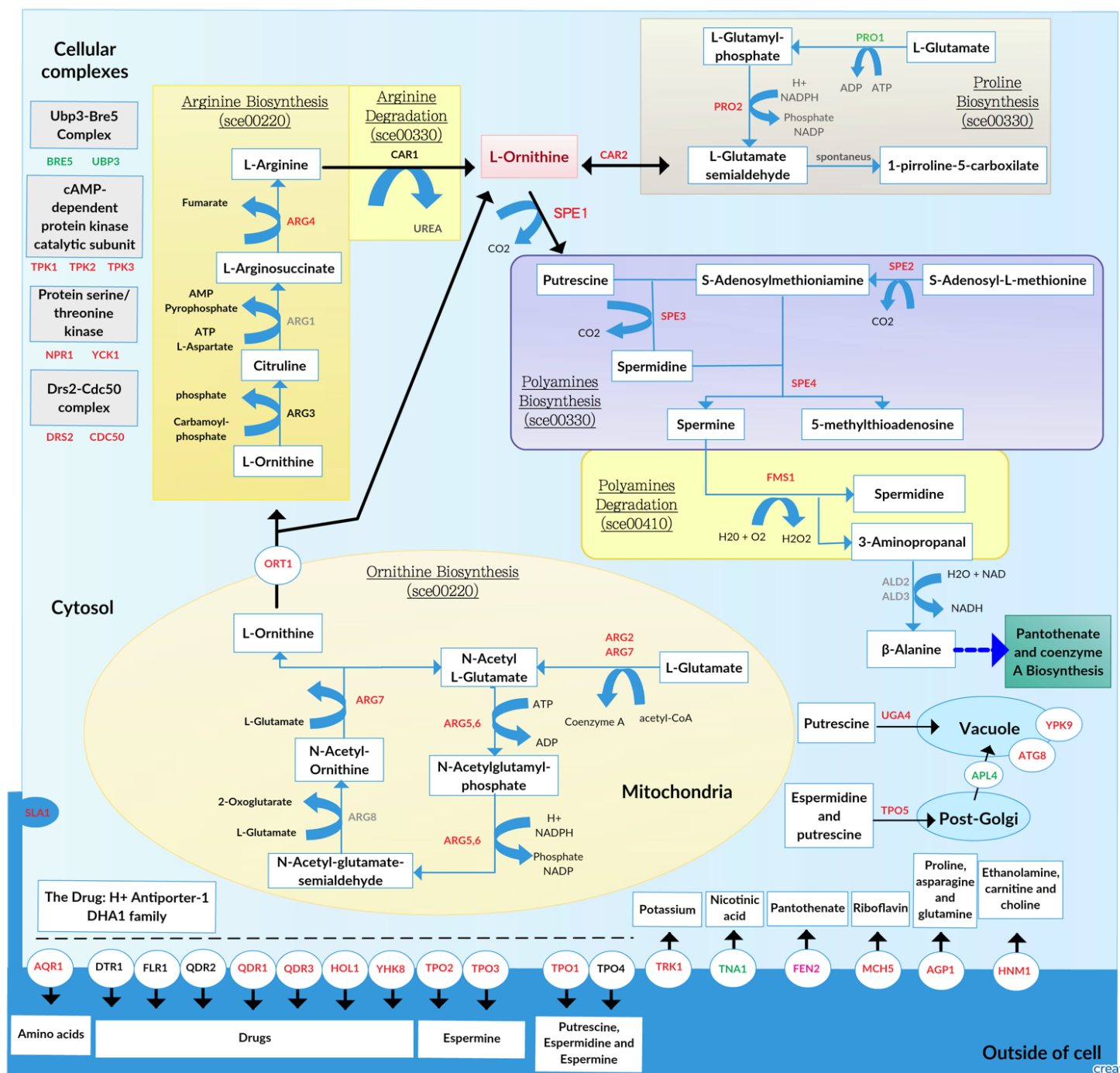


Figura 21. Diagrama dos efeitos celulares identificados para o inibidor de hipusinação GC7 em relação à coleção de nocautes em *S. cerevisiae*. Os nomes dos genes em maiúscula representam genes cujos nocautes: não foram testados (cinza), apresentaram letalidade (roxa), não apresentaram diferença no crescimento na presença de GC7 (preto), apresentaram sensibilidade (vermelho) ou resistência (verde) ao composto GC7 (1-2 mM). A sensibilidade ou resistência foi definida mediante o cálculo dos parâmetros usados neste trabalho (*K* e *tempo de geração*) e sua significância confirmada por *teste-T*, aceitando no mínimo 95% de confiança para *n* = 3. Círculos com fundo branco representam genes relacionados aos diferentes tipos de transporte (transmembrana, vacuolar, endocitose ,etc.). Flechas pretas indicam o sentido do: transporte, vias metabólicas, metabólitos, substâncias ou drogas e compartimentos celulares. Diagrama feito a partir de *creately app* (<https://creately.com>), utilizando a informação registrada em *KEGG PATHWAY Database* (<http://www.kegg.jp>), *SGD* (<https://www.yeastgenome.org>) ou literatura citada nesse trabalho. Os códigos dos mapas metabólicos sce00220, sce00330 e sce00410 mostrados

em parênteses correspondem para *arginine biosynthesis*, *arginine and proline metabolism* e *beta-alanine metabolism* respetivamente para o organismo *Saccharomyces cerevisiae*.

6. REFERENCIAS

ABDEL-SATER, F.; IRAQUI, I.; URRESTARAZU, A.; ANDRÉ, B. The External Amino Acid Signaling Pathway Promotes Activation of Stp1 and Uga35/Dal81 Transcription Factors for Induction of the AGP1 Gene in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, 2004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15126393> >.

AMBERG, D. C.; BURKE, D. J.; STRATHERN, J. N. **Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual**, 2005 Edition. ISBN-13: 978-0879697280 and ISBN-10: 0879697288

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. a; STRUHL, K.; WILEY, C. J.; ALLISON, R. D.; BITTNER, M.; BLACKSHAW, S. **Current Protocols in Molecular Biology**, 2003. ISBN: 047150338X.

BARRETO, L.; CANADELL, D.; PETREZSÉLYOVÁ, S.; NAVARRETE, C.; MAREŠOVÁ, L.; PERÉZ-VALLE, J.; HERRERA, R.; OLIER, I.; GIRALDO, J.; SYCHROVÁ, H.; YENUSH, L.; RAMOS, J.; ARIÑO, J. A genome wide screen for tolerance to cationic drugs reveals genes important for potassium homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryotic Cell**, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21724935> >.

BILSLAND, E.; BEAN, D. M.; DEVANEY, E.; OLIVER, S. G. Yeast-Based High-Throughput Screens to Identify Novel Compounds Active against *Brugia malayi*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26812604> >.

BILSLAND, E.; HULT, M.; BELL, S. D.; SUNNERHAGEN, P.; DOWNS, J. A. The Bre5/Ubp3 ubiquitin protease complex from budding yeast contributes to the cellular response to DNA damage. **DNA Repair**, 2007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17556048> >.

BOK LEE, Y.; AE JOE, Y.; WOLFF, E. C.; DIMITRIADIS, E. K.; HEE PARK, M. Complex formation between deoxyhypusine synthase and its protein substrate, the eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) precursor. **Biochem. J**, v. 340, p. 273-281, 1999. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1220246/> >.

CELIK, A.; BAKER, R.; HE, F.; JACOBSON, A. High-resolution profiling of NMD targets in yeast reveals translational fidelity as a basis for substrate selection. **RNA**, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28209632> >.

CHATTOPADHYAY, M. K.; PARK, M. H.; TABOR, H. Hypusine modification for growth is the major function of spermidine in *Saccharomyces cerevisiae* polyamine auxotrophs grown in limiting spermidine. **Proc Natl Acad Sci USA**. 2007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18451031> >.

COSTANZO, M.; BARYSHNIKOVA, A.; BELLAY, J.; KIM, Y.; SPEAR, E. D.; SEVIER, C. S.; DING, H.; KOH, J. L. Y.; TOUFIGHI, K.; MOSTAFAVI, S.; PRINZ, J.; ST. ONGE, R. P.; VANDERSLUIS, B.; MAKHNEVYCH, T.; VIZEACOMAR, F. J.; ALIZADEH, S.; BAHR, S.; BROST, R. L.; CHEN, Y.; COKOL, M.; DESHPANDE, R.; LI, Z.; LIN, Z.-Y.; LIANG, W.; MARBACK, M.; PAW, J.; SAN LUIS, B.-J.; SHUTERIQUI, E.; TONG, A. H. Y.; VAN DYK, N.; WALLACE, I. M.; WHITNEY, J. A.; WEIRAUCH, M. T.; ZHONG, G.; ZHU, H.; HOURS, W. A.; BRUDNO, M.; RAGIBIZADEH, S.; PAPP, B.; PAL, C.; ROTH, F. P.; GIAEVER, G.; NISLOW, C.; TROYANSKAYA, O. G.; BUSSEY, H.; BADER, G. D.; GINGRAS, A.-C.; MORRIS, Q. D.; KIM, P. M.; KAISER, C. A.; MYERS, C. L.; ANDREWS, B. J.; BOONE, C. The Genetic Landscape of a Cell. **Science**, v. 327, n. 5964, p. 425-431, 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20093466> >.

COSTANZO, M.; VANDERSLUIS, B.; KOCH, E. N.; BARYSHNIKOVA, A.; PONS, C.; TAN, G.; WANG, W.; USAJ, M.; HANCHARD, J.; LEE, S. D.; PELECHANO, V.; STYLES, E. B.; BILLMANN, M.; VAN LEEUWEN, J.; VAN DYK, N.; LIN, Z.-Y.; KUZMIN, E.; NELSON, J.; PIOTROWSKI, J. S.; SRIKUMAR, T.; BAHR, S.; CHEN, Y.; DESHPANDE, R.; KURAT, C. F.; LI, S. C.; LI, Z.; USAJ, M. M.; OKADA, H.; PASCOE, N.; SAN LUIS, B.-J.; SHARIFPOOR, S.; SHUTERI, E.; SIMPKINS, S. W.; SNIDER, J.; SURESH, H. G.; TAN, Y.; ZHU, H.; MALOD-DOGNIN, N.; JANJIC, V.; PRZULJ, N.; TROYANSKAYA, O. G.; STAGLJAR, I.; XIA, T.; OHYA, Y.; GINGRAS, A.-C.; RAUGHT, B.; BOUTROS, M.; STEINMETZ, L. M.; MOORE, C. L.; ROSEBROCK, A. P.; CAUDY, A. A.; MYERS, C. L.; ANDREWS, B.; BOONE, C. A global genetic interaction network maps a wiring diagram of cellular function. **Science**, v. 353, n. 6306, p. aaf1420-aaf1420, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27708008> >.

DE CRAENE, J. O.; SOETENS, O.; ANDRÉ, B. The Npr1 Kinase Controls Biosynthetic and Endocytic Sorting of the Yeast Gap1 Permease. **Journal of Biological Chemistry**, 2001. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11500493> >.

DELORME-AXFORD, E.; GUIMARAES, R. S.; REGGIORI, F.; KLIONSKY, D. J. The yeast *Saccharomyces cerevisiae*: An overview of methods to study autophagy progression. **Methods**, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25526918> >.

DIAS, P. J.; SERET, M.-L.; GOFFEAU, A.; CORREIA, I. S.; BARET, P. V. Evolution of the 12-spanner drug:H⁺ antiporter DHA1 family in hemiascomycetous yeasts. **Omics: a journal of integrative biology**, v. 14, n. 6, p. 701-710, 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21114408> >.

DODGSON, S. E.; SANTAGUIDA, S.; KIM, S.; SHELTER, J.; AMON, A. The pleiotropic deubiquitinase ubp3 confers aneuploidy tolerance. **Genes and Development**, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27807036> >.

DOS SANTOS, S. C.; TEIXEIRA, M. C.; DIAS, P. J.; SÁ-CORREIA, I. MFS transporters required for multidrug/multixenobiotic (MD/MX) resistance in the model yeast: Understanding their physiological function through post-genomic approaches. **Frontiers in Physiology**, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4021133/> >.

EISENBERG, T.; ABDELLATIF, M.; SCHROEDER, S.; PRIMESSNIG, U.; STEKOVIC, S.; PENDL, T.; HARGER, A.; SCHIPKE, J.; ZIMMERMANN, A.; SCHMIDT, A.; TONG, M.; RUCKENSTUHL, C.; DAMMBRUECK, C.; GROSS, A. S.; HERBST, V.; MAGNES, C.; TRAUSINGER, G.; NARATH, S.; MEINITZER, A.; HU, Z.; KIRSCH, A.; ELLER, K.; CARMONA-GUTIERREZ, D.; BÜTTNER, S.; PIETROCOLA, F.; KNITTELFELDER, O.; SCHREPFER, E.; ROCKENFELLER, P.; SIMONINI, C.; RAHN, A.; HORSCH, M.; MORETH, K.; BECKERS, J.; FUCHS, H.; GAILUS-DURNER, V.; NEFF, F.; JANIK, D.; RATHKOLB, B.; ROZMAN, J.; DE ANGELIS, M. H.; MOUSTAFA, T.; HAEMMERLE, G.; MAYR, M.; WILLEIT, P.; VON FRIELING-SALEWSKY, M.; PIESKE, B.; SCORRANO, L.; PIEBER, T.; PECHLANER, R.; WILLEIT, J.; SIGRIST, S. J.; LINKE, W. A.; MÜHLFELD, C.; SADOSHIMA, J.; DENGJEL, J.; KIECHL, S.; KROEMER, G.; SEDEJ, S.; MADEO, F. Cardioprotection and lifespan extension by the natural polyamine spermidine. **Nature Medicine**, v. 22, n. 12, p. 1428-1438, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27841876> >.

EISENBERG, T.; KNAUER, H.; SCHAUER, A.; BÜTTNER, S.; RUCKENSTUHL, C.; CARMONA-GUTIERREZ, D.; RING, J.; SCHROEDER, S.; MAGNES, C.; ANTONACCI, L.; FUSSI, H.; DESZCZ, L.; HARTL, R.; SCHRAML, E.; CRIOLLO, A.; MEGALOU, E.; WEISKOPF, D.; LAUN, P.; HEEREN, G.; BREITENBACH, M.; GRUBECK-LOEBENSTEIN, B.; HERKER, E.; FAHRENKROG, B.; FRÖHLICH, K.-U.; SINNER, F.; TAVERNARAKIS, N.; MINOIS, N.; KROEMER, G.; MADEO, F. Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. **Nature Cell Biology**, 2009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19801973> >.

GALVÃO, F. C.; ROSSI, D.; SILVEIRA, W. da S.; VALENTINI, S. R.; ZANELLI, C. F. The Deoxyhypusine Synthase Mutant dys1-1 Reveals the Association of eIF5A and Asc1 with Cell Wall Integrity. **PLoS ONE**, 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3613415/> >.

GENTZ, P. M.; BLATCH, G. L.; DORRINGTON, R. A. Dimerization of the yeast eukaryotic translation initiation factor 5A requires hypusine and is RNA dependent. **FEBS Journal**, 2009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19120453> >.

GITLER, A. D.; CHESI, A.; GEDDIE, M. L.; STRATHEARN, K. E.; HAMAMICHI, S.; HILL, K. J.; CALDWELL, K. A.; CALDWELL, G. A.; COOPER, A. A.; ROCHET, J. C.; LINDQUIST, S. α -Synuclein is part of a diverse and highly conserved interaction network that includes PARK9 and manganese toxicity. **Nature Genetics**, 2009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19182805> >.

GUTHRIE, C.; FINK, G. R. Guide to yeast genetics and molecular biology. In: **Methods in Enzymology**, Vol. 169. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2005781> >.

HARRISON, R.; PAPP, B.; PAL, C.; OLIVER, S. G.; DELNERI, D. Plasticity of genetic interactions in metabolic networks of yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1892960/> >.

HASENBRINK, G.; SCHWARZER, S.; KOLACNA, L.; LUDWIG, J.; SYCHROVA, H.; LICHTENBERG-FRATÉ, H. Analysis of the mKir2.1 channel activity in potassium influx defective *Saccharomyces cerevisiae* strains determined as changes in growth characteristics. **FEBS Letters**, 2005. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15757667> >.

HOON LEE, C.; HEE PARK, M. Human deoxyhypusine synthase : interrelationship between binding of NAD and substrates. **Biochem. J**, v. 352, p. 851-857, 2000. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1221526/> >.

HOON LEE, C.; UM, P. Y.; HEE PARK, M. Structure–function studies of human deoxyhypusine synthase : identification of amino acid residues critical for the binding of spermidine and NAD. **Biochem. J**, v. 355, p. 841-849, 2001. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11311149> >.

HOWARD J. P., HUTTON J. L., OLSON J. M. AND PAYNE G. S. Sla1p Serves as the Targeting Signal Recognition Factor for NPFX_(1,2) D-Mediated. **JCB**. 2002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11940605> >.

IGARASHI, K.; KASHIWAGI, K. Characteristics of cellular polyamine transport in prokaryotes and eukaryotes **Plant Physiology and Biochemistry**, 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20159658> >.

JANKE, C.; MAGIERA, M. M.; RATHFELDER, N.; TAXIS, C.; REBER, S.; MAEKAWA, H.; MORENO-BORCHART, A.; DOENGES, G.; SCHWOB, E.; SCHIEBEL, E.; KNOP, M. A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: New fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. **Yeast**, 2004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15334558> >.

KAINZ, K.; TADIC, J.; ZIMMERMANN, A.; PENDL, T.; CARMONA-GUTIERREZ, D.; RUCKENSTUHL, C.; EISENBERG, T.; MADEO, F. Methods to Assess Autophagy and Chronological Aging in Yeast. In: **Methods in Enzymology**, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28237110> >.

KRAFT, C.; DEPLAZES, A.; SOHRMANN, M.; PETER, M. Mature ribosomes are selectively degraded upon starvation by an autophagy pathway requiring the Ubp3p/Bre5p ubiquitin protease. **Nature Cell Biology**, 2008. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18391941> >.

KURIAN, L.; PALANIMURUGAN, R.; GÖDDERZ, D.; DOHMEN, R. J. Polyamine sensing by nascent ornithine decarboxylase antizyme stimulates decoding of its mRNA. **Nature**, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21900894> >.

KUZMIN, ELENA; SHARIFPOOR, SARA; BARYSHNIKOVA, ANASTASIA; COSTANZO, MICHAEL; MYERS, CHAD L.; ANDREWS, BRENDA J.; BOONE, C. Synthetic Genetic Array Analysis for Global Mapping of Genetic Networks in Yeast. In: **Yeast Genetics. Methods and Protocols**. 1205p. 303-328. 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25213244> >.

LANDAU, G.; BERCOVICH, Z.; PARK, M. H.; KAHANA, C. The role of polyamines in supporting growth of mammalian cells is mediated through their requirement for translation initiation and elongation. **Journal of Biological Chemistry**, 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20181941> >.

LANDRY, J.; STERNGLANZ, R. Yeast Fms1 is a FAD-utilizing polyamine oxidase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2003. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12670477> >.

LANTHALER, K.; BILSLAND, E.; DOBSON, P. D.; MOSS, H. J.; PIR, P.; KELL, D. B.; OLIVER, S. G. Genome-wide assessment of the carriers involved in the cellular uptake of drugs: a model system in yeast. **BMC biology**, v. 9, p. 70, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22023736> >.

LEE, A. Y.; ST.ONGE, R. P.; PROCTOR, M. J.; WALLACE, I. M.; NILE, A. H.; SPAGNUOLO, P. A.; JITKOVA, Y.; GRONDA, M.; WU, Y.; KIM, M. K.; CHEUNG-ONG, K.; TORRES, N. P.; SPEAR, E. D.; HAN, M. K. L.; SCHLECHT, U.; SURESH, S.; DUBY, G.; HEISLER, L. E.; SURENDRA, A.; FUNG, E.; URBANUS, M. L.; GEBBIA, M.; LISSINA, E.; MIRANDA, M.; CHIANG, J. H.; APARICIO, A. M.; ZEGHOUF, M.; DAVIS, R. W.; CHERFILS, J.; BOUTRY, M.; KAISER, C. A.; CUMMINS, C. L.; TRIMBLE, W. S.; BROWN, G. W.; SCHIMMER, A. D.; BANKAITIS, V. A.; NISLOW, C.; BADER, G. D.; GIAEVER, G. Mapping the Cellular Response to Small Molecules Using Chemogenomic Fitness Signatures. **Science**, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24723613> >.

MA, Y.; TAKEUCHI, M.; SUGIURA, R.; SIO, S. O.; KUNO, T. Deletion mutants of AP-1 adaptin subunits display distinct phenotypes in fission yeast. **Genes to Cells**, 2009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19624755> >.

MACGURN, J. A.; HSU, P. C.; SMOLKA, M. B.; EMR, S. D. TORC1 regulates endocytosis via npr1-mediated phosphoinhibition of a ubiquitin ligase adaptor. **Cell**, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22118465> >.

MAIER, B.; OGIHARA, T.; TRACE, A. P.; TERSEY, S. A.; ROBBINS, R. D.; CHAKRABARTI, S. K.; NUNEMAKER, C. S.; STULL, N. D.; TAYLOR, C. A.; THOMPSON, J. E.; DONDERO, R. S.; LEWIS, E. C.; DINARELLO, C. A.; NADLER, J. L.; MIRMIRA, R. G. The unique hypusine modification of eIF5A promotes islet cell inflammation and dysfunction in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 6, p. 2156-2170, 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20501948> >.

MAIER, B.; TERSEY, S. A.; MIRMIRA, R. G. Hypusine: a new target for therapeutic intervention in diabetic inflammation. **Discovery medicine**, v. 10, n. 50, p. 18-23, 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20670594> >.

MANDAL S, MANDAL A, PARK MH Depletion of the polyamines spermidine and spermine by overexpression of spermidine/spermine N -acetyltransferase 1 (SAT1) leads to mitochondria-mediated apoptosis in mammalian **CELLS BIOCHEM J** (2015) 468:435-447 DOI:10.1042/BJ20150168. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25849284> >.

MANNHAUPT, G.; POHLENZ, H. -D; SEEFLUTH, A. K.; PILZ, U.; FELDMANN, H. Yeast homoserine kinase: Characteristics of the corresponding gene, THR1, and the purified enzyme, and evolutionary relationships with other enzymes of threonine metabolism. **European Journal of Biochemistry**, 1990. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2165904> >.

MARULLO, P.; MANSOUR, C.; DUFOUR, M.; ALBERTIN, W.; SICARD, D.; BELY, M.;

DUBOURDIEU, D. Genetic improvement of thermo-tolerance in wine *Saccharomyces cerevisiae* strains by a backcross approach. **FEMS Yeast Research**, 2009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19758333> >.

MELNIKOV, S.; MAILLIOT, J.; SHIN, B. S.; RIGGER, L.; YUSUPOVA, G.; MICURA, R.; DEVER, T. E.; YUSUPOV, M. Crystal Structure of Hypusine-Containing Translation Factor eIF5A Bound to a Rotated Eukaryotic Ribosome. **Journal of Molecular Biology**, v. 428, n. 18, p. 3570-3576, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27196944> >.

MISU, K.; FUJIMURA-KAMADA, K.; UEDA, T.; NAKANO, A.; KATOH, H.; TANAKA, K. Cdc50p, a Conserved Endosomal Membrane Protein, Controls Polarized Growth in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Biology of the Cell**, v. 14, p. 730-747, 2003. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC150004/> >.

MIYAMOTO, S.; KASHIWAGI, K.; ITO, K.; WATANABE, S.; IGARASHI, K. Estimation of polyamine distribution and polyamine stimulation of protein synthesis in *Escherichia coli*. **Archives of biochemistry and biophysics**, 1993. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7678729> >.

MORSELLI, E.; MARIÑO, G.; BENNETZEN, M. V.; EISENBERG, T.; MEGALOU, E.; SCHROEDER, S.; CABRERA, S.; BÉNIT, P.; RUSTIN, P.; CRIOLLO, A.; KEPP, O.; GALLUZZI, L.; SHEN, S.; MALIK, S. A.; MAIURI, M. C.; HORIO, Y.; LÓPEZ-OTÍN, C.; ANDERSEN, J. S.; TAVERNARAKIS, N.; MADEO, F.; KROEMER, G. Spermidine and resveratrol induce autophagy by distinct pathways converging on the acetylproteome. **Journal of Cell Biology**, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21339330> >.

MOUNCE, B. C.; OLSEN, M. E.; VIGNUZZI, M.; CONNOR, J. H. Polyamines and Their Role in Virus Infection. v. 81, n. 4, p. 1-12, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28904024> >.

MÜLLER, M.; KÖTTER, P.; BEHRENDT, C.; WALTER, E.; SCHECKHUBER, C. Q.; ENTIAN, K. D.; REICHERT, A. S. Synthetic Quantitative Array Technology Identifies the Ubp3-Bre5 Deubiquitinase Complex as a Negative Regulator of Mitophagy. **Cell Reports**, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25704822> >.

NAKANISHI, S.; CLEVELAND, J. L. Targeting the polyamine-hypusine circuit for the prevention and treatment of cancer **Amino Acids**, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27357307> >.

NISHIDA-AOKI, N.; MORI, H.; KURODA, K.; UEDA, M. Activation of the mitochondrial signaling pathway in response to organic solvent stress in yeast. **Current Genetics**, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25487302> >.

NODA, T.; KLIONSKY, D. J. Chapter 3 The Quantitative Pho8Δ60 Assay of Nonspecific Autophagy. **Methods in Enzymology**, 2008. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19185711> >.

O'DONNELL A. F., APFFEL A., GARDNER R. G. AND CYERT M. S. α -Arrestins Aly1 and Aly2 Regulate Intracellular Trafficking in Response to Nutrient Signaling. **Molecular Biology of the Cell** (2010). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20739461> >.

OLIVERIO, S.; CORAZZARI, M.; SESTITO, C.; PIREDDA, L.; IPPOLITO, G.; PIACENTINI, M. The spermidine analogue GC7 (N1-guanyl-1,7-diaminoheptane) induces autophagy through a mechanism not involving the hypusination of eIF5A. **Amino Acids**, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25218134> >.

OLZHAUSEN, J.; SCHÜBBE, S.; SCHÜLLER, H. J. Genetic analysis of coenzyme A biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Identification of a conditional mutation in the pantothenate kinase gene CAB1. **Current Genetics**, 2009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19266201> >.

OSSAREH-NAZARI, B.; BONIZEC, M.; COHEN, M.; DOKUDOVSKAYA, S.; DELALANDE, F.; SCHAEFFER, C.; DORSSELAER, A. Van; DARGEMONT, C. Cdc48 and Ufd3, new partners of the ubiquitin protease Ubp3, are required for ribophagy. **EMBO reports**, v. 11, p. 548-55474, 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2897114/> >.

OSSAREH-NAZARI, B.; NIÑO, C. A.; BENGTSON, M. H.; LEE, J. W.; JOAZEIRO, C. A. P.; DARGEMONT, C. Ubiquitylation by the Ltn1 E3 ligase protects 60S ribosomes from starvation-induced selective autophagy. **Journal of Cell Biology**, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24616224> >.

MATTIAS JANSSON, B; MALANDRIN, L.; JOHANSSON, H. E. Cell Cycle Arrest in Archaea by the Hypusination Inhibitor N1-guanyl-1,7-diamine-heptane. **JOURNAL OF BACTERIOLOGY**, v. 182, n. 4, p. 1158-1161, 2000. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10648545> >.

PANEK, H. R.; STEPP, J. D.; ENGLE, H. M.; MARKS, K. M.; TAN, P. K.; LEMMON, S. K.; ROBINSON, L. C. Suppressors of YCK-encoded yeast casein kinase 1 deficiency define the four subunits of a novel clathrin AP-like complex. **EMBO Journal**, 1997. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9250663> >.

PARK, M. H. The post-translational synthesis of a polyamine-derived amino acid, hypusine, in the eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A). **Journal of Biochemistry**, 2006. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16452303> >.

PARK, M. H.; LEE, Y. B.; JOE, Y. A. Hypusine is essential for eukaryotic cell proliferation. **NeuroSignals**, v. 6, n. 3, p. 115-123, 1997. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9285094> >.

PARK, M. H.; NISHIMURA, K.; ZANELLI, C. F.; VALENTINI, S. R. Functional significance of eIF5A and its hypusine modification in eukaryotes. In: **Amino Acids**, 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19997760> >.

PARSONS, A. B.; LOPEZ, A.; GIVONI, I. E.; WILLIAMS, D. E.; GRAY, C. A.; PORTER, J.; CHUA, G.; SOPKO, R.; BROST, R. L.; HO, C. H.; WANG, J.; KETELA, T.; BRENNER, C.; BRILL, J. A.; FERNANDEZ, G. E.; LORENZ, T. C.; PAYNE, G. S.; ISHIHARA, S.; OHYA, Y.; ANDREWS, B.; HUGHES, T. R.; FREY, B. J.; GRAHAM, T. R.; ANDERSEN, R. J.; BOONE, C. Exploring the Mode-of-Action of Bioactive Compounds by Chemical-Genetic Profiling in Yeast. **Cell**, v. 126, n. 3, p. 611-625, 2006. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16901791> >.

PATEL, P. H.; COSTA-MATTIOLI, M.; SCHULZE, K. L.; BELLEN, H. J. The Drosophila deoxyhypusine hydroxylase homologue nero and its target eIF5A are required for cell growth and the regulation of autophagy. **Journal of Cell Biology**, 2009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19546244/> >.

ALMEIDA JUNIOR, O.P; TOLEDO, T. R.; ROSSI, D.; DE BARROS ROSSETTO, D.; WATANABE, T. F.; GALVÃO, F. C.; MEDEIROS, A. I.; ZANELLI, C. F.; VALENTINI, S. R. Hypusine Modification of the Ribosome-binding Protein eIF5A, a Target for New Anti-Inflammatory Drugs: Understanding the Action of the Inhibitor GC7 on a Murine Macrophage Cell Line. **Current Pharmaceutical Design**. 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23701550> >.

PENNACCHIETTI, E.; LAMMENS, T. M.; CAPITANI, G.; FRANSSEN, M. C. R.; JOHN, R. A.; BOSSA, F.; DE BIASE, D. Mutation of His465 alters the pH-dependent spectroscopic properties of Escherichia coli glutamate decarboxylase and broadens the range of its activity toward more alkaline pH. **Journal of Biological Chemistry**, 2009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2797229/> >.

PEREZ-LEAL, O.; MERALI, S. Regulation of polyamine metabolism by translational control.

Amino Acids, 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21811825> >.

PIOTROWSKI, J. S.; LI, S. C.; DESHPANDE, R.; SIMPKINS, S. W.; NELSON, J.; YASHIRODA, Y.; BARBER, J. M.; SAFIZADEH, H.; WILSON, E.; OKADA, H.; GEBRE, A. A.; KUBO, K.; TORRES, N. P.; LEBLANC, M. A.; ANDRUSIAK, K.; OKAMOTO, R.; YOSHIMURA, M.; DERANGO-ADEM, E.; VAN LEEUWEN, J.; SHIRAHIGE, K.; BARYSHNIKOVA, A.; BROWN, G. W.; HIRANO, H.; COSTANZO, M.; ANDREWS, B.; OHYA, Y.; OSADA, H.; YOSHIDA, M.; MYERS, C. L.; BOONE, C. Functional annotation of chemical libraries across diverse biological processes. **Nature Chemical Biology**, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28759014> >.

RAMOS, C.; CALDERÓN, I. L. Biochemical evidence that the *Saccharomyces cerevisiae* THR4 gene encodes threonine synthetase. **FEBS Letters**, 1994. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8082795> >.

ROBBINS, R. D.; TERSEY, S. A.; OGIHARA, T.; GUPTA, D.; FARB, T. B.; FICORILLI, J.; BOKVIST, K.; MAIER, B.; MIRMIRA, R. G. Inhibition of deoxyhypusine synthase enhances islet β cell function and survival in the setting of endoplasmic reticulum stress and type 2 diabetes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 51, p. 39943-39952, 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20956533> >.

ROGERS, B.; DECOTTIGNIES, A.; KOLACZKOWSKI, M.; CARVAJAL, E.; BALZI, E.; GOFFEAU, A. The Pleiotropic Drug ABC Transporters from *Saccharomyces cerevisiae* JMMB Symposium. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.**, v. 3, n. 2, p. 207-214, 2001. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11321575> >.

RSTUDIO TEAM, -. RStudio: Integrated Development for R. **[Online] RStudio, Inc., Boston, MA URL <http://www.rstudio.com>**, p. RStudio, Inc., Boston, MA, 2016. Disponível em: < <https://www.rstudio.com/products/rstudio/download/> >.

RUIZ, A.; DEL CARMEN RUIZ, M.; SÁNCHEZ-GARRIDO, M. A.; ARIÑO, J.; RAMOS, J. The Ppz protein phosphatases regulate Trk-independent potassium influx in yeast. **FEBS Letters**, 2004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15581616> >.

SAITO, K. Cdc50p, a Protein Required for Polarized Growth, Associates with the Drs2p P-Type ATPase Implicated in Phospholipid Translocation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Biology of the Cell**, 2004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15090616> >.

SAKANE, H.; YAMAMOTO, T.; TANAKA, K. The Functional Relationship between the Cdc50p-Drs2p Putative Aminophospholipid Translocase and the Arf GAP Gcs1p in Vesicle Formation in the Retrieval Pathway from Yeast Early Endosomes to the TGN. **CELL STRUCTURE AND FUNCTION**, v. 31, p. 87-108, 2006. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17062999> >.

SCHMIDT, A.; BECK, T.; KOLLER, A.; KUNZ, J.; HALL, M. N. The TOR nutrient signalling pathway phosphorylates NPR1 and inhibits turnover of the tryptophan permease. **EMBO Journal**, 1998. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1171040/> >.

SCHMIDT, K.; WOLFE, D. M.; STILLER, B.; PEARCE, D. A. Cd²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺ and Se²⁺ toxicity to *Saccharomyces cerevisiae* lacking YPK9p the orthologue of human ATP13A2. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19345671> >.

SPROUFFSKE, K.; WAGNER, A. Growthcurver: an R package for obtaining interpretable metrics from microbial growth curves. **BMC Bioinformatics**, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27094401> >.

STAGE-ZIMMERMANN, T.; SCHMIDT, U.; SILVER, P. A.; YAMAMOTO, K. R. Factors Affecting Nuclear Export of the 60S Ribosomal Subunit In Vivo. **Molecular Biology of the Cell**, v. 11, p. 3777-3789, 2000. Disponível em: <

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC15036/> >.

SZAPPANOS, B.; KOVÁCS, K.; SZAMECZ, B.; HONTI, F.; COSTANZO, M.; BARYSHNIKOVA, A.; GELIUS-DIETRICH, G.; LERCHER, M. J.; JELASITY, M.; MYERS, C. L.; ANDREWS, B. J.; BOONE, C.; OLIVER, S. G.; PÁL, C.; PAPP, B. An integrated approach to characterize genetic interaction networks in yeast metabolism. In: **Nature Genetics**, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21623372> >.

TANAKA, N.; MUKAI, Y. Yeast Cyc8p and Tup1p proteins function as coactivators for transcription of Stp1/2p-dependent amino acid transporter genes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26546823> >.

TATEHASHI, Y.; WATANABE, D.; TAKAGI, H. gamma-Glutamyl kinase is involved in selective autophagy of ribosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, v. 590, p. 2906-2914, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27442630> >.

TEIXEIRA, M. C.; CABRITO, T. R.; HANIF, Z. M.; VARGAS, R. C.; TENREIRO, S.; SÁ-CORREIA, I. Yeast response and tolerance to polyamine toxicity involving the drug: H⁺ + antiporter Qdr3 and the transcription factors Yap1 and Gcn4. **Microbiology**, 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21148207> >.

TORGGLER, R.; PAPINSKI, D.; KRAFT, C. Assays to Monitor Autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. **Cells**, v. 6, n. 3, p. 23, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28703742> >.

TUMUSIIME, S.; ZHANG, C.; OVERSTREET, M. S.; LIU, Z. Differential regulation of transcription factors Stp1 and Stp2 in the Ssy1-Ptr3-Ssy5 amino acid sensing pathway. **Journal of Biological Chemistry**, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21127045> >.

TYLER, J. K.; JOHNSON, J. E. The role of autophagy in the regulation of yeast life span. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, 2018. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29363766> >.

UMLAND, T. C.; WOLFF, E. C.; PARK, M. H.; DAVIES, D. R. A new crystal structure of deoxyhypusine synthase reveals the configuration of the active enzyme and of an enzyme·NAD·inhibitor ternary complex. **Journal of Biological Chemistry**, 2004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15100216> >.

USAJ, M.; TAN, Y.; WANG, W.; VANDERSLUIS, B.; ZOU, A.; MYERS, C. L.; COSTANZO, M.; ANDREWS, B.; BOONE, C. TheCellMap.org: A Web-Accessible Database for Visualizing and Mining the Global Yeast Genetic Interaction Network. **G3:Genes|Genomes|Genetics**, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28325812> >.

WANG, X.; JIANG, R.; CUI, E. H.; FENG, W. M.; GUO, H. H.; GU, D. H.; TANG, C. W.; XUE, T.; BAO, Y. N1-guanyl-1,7-diaminoheptane enhances the chemosensitivity of NSCLC cells to cetuximab through inhibition of eukaryotic translation initiation factor 5A2 activation. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27097942> >.

WARREN D. T., ANDREWS P. D., GOURLAY C. W. AND AYSCOUGH K. R. Sla1p couples the yeast endocytic machinery to proteins regulating actin dynamics. **Journal of Cell Science**. (2002). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11950888> >.

WATANABE, S. I.; KUSAMA-EGUCHI, K.; KOBAYASHI, H.; IGARASHI, K. Estimation of polyamine binding to macromolecules and ATP in bovine lymphocytes and rat liver. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 31, p. 20803-20809, 1991. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1718969> >.

WHITE, W. H.; GUNYUZLU, P. L.; TOYN, J. H. *Saccharomyces cerevisiae* Is Capable of de

Novo Pantothenic Acid Biosynthesis Involving a Novel Pathway of beta-Alanine Production from Spermine. **Journal of Biological Chemistry**, 2001. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11154694> >.

WICKHAM, H.; KALICINSKI, M.; VALERY, K.; LEITIENNE, C.; COLBERT, B.; HOERL, D. Read Excel Files. **Packages R CRAN**, p. 1-4, 2016. Disponível em: < <https://cran.r-project.org/web/packages/readxl/index.html> >.

WINSTON, F.; DOLLARD, C.; RICUPERO; HOVASSE, S. L. Construction of a set of convenient *saccharomyces cerevisiae* strains that are isogenic to S288C. **Yeast**, 1995. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7762301> >.

ZHANG, W.; DU, G.; ZHOU, J.; CHEN, J. Regulation of Sensing, Transportation, and Catabolism of Nitrogen Sources in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Environ. Microbiol.** 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3910993/> >.

YAO M, YUN H, LIU Y, CHEN2 W, WANG W. N1-guanyl-1, 7-diaminoheptane enhances the sensitivity of pancreatic ductal adenocarcinoma cells to gemcitabine via the inhibition of eukaryotic translation initiation factor 5A2. **EXPERIMENTAL AND THERAPEUTIC MEDICINE**. (2017). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5609100/> >.

ANEXO I

Output do pacote *growthcurver.R* para todas as curvas de crescimento analisadas neste trabalho e cujos resultados estão na Tabela 2. “nt” ou “t” correspondem ao não tratamento ou tratamento com GC7. Os nomes dos genes são mostrados em minúscula e representam as linhagens nocautes para cada gene. As colunas 2 e 3 correspondem com os diferentes parâmetros obtidos pelo pacote como seguem:

k: *carrying capacity parameter.*

t-gen: *The maximum tempo de geração, obtained by evaluating the the unrestrained growth of the population with growth rate r,*

Significância estadística foi cerificada mediante *t-student test* para $n=3$, comparando as linhagens na condição sem tratar e tratadas com as diferentes concentrações de GC7; *p-value* é mostrado para cada parâmetro e linhagem.

sample	k	t_gen	Linhagem/GC7	Average(k)	Average(t_gen)	Linhagem	p-value(k)	p-value(t_gen)
wtnt1	0,9956	0,5367						
wtnt2	1,0248	0,5365	WT 0mM	1,0111	0,5364	WT	0,1148	0,2522
wtnt3	1,0129	0,5361						
wtt1	0,9662	0,5746						
wtt2	0,8683	0,5317	WT 1mM	0,9101	0,5571			
wtt3	0,8957	0,5649						
sla1 nt1	1,0584	0,6372						
sla1 nt2	0,9817	0,6511	$\Delta sla1$ 0mM	1,0124	0,6404	$\Delta sla1$	0,0251	0,0614
sla1 nt3	0,9971	0,6328						
sla1 t1	0,6207	0,7570						
sla1 t2	0,5847	0,6967	$\Delta sla1$ 1mM	0,6520	0,7229			
sla1 t3	0,7506	0,7150						
drs2 nt1	0,7799	0,8352						
drs2 nt2	0,6456	1,3052	$\Delta drs2$ 0mM	0,6834	1,1233	$\Delta drs2$	0,5134	0,0493
drs2 nt3	0,6248	1,2294						
drs2 t1	0,9735	2,4584						
drs2 t2	0,4095	2,3031	$\Delta drs2$ 1mM	0,5535	2,2477			
drs2 t3	0,2774	1,9816						
ssz1 nt1	0,7236	1,4174						
ssz1 nt2	0,4061	1,0419	$\Delta ssz1$ 0mM	0,5564	1,2558	$\Delta ssz1$	0,0635	0,0446
ssz1 nt3	0,5395	1,3081						
ssz1 t1	0,1639	1,9385						
ssz1 t2	0,1913	2,1069	$\Delta ssz1$ 1mM	0,1786	2,0036			
ssz1 t3	0,1807	1,9654						

stb5 nt1	0,8731	0,5576						
stb5 nt2	0,8170	0,6677	$\Delta stb5$ 0mM	0,8535	0,5971	$\Delta stb5$	0,0573	0,0097
stb5 nt3	0,8704	0,5661						
stb5 t1	0,7769	0,7724						
stb5 t2	0,5664	0,8207	$\Delta stb5$ 1mM	0,6733	0,7784			
stb5 t3	0,6767	0,7423						
tpo2 nt1	0,9938	0,6147						
tpo2 nt2	0,8830	0,5640	$\Delta tpo2$ 0mM	0,9685	0,5719	$\Delta tpo2$	0,0466	0,0052
tpo2 nt3	1,0286	0,5369						
tpo2 t1	0,7198	0,7281						
tpo2 t2	0,7166	0,6791	$\Delta tpo2$ 1mM	0,7776	0,6951			
tpo2 t3	0,8964	0,6780						
tpo4 nt1	1,0590	0,5726						
tpo4 nt2	1,0190	0,5843	$\Delta tpo4$ 0mM	1,0247	0,5777	$\Delta tpo4$	0,1529	0,1161
tpo4 nt3	0,9962	0,5761						
tpo4 t1	0,7391	0,8018						
tpo4 t2	0,8131	0,6826	$\Delta tpo4$ 1mM	0,8379	0,7096			
tpo4 t3	0,9615	0,6445						
uga4 nt1	0,8815	0,5708						
uga4 nt2	0,8168	0,5485	$\Delta uga4$ 0mM	0,8583	0,5565	$\Delta uga4$	0,1866	0,0064
uga4 nt3	0,8767	0,5502						
uga4 t1	0,6876	0,6759						
uga4 t2	0,8159	0,6861	$\Delta uga4$ 1mM	0,7129	0,6815			
uga4 t3	0,6353	0,6824						
fms1 nt1	1,0527	0,4678						
fms1 nt2	1,0618	0,4247	$\Delta fms1$ 0mM	1,0568	0,4392	$\Delta fms1$	0,0019	0,2313
fms1 nt3	1,0560	0,4251						
fms1 t1	0,9352	0,4658						
fms1 t2	0,9337	0,4700	$\Delta fms1$ 1mM	0,9382	0,4626			
fms1 t3	0,9457	0,4521						
car1 nt1	0,9436	0,5412						
car1 nt2	0,9442	0,5177	$\Delta car1$ 0mM	0,9426	0,5298	$\Delta car1$	0,0576	0,0898
car1 nt3	0,9400	0,5305						
car1 t1	0,8839	0,5745						
car1 t2	0,8769	0,6165	$\Delta car1$ 1mM	0,8917	0,5907			
car1 t3	0,9143	0,5811						
car2 nt1	0,9274	0,5441						
car2 nt2	0,9522	0,5665	$\Delta car2$ 0mM	0,9276	0,5509	$\Delta car2$	0,2872	0,0063
car2 nt3	0,9032	0,5421						
car2 t1	0,9340	0,6064						
car2 t2	0,8827	0,6220	$\Delta car2$ 1mM	0,8960	0,6145			
car2 t3	0,8713	0,6150						
tpo3 nt1	0,8648	0,5684						

tpo3 nt2	0,8300	0,5592	$\triangle tpo3\ 0mM$	0,8284	0,5658	$\triangle tpo3$	0,3263	0,0350
tpo3 nt3	0,7905	0,5698						
tpo3 t1	0,7624	0,6680						
tpo3 t2	0,7342	0,6091	$\triangle tpo3\ 1mM$	0,7726	0,6405			
tpo3 t3	0,8212	0,6444						
tpo5 nt1	0,8543	0,6004						
tpo5 nt2	0,8843	0,6003	$\triangle tpo5\ 0mM$	0,8546	0,5946	$\triangle tpo5$	0,0961	0,0087
tpo5 nt3	0,8253	0,5830						
tpo5 t1	0,8160	0,6746						
tpo5 t2	0,8045	0,7028	$\triangle tpo5\ 1mM$	0,8064	0,6854			
tpo5 t3	0,7987	0,6787						
oaz1 nt1	0,8279	0,5924						
oaz1 nt2	0,9075	0,5800	$\triangle oaz1\ 0mM$	0,8380	0,5933	$\triangle oaz1$	0,8474	0,1646
oaz1 nt3	0,7786	0,6076						
oaz1 t1	0,8665	0,6365						
oaz1 t2	0,8101	0,7124	$\triangle oaz1\ 1mM$	0,8284	0,6622			
oaz1 t3	0,8086	0,6377						
ptk2 nt1	1,1099	0,5729						
ptk2 nt2	1,1182	0,5467	$\triangle ptk2\ 0mM$	1,1138	0,5936	$\triangle ptk2$	0,5232	0,9069
ptk2 nt3	1,1131	0,6612						
ptk2 t1	1,1138	0,5638						
ptk2 t2	1,1114	0,6891	$\triangle ptk2\ 1mM$	1,1205	0,6031			
ptk2 t3	1,1364	0,5563						
ptk1 nt1	1,0125	1,1425						
ptk1 nt2	1,1842	0,7365	$\triangle ptk1\ 0mM$	1,1280	0,8487	$\triangle ptk1$	0,9949	0,6151
ptk1 nt3	1,1873	0,6671						
ptk1 t1	1,1635	1,1092						
ptk1 t2	1,1736	0,9353	$\triangle ptk1\ 1mM$	1,1286	0,8940			
ptk1 t3	1,0488	0,6374						
spe1nt1	1,0315	1,1264						
spe1nt2	0,9772	1,0019	$\triangle spe1\ 0mM$	1,0056	1,0181	$\triangle spe1$	0,0009	0,0005
spe1nt3	1,0082	0,9261						
spe1t1	0,2125	1,3668						
spe1t2	0,2330	1,2337	$\triangle spe1\ 1mM$	0,2333	1,2591			
spe1t3	0,2543	1,1769						
spe2nt1	0,9605	0,6358						
spe2nt2	0,9333	0,9986	$\triangle spe2\ 0mM$	0,9334	0,7571	$\triangle spe2$	0,4565	0,1327
spe2nt3	0,9064	0,6368						
spe2t1	0,8944	0,9651						
spe2t2	0,8349	1,2250	$\triangle spe2\ 1mM$	0,8936	1,2207			
spe2t3	0,9515	1,4719						
spe3nt1	0,9550	0,6990						
spe3nt2	0,8541	0,7792	$\triangle spe3\ 0mM$	0,8929	0,7496	$\triangle spe3$	0,4390	0,0086

spe3nt3	0,8697	0,7705						
spe3t1	0,2914	1,6338						
spe3t2	0,8395	1,6322	$\triangle spe3$ 1mM	0,6777	1,5707			
spe3t3	0,9022	1,4462						
spe4nt1	0,8017	0,5648						
spe4nt2	0,8261	0,5730	$\triangle spe4$ 0mM	0,7908	0,5609	$\triangle spe4$	0,7043	0,0133
spe4nt3	0,7445	0,5449						
spe4t1	0,7958	0,6606						
spe4t2	0,6790	0,6865	$\triangle spe4$ 1mM	0,7630	0,6557			
spe4t3	0,8141	0,6201						
arg4nt1	0,8459	0,4007						
arg4nt2	0,8350	0,3697	$\triangle arg4$ 0mM	0,8398	0,3793	$\triangle arg4$	0,0700	0,0089
arg4nt3	0,8385	0,3675						
arg4t1	0,7299	0,5205						
arg4t2	0,7956	0,4883	$\triangle arg4$ 1mM	0,7605	0,5110			
arg4t3	0,7559	0,5243						
arg3nt1	0,9218	0,4312						
arg3nt2	0,9130	0,4232	$\triangle arg3$ 0mM	0,9146	0,4437	$\triangle arg3$	0,0015	0,6805
arg3nt3	0,9089	0,4768						
arg3t1	0,8666	0,4670						
arg3t2	0,8541	0,4514	$\triangle arg3$ 1mM	0,8593	0,4541			
arg3t3	0,8573	0,4439						
arg5,6nt1	0,8793	0,5668						
arg5,6nt2	0,8272	0,5472	$\triangle arg5,6$ 0mM	0,8439	0,5779	$\triangle arg5,6$	0,1179	0,0547
arg5,6nt3	0,8251	0,6196						
arg5,6t1	0,7504	0,8442						
arg5,6t2	0,7278	0,7577	$\triangle arg5,6$ 1mM	0,6613	0,8974			
arg5,6t3	0,5058	1,0902						
arg2nt1	0,9533	0,5240						
arg2nt2	0,9409	0,4891	$\triangle arg2$ 0mM	0,9643	0,5007	$\triangle arg2$	0,0418	0,0141
arg2nt3	0,9986	0,4890						
arg2t1	0,8403	0,6015						
arg2t2	0,8597	0,6071	$\triangle arg2$ 1mM	0,8433	0,5982			
arg2t3	0,8300	0,5860						
arg7nt1	0,9224	0,4995						
arg7nt2	0,8586	0,5064	$\triangle arg7$ 0mM	0,8843	0,4997	$\triangle arg7$	0,0591	0,0061
arg7nt3	0,8719	0,4932						
arg7t1	0,7748	0,6948						
arg7t2	0,7601	0,7635	$\triangle arg7$ 1mM	0,7828	0,7276			
arg7t3	0,8136	0,7245						
pro1nt1	0,8133	0,8858						
pro1nt2	0,7903	0,6039	$\triangle pro1$ 0mM	0,8196	0,6727	$\triangle pro1$	0,0117	0,5525
pro1nt3	0,8552	0,5284						

pro1t1	0,9727	0,7225						
pro1t2	0,9330	0,7663	$\Delta pro1$ 1mM	0,9565	0,7673			
pro1t3	0,9638	0,8132						
pro2nt1	1,4789	1,4301						
pro2nt2	1,0316	1,0626	$\Delta pro2$ 0mM	1,2878	1,3307	$\Delta pro2$	0,0358	0,8124
pro2nt3	1,3530	1,4995						
pro2t1	0,3670	1,2524						
pro2t2	0,4862	1,5117	$\Delta pro2$ 1mM	0,4109	1,3844			
pro2t3	0,3794	1,3891						
fen2nt1	1,1011	0,8038						
fen2nt2	1,0427	1,0074	$\Delta fen2$ 0mM	1,0663	0,8876	$\Delta fen2$	0,0003	0,2417
fen2nt3	1,0551	0,8517						
fen2t1	0,0072	7,8680						
fen2t2	0,0079	49,3829	$\Delta fen2$ 1mM	0,0076	22,7449			
fen2t3	0,0078	10,9837						
atg8nt1	0,7519	0,4481						
atg8nt2	0,7521	0,4629	$\Delta atg8$ 0mM	0,7282	0,4529	$\Delta atg8$	0,0583	0,0062
atg8nt3	0,6806	0,4478						
atg8t1	0,8089	0,5545						
atg8t2	0,8269	0,5635	$\Delta atg8$ 1mM	0,8156	0,5652			
atg8t3	0,8110	0,5775						
amd1nt1	0,7799	0,8352						
amd1nt2	0,6456	1,3052	$\Delta amd1$ 0mM	0,6834	1,1233	$\Delta amd1$	0,5134	0,0493
amd1nt3	0,6248	1,2294						
amd1t1	0,9735	2,4584						
amd1t2	0,4095	2,3031	$\Delta amd1$ 1mM	0,5535	2,2477			
amd1t3	0,2774	1,9816						
jjj1nt1	0,9035	0,5795						
jjj1nt2	0,8726	0,5809	$\Delta jjj1$ 0mM	0,8854	0,5717	$\Delta jjj1$	0,1481	0,0218
jjj1nt3	0,8802	0,5547						
jjj1t1	0,8391	0,6562						
jjj1t2	0,8153	0,6610	$\Delta jjj1$ 1mM	0,8429	0,6399			
jjj1t3	0,8744	0,6025						
muk1nt1	0,7686	0,5584						
muk1nt2	0,7891	0,5301	$\Delta muk1$ 0mM	0,7834	0,5446	$\Delta muk1$	0,3163	0,0526
muk1nt3	0,7925	0,5453						
muk1t1	0,7489	0,6349						
muk1t2	0,7722	0,6100	$\Delta muk1$ 1mM	0,7090	0,6473			
muk1t3	0,6058	0,6970						
sst1nt1	0,9040	0,5802						
sst1nt2	0,8732	0,5816	$\Delta sst1$ 0mM	0,8860	0,5724	$\Delta sst1$	0,1482	0,0218
sst1nt3	0,8807	0,5554						
sst1t1	0,8396	0,6571						

sst1t2	0,8159	0,6620	$\triangle sst1$ 1mM	0,8435	0,6408	$\triangle fpk1$	0,0059	0,5223
sst1t3	0,8750	0,6034						
fpk1nt1	0,9569	0,5997						
fpk1nt2	0,9336	0,5985	$\triangle fpk1$ 0mM	0,9487	0,5968			
fpk1nt3	0,9554	0,5923						
fpk1t1	0,8006	0,6041						
fpk1t2	0,8016	0,6078	$\triangle fpk1$ 1mM	0,8123	0,5999	$\triangle dnf1$	0,0102	0,2270
fpk1t3	0,8347	0,5878						
dnf1nt1	0,8889	0,4569						
dnf1nt2	0,8880	0,4344	$\triangle dnf1$ 0mM	0,8954	0,4516			
dnf1nt3	0,9094	0,4634						
dnf1t1	0,8423	0,4803						
dnf1t2	0,8362	0,4980	$\triangle dnf1$ 1mM	0,8409	0,4819	$\triangle dnf2$	0,0525	0,1273
dnf1t3	0,8443	0,4673						
dnf2nt1	0,9217	0,4881						
dnf2nt2	0,9140	0,4575	$\triangle dnf2$ 0mM	0,9194	0,4899			
dnf2nt3	0,9226	0,5242						
dnf2t1	0,8813	0,5257						
dnf2t2	0,8311	0,5524	$\triangle dnf2$ 1mM	0,8449	0,5431	$\triangle dnf3$	0,0240	0,0350
dnf2t3	0,8223	0,5513						
dnf3nt1	0,9244	0,5295						
dnf3nt2	0,9322	0,5026	$\triangle dnf3$ 0mM	0,9276	0,5108			
dnf3nt3	0,9261	0,5002						
dnf3t1	0,8310	0,5543						
dnf3t2	0,8604	0,5490	$\triangle dnf3$ 1mM	0,8546	0,5509	$\triangle vma21$	0,9444	0,4278
dnf3t3	0,8724	0,5495						
vma21nt1	0,8388	0,8285						
vma21nt2	0,9585	0,8928	$\triangle vma21$ 0mM	0,9405	0,8217			
vma21nt3	1,0241	0,7439						
vma21t1	0,7739	0,8599						
vma21t2	0,8249	0,8652	$\triangle vma21$ 1mM	0,9331	0,8763	$\triangle gcn1$	0,7542	0,9018
vma21t3	1,2004	0,9039						
gcn1nt1	1,0173	0,4368						
gcn1nt2	0,9893	0,7639	$\triangle gcn1$ 0mM	0,9946	0,5853			
gcn1nt3	0,9773	0,5553						
gcn1t1	0,9725	0,5795						
gcn1t2	1,0387	0,6159	$\triangle gcn1$ 1mM	1,0048	0,5972	$\triangle hos2$	0,2396	0,3553
gcn1t3	1,0032	0,5962						
hos2nt1	1,0657	0,5929						
hos2nt2	1,0983	0,7189	$\triangle hos2$ 0mM	1,0752	0,7168			
hos2nt3	1,0616	0,8386						
hos2t1	1,0961	0,8538						
hos2t2	1,0989	0,8268	$\triangle hos2$ 1mM	1,1096	0,8235			

hos2t3	1,1340	0,7898						
ubc7nt1	0,8118	0,5453						
ubc7nt2	0,8087	0,5222	$\triangle ubc7$ 0mM	0,7899	0,5375	$\triangle ubc7$	0,6844	0,0312
ubc7nt3	0,7492	0,5450						
ubc7t1	0,7623	0,6173						
ubc7t2	0,7885	0,6603	$\triangle ubc7$ 1mM	0,7783	0,6493			
ubc7t3	0,7840	0,6701						
ubx2nt1	0,9684	0,5200						
ubx2nt2	0,9518	0,4595	$\triangle ubx2$ 0mM	0,9600	0,4856	$\triangle ubx2$	0,0130	0,4492
ubx2nt3	0,9597	0,4772						
ubx2t1	0,9442	0,4671						
ubx2t2	0,9315	0,6131	$\triangle ubx2$ 1mM	0,9397	0,5415			
ubx2t3	0,9436	0,5442						
ubp8nt1	0,3472	0,5510						
ubp8nt2	0,3699	0,6479	$\triangle ubp8$ 0mM	0,3625	0,5976	$\triangle ubp8$	0,1523	0,2549
ubp8nt3	0,3705	0,5938						
ubp8t1	0,3268	0,8055						
ubp8t2	0,3636	0,6614	$\triangle ubp8$ 1mM	0,3517	0,7119			
ubp8t3	0,3647	0,6687						
atg7nt1	1,1228	0,7144						
atg7nt2	1,1406	0,7786	$\triangle atg7$ 0mM	1,1329	0,7456	$\triangle atg7$	0,0715	0,0060
atg7nt3	1,1353	0,7437						
atg7t1	1,1430	0,9304						
atg7t2	1,1684	0,9899	$\triangle atg7$ 1mM	1,1660	0,9771			
atg7t3	1,1867	1,0111						
doa1nt1	1,1966	0,8392						
doa1nt2	1,1954	0,7625	$\triangle doa1$ 0mM	1,1940	0,7962	$\triangle doa1$	0,0337	0,1194
doa1nt3	1,1901	0,7869						
doa1t1	1,1581	0,7253						
doa1t2	1,1701	0,7409	$\triangle doa1$ 1mM	1,1658	0,7258			
doa1t3	1,1692	0,7113						
pep4nt1	1,1422	0,6932						
pep4nt2	1,1440	0,6980	$\triangle pep4$ 0mM	1,1505	0,7065	$\triangle pep4$	0,8063	0,2208
pep4nt3	1,1651	0,7283						
pep4t1	1,1647	0,8587						
pep4t2	1,1309	0,8995	$\triangle pep4$ 1mM	1,1468	0,8240			
pep4t3	1,1446	0,7138						
sge1nt1	1,1551	0,7225						
sge1nt2	1,1399	0,8108	$\triangle sge1$ 0mM	1,1464	0,7279	$\triangle sge1$	0,0168	0,0282
sge1nt3	1,1441	0,6503						
sge1t1	1,0940	0,8282						
sge1t2	1,0843	0,9328	$\triangle sge1$ 1mM	1,0946	0,8647			
sge1t3	1,1055	0,8330						

pdr5nt1	1,1499	0,6605						
pdr5nt2	1,1660	0,7969	$\triangle pdr5$ 0mM	1,1613	0,7807	$\triangle pdr5$	0,2632	0,8531
pdr5nt3	1,1682	0,8846						
pdr5t1	1,1530	0,7829						
pdr5t2	1,1428	0,7866	$\triangle pdr5$ 1mM	1,1492	0,7929			
pdr5t3	1,1518	0,8092						
pdr10nt1	1,1286	0,7097						
pdr10nt2	1,1213	0,8800	$\triangle pdr10$ 0mM	1,1288	0,8415	$\triangle pdr10$	0,1330	0,1714
pdr10nt3	1,1364	0,9348						
pdr10t1	1,1261	0,8589						
pdr10t2	1,1030	0,8918	$\triangle pdr10$ 1mM	1,1152	0,9247			
pdr10t3	1,1165	1,0235						
snq2nt1	1,0897	0,6737						
snq2nt2	1,0447	0,6499	$\triangle snq2$ 0mM	1,0606	0,6709	$\triangle snq2$	0,0219	0,4144
snq2nt3	1,0474	0,6890						
snq2t1	1,1609	0,6458						
snq2t2	1,1642	0,7085	$\triangle snq2$ 1mM	1,1622	0,7001			
snq2t3	1,1615	0,7460						
mch5nt1	1,2144	1,0051						
mch5nt2	1,2344	1,0444	$\triangle mch5$ 0mM	1,2365	1,0663	$\triangle mch5$	0,1099	0,0064
mch5nt3	1,2608	1,1494						
mch5t1	1,5564	1,8146						
mch5t2	1,9455	2,0046	$\triangle mch5$ 1mM	2,0297	2,0134			
mch5t3	2,5874	2,2210						
atr1nt1	1,0722	1,6145						
atr1nt2	1,1600	1,5245	$\triangle atr1$ 0mM	1,0561	1,4882	$\triangle atr1$	0,2622	0,2376
atr1nt3	0,9362	1,3256						
atr1t1	0,4408	1,6702						
atr1t2	0,9339	2,2545	$\triangle atr1$ 1mM	0,7704	2,3789			
atr1t3	0,9367	3,2121						
pho84nt1	1,1304	1,1641						
pho84nt2	1,0877	0,8944	$\triangle pho84$ 0mM	1,1023	0,9754	$\triangle pho84$	0,3303	0,0304
pho84nt3	1,0889	0,8677						
pho84t1	1,3945	1,7921						
pho84t2	1,0446	1,2228	$\triangle pho84$ 1mM	1,2155	1,4747			
pho84t3	1,2074	1,4091						
hxt17nt1	1,1060	1,0373						
hxt17nt2	1,0955	0,9822	$\triangle hxt17$ 0mM	1,1158	1,0299	$\triangle hxt17$	0,8143	0,0760
hxt17nt3	1,1460	1,0702						
hxt17t1	1,0777	1,3098						
hxt17t2	1,0345	1,2041	$\triangle hxt17$ 1mM	1,1061	1,3778			
hxt17t3	1,2062	1,6196						
hxt14nt1	1,1007	1,3226						

hxt14nt2	1,1120	1,3114	$\triangle hxt14\ 0mM$	1,0942	1,3387	$\triangle hxt14$	0,0105	0,2361
hxt14nt3	1,0701	1,3820						
hxt14t1	0,7845	1,5396						
hxt14t2	0,6628	1,3958	$\triangle hxt14\ 1mM$	0,7173	1,4414			
hxt14t3	0,7047	1,3888						
rsb1nt1	1,0780	0,9416						
rsb1nt2	1,0962	0,8566	$\triangle rsb1\ 0mM$	1,0835	0,8946	$\triangle rsb1$	0,0686	0,4520
rsb1nt3	1,0763	0,8857						
rsb1t1	1,0001	0,9486						
rsb1t2	0,8859	0,8426	$\triangle rsb1\ 1mM$	0,9441	0,8885			
rsb1t3	0,9462	0,8745						
nrt1nt1	0,8886	1,2010						
nrt1nt2	0,8451	1,1484	$\triangle nrt1\ 0mM$	0,8659	1,1753	$\triangle nrt1$	0,0052	0,1771
nrt1nt3	0,8641	1,1764						
nrt1t1	0,6818	1,2695						
nrt1t2	0,6718	1,2227	$\triangle nrt1\ 1mM$	0,6651	1,2233			
nrt1t3	0,6416	1,1777						
aqy2nt1	0,8165	0,9898						
aqy2nt2	0,8593	0,9250	$\triangle aqy2\ 0mM$	0,8356	0,9651	$\triangle aqy2$	0,0318	0,4365
aqy2nt3	0,8310	0,9805						
aqy2t1	0,9830	0,9993						
aqy2t2	0,9609	0,9871	$\triangle aqy2\ 1mM$	0,9575	0,9858			
aqy2t3	0,9287	0,9710						
arr3nt1	0,8742	1,1884						
arr3nt2	0,9342	0,9668	$\triangle arr3\ 0mM$	0,9140	1,0449	$\triangle arr3$	0,8038	0,9948
arr3nt3	0,9336	0,9795						
arr3t1	0,8629	0,9208						
arr3t2	0,8567	1,0431	$\triangle arr3\ 1mM$	0,9031	1,0459			
arr3t3	0,9897	1,1739						
tna1nt1	1,0396	1,0134						
tna1nt2	1,0633	1,1908	$\triangle tna1\ 0mM$	1,0267	1,0462	$\triangle tna1$	0,7601	0,0106
tna1nt3	0,9770	0,9344						
tna1t1	1,0581	0,8191						
tna1t2	0,9618	0,9118	$\triangle tna1\ 1mM$	1,0114	0,8105			
tna1t3	1,0144	0,7006						
itr2nt1	0,9814	1,7130						
itr2nt2	0,9359	1,2501	$\triangle itr2\ 0mM$	0,9982	1,5502	$\triangle itr2$	0,9547	0,7802
itr2nt3	1,0772	1,6876						
itr2t1	1,0609	1,6354						
itr2t2	1,0299	1,5146	$\triangle itr2\ 1mM$	1,0034	1,4927			
itr2t3	0,9194	1,3282						
bor1nt1	0,9365	0,7726						
bor1nt2	0,8723	0,7355	$\triangle bor1\ 0mM$	0,8932	0,7617	$\triangle bor1$	0,0810	0,2225

bor1nt3	0,8707	0,7771						
bor1t1	1,0217	1,0197						
bor1t2	0,9178	0,7215	$\triangle bor1$ 1mM	0,9834	0,8980			
bor1t3	1,0106	0,9526						
alp1nt1	0,7946	0,8620						
alp1nt2	0,8188	0,7839	$\triangle alp1$ 0mM	0,7671	0,7696	$\triangle alp1$	0,2227	0,1448
alp1nt3	0,6879	0,6629						
alp1t1	0,8604	1,0644						
alp1t2	0,8130	1,1428	$\triangle alp1$ 1mM	0,8077	0,9748			
alp1t3	0,7498	0,7173						
smf1nt1	0,8525	0,7543						
smf1nt2	0,9147	0,9028	$\triangle smf1$ 0mM	0,9393	0,9388	$\triangle smf1$	0,2754	0,1288
smf1nt3	1,0508	1,1595						
smf1t1	1,0282	1,2321						
smf1t2	1,0659	1,2789	$\triangle smf1$ 1mM	1,0373	1,2467			
smf1t3	1,0177	1,2291						
fet4nt1	0,8295	1,0671						
fet4nt2	0,9110	1,0738	$\triangle fet4$ 0mM	0,8664	0,9553	$\triangle fet4$	0,0931	0,5288
fet4nt3	0,8588	0,7250						
fet4t1	1,0230	1,2299						
fet4t2	0,9597	0,8833	$\triangle fet4$ 1mM	0,9970	1,0939			
fet4t3	1,0082	1,1687						
tok1nt1	0,8988	1,0483						
tok1nt2	0,8992	1,2919	$\triangle tok1$ 0mM	0,8932	1,2676	$\triangle tok1$	0,5987	0,7770
tok1nt3	0,8816	1,4628						
tok1t1	0,9173	1,6510						
tok1t2	0,9039	1,7424	$\triangle tok1$ 1mM	0,8740	1,3970			
tok1t3	0,8007	0,7975						
ptr2nt1	0,8184	0,5952						
ptr2nt2	0,8375	0,5389	$\triangle ptr2$ 0mM	0,8125	0,5378	$\triangle ptr2$	0,7208	0,3979
ptr2nt3	0,7815	0,4793						
ptr2t1	0,8417	0,5771						
ptr2t2	0,7892	0,5676	$\triangle ptr2$ 1mM	0,8262	0,5938			
ptr2t3	0,8478	0,6368						
ctr1nt1	0,8703	0,5566						
ctr1nt2	0,8767	0,5712	$\triangle ctr1$ 0mM	0,8669	0,5701	$\triangle ctr1$	0,0161	0,0177
ctr1nt3	0,8537	0,5825						
ctr1t1	0,8437	0,3726						
ctr1t2	0,8357	0,2770	$\triangle ctr1$ 1mM	0,8311	0,3335			
ctr1t3	0,8138	0,3509						
fps1nt1	1,1603	0,6890						
fps1nt2	1,1171	0,6630	$\triangle fps1$ 0mM	1,1330	0,6644	$\triangle fps1$	0,6599	0,1371
fps1nt3	1,1218	0,6412						

fps1t1	1,1188	0,7370						
fps1t2	1,1371	0,7129	$\triangle fps1$ 1mM	1,1239	0,7479			
fps1t3	1,1158	0,7938						
alp1nt1	1,1455	0,7918						
alp1nt2	0,8829	0,6594	$\triangle alp1$ 0mM	1,0515	0,7641	$\triangle alp1$	0,4922	0,8092
alp1nt3	1,1260	0,8411						
alp1t1	0,9795	0,8793						
alp1t2	1,0048	0,8232	$\triangle alp1$ 1mM	0,9626	0,7917			
alp1t3	0,9033	0,6727						
qdr2nt1	1,1025	0,6894						
qdr2nt2	1,1053	0,6049	$\triangle qdr2$ 0mM	1,1008	0,6265	$\triangle qdr2$	0,0992	0,1134
qdr2nt3	1,0946	0,5852						
qdr2t1	1,0598	0,7458						
qdr2t2	1,0836	0,6431	$\triangle qdr2$ 1mM	1,0749	0,7007			
qdr2t3	1,0815	0,7131						
mmp1nt1	1,0319	0,6985						
mmp1nt2	1,0675	0,7731	$\triangle mmp1$ 0mM	1,0543	0,7054	$\triangle mmp1$	0,2789	0,8022
mmp1nt3	1,0635	0,6445						
mmp1t1	1,1019	0,7228						
mmp1t2	1,0611	0,6587	$\triangle mmp1$ 1mM	1,0868	0,7277			
mmp1t3	1,0972	0,8016						
avt7nt1	1,0209	0,7283						
avt7nt2	1,0201	0,7250	$\triangle avt7$ 0mM	1,0587	0,7464	$\triangle avt7$	0,3803	0,2391
avt7nt3	1,1351	0,7858						
avt7t1	1,1121	0,8243						
avt7t2	1,0924	0,7975	$\triangle avt7$ 1mM	1,1020	0,7994			
avt7t3	1,1016	0,7763						
hxt10nt1	1,1594	0,6559						
hxt10nt2	1,1147	0,7656	$\triangle hxt10$ 0mM	1,1268	0,6845	$\triangle hxt10$	0,0273	0,8625
hxt10nt3	1,1064	0,6319						
hxt10t1	1,0160	0,6308						
hxt10t2	1,0297	0,6920	$\triangle hxt10$ 1mM	1,0193	0,6969			
hxt10t3	1,0122	0,7680						
alr2nt1	1,0114	0,7326						
alr2nt2	0,9797	0,6745	$\triangle alr2$ 0mM	1,0028	0,6961	$\triangle alr2$	0,1778	0,0598
alr2nt3	1,0174	0,6814						
alr2t1	1,1495	0,8342						
alr2t2	1,1316	0,7367	$\triangle alr2$ 1mM	1,1003	0,7647			
alr2t3	1,0198	0,7232						
yor1nt1	0,8574	0,6671						
yor1nt2	0,8018	0,6503	$\triangle yor1$ 0mM	0,8373	0,6576	$\triangle yor1$	0,2676	0,3440
yor1nt3	0,8528	0,6553						
yor1t1	0,8098	0,6769						

yor1t2	0,8114	0,6247	$\triangle yor1$ 1mM	0,8050	0,6275	$\triangle ubp3$	0,0101	0,2012
yor1t3	0,7937	0,5807						
ubp3nt1	0,7056	0,6985						
ubp3nt2	0,743	0,696	$\triangle ubp3$ 0mM	0,7415	0,6632			
ubp3nt3	0,7758	0,5952						
ubp3t1	0,9337	0,8432						
ubp3t2	0,9418	0,7096	$\triangle ubp33$ 1mM	0,9370	0,8119	$\triangle bre5$	0,0015	0,4149
ubp3t3	0,9356	0,883						
bre5nt1	0,4943	0,9832						
bre5nt2	0,502	0,7401	$\triangle bre5$ 0mM	0,5041	0,8979			
bre5nt3	0,5159	0,9703						
bre5t1	0,8567	1,0992						
bre5t2	0,8269	0,9865	$\triangle bre5$ 1mM	0,8405	0,9934	$\triangle ltn1$	0,5656	0,2871
bre5t3	0,838	0,8944						
sample	k	t_gen						
WTnt1	0,9295	0,6064						
WTnt2	0,8627	0,5316	WT 0mM	0,8950	0,5825			
WTnt3	0,8929	0,6093						
WTt1	0,8939	0,6077				$\triangle car1$	0,7136	0,0681
WTt2	0,8477	0,7630	WT 2mM	0,8800	0,6665			
WTt3	0,8983	0,6289						
ltn1nt1	1,1957	0,6196						
ltn1nt2	1,1633	0,6294	$\triangle ltn1$ 0mM	1,0333	0,6519			
ltn1nt3	0,7408	0,7067						
ltn1t1	1,1431	0,7928				$\triangle sky1$	0,6259	0,4062
ltn1t2	1,1115	0,6067	$\triangle ltn1$ 2mM	1,1452	0,7338			
ltn1t3	1,1810	0,8019						
car1nt1	1,1593	0,8307						
car1nt2	1,1343	0,7890	$\triangle car1$ 0mM	1,1260	0,8118			
car1nt3	1,0845	0,8157						
car1t1	1,1410	0,6842				$\triangle gcn2$	0,0981	0,2180
car1t2	1,1345	0,7089	$\triangle car1$ 2mM	1,1332	0,7164			
car1t3	1,1242	0,7562						
sky1nt1	1,1202	0,6074						
sky1nt2	1,1314	0,7154	$\triangle sky1$ 0mM	1,1230	0,6743			
sky1nt3	1,1175	0,7000						
sky1t1	1,1306	0,6253				$\triangle gcn2$	0,0981	0,2180
sky1t2	1,1137	0,6342	$\triangle sky1$ 2mM	1,1184	0,6444			
sky1t3	1,1108	0,6735						
gcn2nt1	1,1205	0,6844						
gcn2nt2	1,1196	0,6602	$\triangle gcn2$ 0mM	1,1215	0,6660			
gcn2nt3	1,1246	0,6533						
gcn2t1	1,0824	0,6747						

gcn2t2	1,0832	0,7999	$\triangle gcn2$ 2mM	1,0937	0,7737	$\triangle trk2$	0,3221	0,1380
gcn2t3	1,1156	0,8465						
trk2nt1	0,7944	0,5865						
trk2nt2	0,8458	0,6089	$\triangle trk2$ 0mM	0,8236	0,5967			
trk2nt3	0,8307	0,5948						
trk2t1	0,8056	0,6077						
trk2t2	0,8117	0,6329	$\triangle trk2$ 2mM	0,7892	0,6354			
trk2t3	0,7502	0,6656						
ppz1nt1	1,1963	0,7558				$\triangle ppz1$	0,1495	0,0761
ppz1nt2	0,9769	0,6909	$\triangle ppz1$ 0mM	1,0770	0,7869			
ppz1nt3	1,0578	0,9140						
ppz1t1	0,8115	1,0290						
ppz1t2	0,9167	1,0869	$\triangle ppz1$ 2mM	0,8621	1,0523			
ppz1t3	0,8579	1,0410						
ppz2nt1	1,1537	0,6510						
ppz2nt2	1,1166	0,7186	$\triangle ppz2$ 0mM	1,1360	0,6483		$\triangle ppz2$	0,9128
ppz2nt3	1,1376	0,5754						
ppz2t1	1,1378	0,8134						
ppz2t2	1,1320	0,8537	$\triangle ppz2$ 2mM	1,1349	0,8221			
ppz2t3	1,1348	0,7993						
trk1nt1	0,6750	0,8144				$\triangle trk1$	0,0005	0,0226
trk1nt2	0,6845	0,8374	$\triangle trk1$ 0mM	0,6645	0,7547			
trk1nt3	0,6341	0,6124						
trk1t1	1,2320	1,9814						
trk1t2	1,2456	2,8311	$\triangle trk1$ 2mM	1,2109	2,3182			
trk1t3	1,1551	2,1420						
ort1nt1	0,9114	0,5899						
ort1nt2	0,9101	0,6281	$\triangle ort1$ 0mM	0,8855	0,5742		$\triangle ort1$	0,2011
ort1nt3	0,8351	0,5047						
ort1t1	0,7251	0,8321						
ort1t2	0,7766	0,8156	$\triangle ort1$ 2mM	0,7798	0,7859			
ort1t3	0,8377	0,7100						
aqr1nt1	1,0206	0,4360				$\triangle aqr1$	0,0389	0,0177
aqr1nt2	1,0471	0,4217	$\triangle aqr1$ 0mM	1,0325	0,4212			
aqr1nt3	1,0298	0,4059						
aqr1t1	0,9191	0,5616						
aqr1t2	0,8671	0,5180	$\triangle aqr1$ 2mM	0,9045	0,5468			
aqr1t3	0,9273	0,5608						
hol1nt1	0,9656	0,4595						
hol1nt2	0,9413	0,4189	$\triangle hol1$ 0mM	0,9427	0,4377		$\triangle hol1$	0,0003
hol1nt3	0,9210	0,4346						
hol1t1	0,8104	0,5560						
hol1t2	0,7908	0,5422	$\triangle hol1$ 2mM	0,7875	0,5502			

hol1t3	0,7614	0,5525						
flr1nt1	0,6290	0,4835						
flr1nt2	0,7988	0,5569	$\triangle flr1$ 0mM	0,7348	0,5297	$\triangle flr1$	0,2202	0,0760
flr1nt3	0,7767	0,5487						
flr1t1	0,8534	0,6124						
flr1t2	0,8258	0,6058	$\triangle flr1$ 2mM	0,8409	0,6119			
flr1t3	0,8436	0,6175						
yhk8nt1	0,7691	0,4606						
yhk8nt2	0,7546	0,4876	$\triangle yhk8$ 0mM	0,7703	0,4799	$\triangle yhk8$	0,0694	0,0105
yhk8nt3	0,7872	0,4914						
yhk8t1	0,9006	0,6117						
yhk8t2	0,8213	0,6577	$\triangle yhk8$ 2mM	0,8551	0,6580			
yhk8t3	0,8432	0,7045						
dtr1nt1	0,7960	0,4500						
dtr1nt2	0,8102	0,4458	$\triangle dtr1$ 0mM	0,8158	0,4482	$\triangle dtr1$	0,6165	0,0760
dtr1nt3	0,8412	0,4488						
dtr1t1	0,7028	0,6611						
dtr1t2	0,8489	0,7333	$\triangle dtr1$ 2mM	0,7933	0,6445			
dtr1t3	0,8281	0,5390						
qdr1nt1	0,9604	0,5088						
qdr1nt2	0,9510	0,4996	$\triangle qdr1$ 0mM	0,9508	0,4973	$\triangle qdr1$	0,0646	0,0047
qdr1nt3	0,9409	0,4836						
qdr1t1	0,8702	0,6229						
qdr1t2	0,9066	0,6280	$\triangle qdr1$ 2mM	0,8920	0,6118			
qdr1t3	0,8992	0,5846						
qdr3nt1	0,4461	0,5479						
qdr3nt2	0,4603	0,5967	$\triangle qdr3$ 0mM	0,4410	0,5573	$\triangle qdr3$	0,0481	0,0389
qdr3nt3	0,4165	0,5274						
qdr3t1	0,3747	0,8119						
qdr3t2	0,3357	0,7223	$\triangle qdr3$ 2mM	0,3551	0,7668			
qdr3t3	0,3548	0,7663						
tpk1nt1	0,7178	0,4911						
tpk1nt2	0,6494	0,5007	$\triangle tpk1$ 0mM	0,6893	0,4820	$\triangle tpk1$	0,0234	0,0004
tpk1nt3	0,7007	0,4541						
tpk1t1	0,5731	0,6770						
tpk1t2	0,5224	0,6744	$\triangle tpk1$ 2mM	0,5290	0,6612			
tpk1t3	0,4915	0,6321						
ypk9nt1	0,8096	0,3932						
ypk9nt2	0,8101	0,3932	$\triangle ypk9$ 0mM	0,8318	0,4309	$\triangle ypk9$	0,1604	0,0199
ypk9nt3	0,8756	0,5062						
ypk9t1	0,7793	0,5968						
ypk9t2	0,7799	0,5953	$\triangle ypk9$ 2mM	0,8110	0,6083			
ypk9t3	0,8738	0,6328						

gap1nt1	0,7969	0,5230						
gap1nt2	0,7253	0,6709	$\triangle gap1$ 0mM	0,7731	0,6066	$\triangle gap1$	0,1606	0,5011
gap1nt3	0,7972	0,6258						
gap1t1	0,8249	0,6922						
gap1t2	0,8105	0,5934	$\triangle gap1$ 2mM	0,8177	0,6655			
gap1t3	0,8178	0,7109						
hnm1nt1	0,9043	0,6108						
hnm1nt2	0,8760	0,5716	$\triangle hnm1$ 0mM	0,8790	0,5814	$\triangle hnm1$	0,0249	0,0291
hnm1nt3	0,8567	0,5616						
hnm1t1	0,8066	0,7358						
hnm1t2	0,7848	0,8022	$\triangle hnm1$ 2mM	0,7975	0,7566			
hnm1t3	0,8011	0,7318						
cdc50nt1	0,9742	0,6926						
cdc50nt2	0,9585	0,6439	$\triangle cdc50$ 0mM	0,9612	0,6689	$\triangle cdc50$	0,0198	0,6453
cdc50nt3	0,9508	0,6702						
cdc50t1	0,8075	0,6621						
cdc50t2	0,8477	0,6691	$\triangle cdc50$ 2mM	0,8316	0,6804			
cdc50t3	0,8395	0,7101						
tpk3nt1	0,9441	0,4277						
tpk3nt2	0,8770	0,4421	$\triangle tpk3$ 0mM	0,9108	0,4314	$\triangle tpk3$	0,0427	0,0267
tpk3nt3	0,9115	0,4243						
tpk3t1	0,8751	0,5501						
tpk3t2	0,8407	0,5114	$\triangle tpk3$ 2mM	0,8489	0,5352			
tpk3t3	0,8311	0,5441						
tpk2nt1	0,9549	0,5592						
tpk2nt2	0,9652	0,5588	$\triangle tpk2$ 0mM	0,9160	0,5293	$\triangle tpk2$	0,5594	0,0055
tpk2nt3	0,8280	0,4699						
tpk2t1	0,8736	0,7019						
tpk2t2	0,8788	0,7240	$\triangle tpk2$ 2mM	0,8816	0,6937			
tpk2t3	0,8926	0,6550						
alk2nt1	0,9497	0,6868						
alk2nt2	0,9435	0,5774	$\triangle alk2$ 0mM	0,9315	0,6180	$\triangle alk2$	0,5666	0,4537
alk2nt3	0,9014	0,5899						
alk2t1	0,9227	0,6453						
alk2t2	0,9185	0,6639	$\triangle alk2$ 2mM	0,9210	0,6545			
alk2t3	0,9218	0,6542						
pmc1nt1	0,9418	0,6871						
pmc1nt2	0,9951	0,7321	$\triangle pmc1$ 0mM	0,9533	0,6742	$\triangle pmc1$	0,3110	0,2802
pmc1nt3	0,9229	0,6034						
pmc1t1	0,9250	0,6505						
pmc1t2	0,9153	0,5999	$\triangle pmc1$ 2mM	0,9208	0,6172			
pmc1t3	0,9222	0,6012						
npr1nt1	0,5728	0,7198						

npr1nt2	0,5357	0,6458	$\triangle npr1\ 0mM$	0,5464	0,6861	$\triangle npr1$	0,0139	0,0155
npr1nt3	0,5308	0,6926						
npr1t1	0,4619	0,9100						
npr1t2	0,4503	0,9320	$\triangle npr1\ 2mM$	0,4561	0,9159			
npr1t3	0,4561	0,9058						
yck2nt1	0,9750	0,7088						
yck2nt2	0,8754	0,6489	$\triangle yck2\ 0mM$	0,9461	0,6468	$\triangle yck2$	0,5976	0,9314
yck2nt3	0,9880	0,5828						
yck2t1	0,9683	0,6291						
yck2t2	0,9566	0,7052	$\triangle yck2\ 2mM$	0,9654	0,6430			
yck2t3	0,9714	0,5946						
apl4nt1	0,8494	0,5711						
apl4nt2	0,8335	0,5576	$\triangle apl4\ 0mM$	0,8445	0,5627	$\triangle apl4$	0,0195	0,0846
apl4nt3	0,8505	0,5593						
apl4t1	0,9571	0,6620						
apl4t2	0,9829	0,5906	$\triangle apl4\ 2mM$	0,9616	0,6191			
apl4t3	0,9448	0,6048						
pmr1nt1	0,9200	0,4243						
pmr1nt2	0,8659	0,3309	$\triangle pmr1\ 0mM$	0,9015	0,3743	$\triangle pmr1$	0,1382	0,1562
pmr1nt3	0,9186	0,3676						
pmr1t1	0,8458	0,4401						
pmr1t2	0,8392	0,5574	$\triangle pmr1\ 2mM$	0,8201	0,5313			
pmr1t3	0,7752	0,5964						
yck1nt1	0,9093	0,4950						
yck1nt2	0,9204	0,5039	$\triangle yck1\ 0mM$	0,9284	0,5053	$\triangle yck1$	0,0662	0,0197
yck1nt3	0,9554	0,5171						
yck1t1	0,8607	0,6275						
yck1t2	0,8905	0,6449	$\triangle yck1\ 2mM$	0,8960	0,6647			
yck1t3	0,9368	0,7216						
lb19nt1	0,7654	0,6839						
lb19nt2	0,8075	0,7008	$\triangle lb19\ 0mM$	0,7584	0,7375	$\triangle lb19$	0,2231	0,5097
lb19nt3	0,7022	0,8278						
lb19t1	0,7940	0,8368						
lb19t2	0,8685	0,8051	$\triangle lb19\ 2mM$	0,8616	0,7951			
lb19t3	0,9224	0,7433						
tpo5nt1	0,9056	0,5893						
tpo5nt2	0,9254	0,5587	$\triangle tpo5\ 0mM$	0,9232	0,5810	$\triangle tpo5$	0,8364	0,0474
tpo5nt3	0,9386	0,5950						
tpo5t1	0,9305	0,6667						
tpo5t2	0,8938	0,6570	$\triangle tpo5\ 2mM$	0,9274	0,6536			
tpo5t3	0,9578	0,6371						
tpo4 nt1	0,9558	0,6866						
tpo4 nt2	0,9695	0,6116	$\triangle tpo4\ 0mM$	0,9634	0,6443	$\triangle tpo4$	0,0411	0,5683

tpo4 nt3	0,9649	0,6348						
tpo4 t1	0,9037	0,6484						
tpo4 t2	0,8585	0,7176	$\triangle tpo4$ 2mM	0,8742	0,6727			
tpo4 t3	0,8603	0,6522						
spf1 nt1	0,2262	0,6566						
spf1 nt2	0,2752	0,6658	$\triangle spf1$ 0mM	0,2559	0,6618	$\triangle spf1$	0,0512	0,1136
spf1 nt3	0,2663	0,6629						
spf1 t1	0,1864	0,7716						
spf1 t2	0,1778	0,8653	$\triangle spf1$ 2mM	0,1838	0,9057			
spf1 t3	0,1872	1,0803						
pmc1 nt1	0,9418	0,6871						
pmc1 nt2	0,9951	0,7321	$\triangle pmc1$ 0mM	0,9533	0,6742	$\triangle pmc1$	0,3110	0,2802
pmc1 nt3	0,9229	0,6034						
pmc1 t1	0,9250	0,6505						
pmc1 t2	0,9153	0,5999	$\triangle pmc1$ 2mM	0,9208	0,6172			
pmc1 t3	0,9222	0,6012						
sky1 nt1	1,1623	0,6393						
sky1 nt2	1,1666	0,7281	$\triangle sky1$ 0mM	1,1599	0,7041	$\triangle sky1$	0,1851	0,2319
sky1 nt3	1,1506	0,7449						
sky1 t1	1,1784	0,8561						
sky1 t2	1,1703	0,7812	$\triangle sky1$ 2mM	1,1784	0,8039			
sky1 t3	1,1863	0,7746						
agp1 nt1	1,1404	0,7184						
agp1 nt2	1,0768	0,7418	$\triangle agp1$ 0mM	1,1106	0,7166	$\triangle agp1$	0,3012	0,0138
agp1 nt3	1,1146	0,6894						
agp1 t1	1,1040	1,0501						
agp1 t2	1,0840	0,9839	$\triangle agp1$ 2mM	1,0927	1,0301			
agp1 t3	1,0900	1,0563						
dip5 nt1	1,1199	0,7405						
dip5 nt2	1,1648	0,7831	$\triangle dip5$ 0mM	1,1498	0,7457	$\triangle dip5$	0,7263	0,0604
dip5 nt3	1,1648	0,7135						
dip5 t1	1,1446	0,8992						
dip5 t2	1,1345	0,8474	$\triangle dip5$ 2mM	1,1433	0,8774			
dip5 t3	1,1507	0,8857						
tat1 nt1	1,1532	0,5505						
tat1 nt2	1,1425	0,5428	$\triangle tat1$ 0mM	1,1483	0,5505	$\triangle tat1$	0,0623	0,1093
tat1 nt3	1,1494	0,5581						
tat1 t1	1,1646	0,5641						
tat1 t2	1,1618	0,6051	$\triangle tat1$ 2mM	1,1685	0,5896			
tat1 t3	1,1790	0,5997						
stp1 nt1	0,9820	0,7505						
stp1 nt2	0,9258	0,9035	$\triangle stp1$ 0mM	0,9602	0,8410	$\triangle stp1$	0,0102	0,2444
stp1 nt3	0,9727	0,8689						

stp1 t1	1,1043	0,7408						
stp1 t2	1,0961	0,5323	Δ stp1 2mM	1,1022	0,6683			
stp1 t3	1,1063	0,7317						
stp2 nt1	1,0977	0,7241						
stp2 nt2	1,1373	0,7020	Δ stp2 0mM	1,1262	0,6972	Δ stp2	0,1254	0,0315
stp2 nt3	1,1435	0,6655						
stp2 t1	1,1456	0,9565						
stp2 t2	1,1625	0,8225	Δ stp2 2mM	1,1540	0,8840			
stp2 t3	1,1538	0,8730						
lyp1 nt1	0,8344	0,6011						
lyp1 nt2	0,9265	0,6530	Δ lyp1 0mM	0,8507	0,6388	Δ lyp1	0,7910	0,6545
lyp1 nt3	0,7911	0,6623						
lyp1 t1	0,7829	0,6741						
lyp1 t2	0,8697	0,6867	Δ lyp1 2mM	0,8381	0,6577			
lyp1 t3	0,8616	0,6122						
can1 nt1	0,8675	0,5425						
can1 nt2	0,9306	0,6847	Δ can1 0mM	0,9163	0,6060	Δ can1	0,1322	0,5604
can1 nt3	0,9509	0,5907						
can1 t1	0,8524	0,5612						
can1 t2	0,8277	0,6034	Δ can1 2mM	0,8386	0,5848			
can1 t3	0,8357	0,5899						
dur3 nt1	0,8185	0,5885						
dur3 nt2	0,8582	0,5476	Δ dur3 0mM	0,8439	0,5350	Δ dur3	0,2312	0,0937
dur3 nt3	0,8549	0,4691						
dur3 t1	0,7911	0,6289						
dur3 t2	0,7758	0,6624	Δ dur3 2mM	0,8052	0,6397			
dur3 t3	0,8488	0,6277						
ubp3nt1	0,7056	0,6985						
ubp3nt2	0,7430	0,6960	Δ ubp3 0mM	0,7415	0,6632	Δ ubp3	0,0141	0,2409
ubp3nt3	0,7758	0,5952						
ubp3t`1	0,9644	0,6830						
ubp3t`2	0,9553	0,8640	Δ ubp33 2mM	0,9552	0,7537			
ubp3t`3	0,9458	0,7140						
bre5nt1	0,4943	0,9832						
bre5nt2	0,5020	0,7401	Δ bre5 0mM	0,5041	0,8979	Δ bre5	0,0007	0,5685
bre5nt3	0,5159	0,9703						
bre5t`1	0,9346	0,9775						
bre5t`2	0,9300	0,8721	Δ bre5 2mM	0,9278	0,9314			
bre5t`3	0,9187	0,9446						
WTnt1	1,171793128	0,731827619						
WTnt2	1,189872606	0,652875201	WT 0mM YPD	1,1773	0,7057	WT YPD	0,4717	0,0300
WTnt3	1,170272266	0,73236804						

WTt1	1,175636132	0,804477375						
WTt2	1,173846788	0,784914158	WT 1mM YPD	1,1722	0,8045			
WTt3	1,167098369	0,824082091						
tpo1nt1	0,787611317	0,730749352						
tpo1nt2	0,797537001	0,728478392	$\Delta tpo1$ 0mM	0,8026	0,7355	$\Delta tpo1$ YPD	0,0179	0,2745
tpo1nt3	0,822510156	0,74720457						
tpo1t1	0,711784603	0,736747883						
tpo1t2	0,722639053	0,776361521	$\Delta tpo1$ 1mM	0,7154	0,7559			
tpo1t3	0,711695019	0,75468814						

ANEXO II

Script para o o pacote *R*:

```
library(growthcurver)

experimento <- read_excel("~/Direção do arquivo em formato excel ")

View(experimento)

gc_out <- SummarizeGrowthByPlate(experimento)

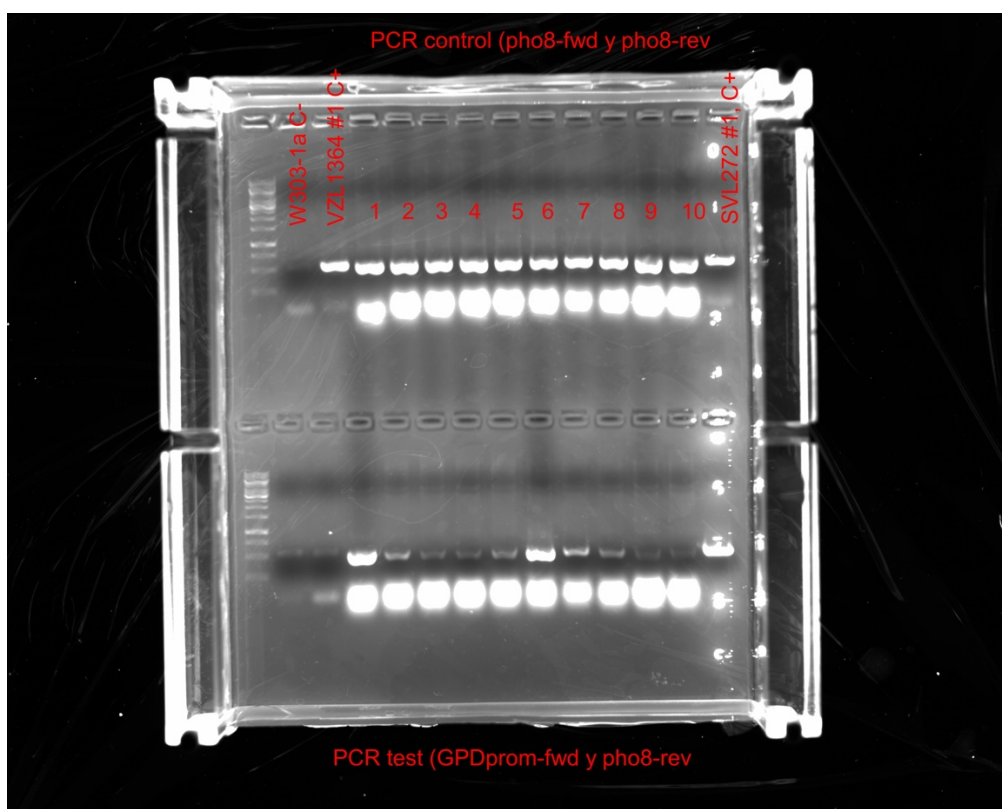
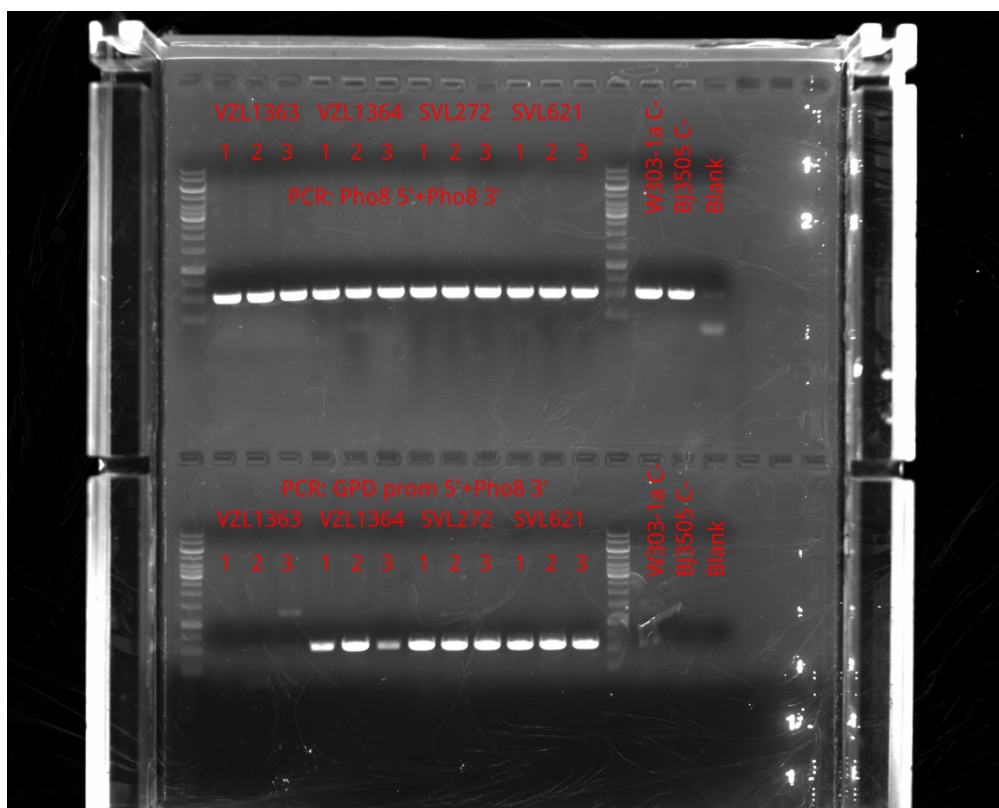
gc_out <- SummarizeGrowthByPlate(d, plot_fit = TRUE, plot_file = "experimento.pdf")

gc_out

output_file_name <- "~/Direção para guardar o OUTPUT dos parâmetros /experimento.txt"

write.table(gc_out, file = output_file_name,
            quote = FALSE, sep = "\t", row.names = FALSE)
```


ANEXO III



ANEXO IV

TermFinder results (PROCESS)-Sensíveis ao GC7

GOLD	GO_term	Cluster frequency	Background frequency	P-value	FDR	Expected FP	Gene(s) annotated to the term
44249	cellular biosynthetic process	45 out of 92 genes, 48.9%	1264 out of 4735 background genes, 26.7%	0.00187	0	0	ETR1/YBR026C:GRS1/YBR121C:TPS1/YBR126C:PER1/YCR044C:IMG1/YCR046C:THR4/YCR053W:DHH1/YDL160C:PPH22/YDL188C:TRP1/YDR007W:REG1/YDR028C:HKR1/YDR420W:MOT2/YER068W:ARG5,6/YER069W:HOS2/YGL1194C:GCN1/YGL195W:RSM27/YGR215W:OPI1/YHL020C:THR1/YHR025W:SSZ1/YHR064C:STB5/YHR178W:CST6/YIL036W:ZAP1/YJL056C:ARG2/YJL071W:LAC1/YKL008C:SPE1/YKL184W:EAP1/YKL204W:ACE2/YLR131C:CKI1/YLR133W:EST1/YLR233C:ELO3/YLR372W:VPS36/YLR417W:AMD1/YML035C:GIM5/YML094W:NPL6/YMR091C:SPT21/YMR179W:PHO23/YNL097C:GIM3/YNL153C:GCR2/YNL199C:PDR17/YNL264C:CSE2/YNR010W:ALG12/YNR030W:SPE2/YOL052C:ORT1/YOR130C:ROX1/YPR065W:SPE3/YPR069C
1901576	organic substance biosynthetic process	45 out of 92 genes, 48.9%	1289 out of 4735 background genes, 27.2%	0.00331	0	0	ETR1/YBR026C:GRS1/YBR121C:TPS1/YBR126C:PER1/YCR044C:IMG1/YCR046C:THR4/YCR053W:DHH1/YDL160C:

							PPH22/YDL188C:T RP1/YDR007W:RE G1/YDR028C:HKR1 /YDR420W:MOT2/Y ER068W:ARG5,6/Y ER069W:HOS2/YG L194C:GCN1/YGL1 95W:RSM27/YGR21 5W:OPI1/YHL020C: THR1/YHR025W:SS Z1/YHR064C:STB5/ YHR178W:CST6/YI L036W:ZAP1/YJL0 56C:ARG2/YJL071 W:LAC1/YKL008C: SPE1/YKL184W:EA P1/YKL204W:ACE2 /YLR131C:CKI1/YL R133W:EST1/YLR2 33C:ELO3/YLR372 W:VPS36/YLR417W :AMD1/YML035C:G IM5/YML094W:NPL 6/YMR091C:SPT21/ YMR179W:PHO23/ YNL097C:GIM3/YN L153C:GCR2/YNL1 99C:PDR17/YNL26 4C:CSE2/YNR010W :ALG12/YNR030W: SPE2/YOL052C:OR T1/YOR130C:ROX1 /YPR065W:SPE3/Y PR069C
9058	biosynthetic process	45 out of 92 genes, 48.9%	1304 out of 4735 background genes, 27.5%	0.00461	0	0	ETR1/YBR026C:GR S1/YBR121C:TPS1/ YBR126C:PER1/YC R044C:IMG1/YCR0 46C:THR4/YCR053 W:DHH1/YDL160C: PPH22/YDL188C:T RP1/YDR007W:RE G1/YDR028C:HKR1 /YDR420W:MOT2/Y ER068W:ARG5,6/Y ER069W:HOS2/YG L194C:GCN1/YGL1 95W:RSM27/YGR21 5W:OPI1/YHL020C: THR1/YHR025W:SS Z1/YHR064C:STB5/ YHR178W:CST6/YI L036W:ZAP1/YJL0 56C:ARG2/YJL071 W:LAC1/YKL008C:

							SPE1/YKL184W:EA P1/YKL204W:ACE2 /YLR131C:CKI1/YL R133W:EST1/YLR2 33C:ELO3/YLR372 W:VPS36/YLR417W :AMD1/YML035C:G IM5/YML094W:NPL 6/YMR091C:SPT21/ YMR179W:PHO23/ YNL097C:GIM3/YN L153C:GCR2/YNL1 99C:PDR17/YNL26 4C:CSE2/YNR010W :ALG12/YNR030W: SPE2/YOL052C:OR T1/YOR130C:ROX1 /YPR065W:SPE3/Y PR069C
42401	cellular biogenic amine biosynthetic process	4 out of 92 genes, 4.3%	9 out of 4735 background genes, 0.2%	0.0082	0	0	TRP1/YDR007W:SP E1/YKL184W:SPE2/ YOL052C:SPE3/YP R069C
9309	amine biosynthetic process	4 out of 92 genes, 4.3%	9 out of 4735 background genes, 0.2%	0.0082	0	0	TRP1/YDR007W:SP E1/YKL184W:SPE2/ YOL052C:SPE3/YP R069C
6596	polyamine biosynthetic process	3 out of 92 genes, 3.3%	4 out of 4735 background genes, 0.1%	0.0147	0	0	SPE1/YKL184W:SP E2/YOL052C:SPE3/ YPR069C
16053	organic acid biosynthetic process	11 out of 92 genes, 12.0%	130 out of 4735 background genes, 2.7%	0.01859	0	0	ETR1/YBR026C:TH R4/YCR053W:TRP1 /YDR007W:ARG5,6/ YER069W:THR1/YH R025W:ARG2/YJL0 71W:SPE1/YKL184 W:ELO3/YLR372W: SPE2/YOL052C:OR T1/YOR130C:SPE3/ YPR069C
46394	carboxylic acid biosynthetic process	11 out of 92 genes, 12.0%	130 out of 4735 background genes, 2.7%	0.01859	0	0	ETR1/YBR026C:TH R4/YCR053W:TRP1 /YDR007W:ARG5,6/ YER069W:THR1/YH R025W:ARG2/YJL0

							71W:SPE1/YKL184 W:ELO3/YLR372W: SPE2/YOL052C:OR T1/YOR130C:SPE3/ YPR069C
31326	regulation of cellular biosynthetic process	24 out of 92 genes, 26.1%	551 out of 4735 background genes, 11.6%	0.04592	0	0	DHH1/YDL160C:PP H22/YDL188C:REG 1/YDR028C:MOT2/ YER068W:ARG5,6/ YER069W:HOS2/Y GL194C:GCN1/YGL 195W:OPI1/YHL020 C:SSZ1/YHR064C: STB5/YHR178W:CS T6/YIL036W:ZAP1/ YJL056C:EAP1/YK L204W:ACE2/YLR1 31C:EST1/YLR233 C:VPS36/YLR417W :GIM5/YML094W:S PT21/YMR179W:PH O23/YNL097C:GIM 3/YNL153C:GCR2/Y NL199C:PDR17/YN L264C:CSE2/YNR0 10W:ROX1/YPR065 W
9889	regulation of biosynthetic process	24 out of 92 genes, 26.1%	553 out of 4735 background genes, 11.7%	0.04867	0	0	DHH1/YDL160C:PP H22/YDL188C:REG 1/YDR028C:MOT2/ YER068W:ARG5,6/ YER069W:HOS2/Y GL194C:GCN1/YGL 195W:OPI1/YHL020 C:SSZ1/YHR064C: STB5/YHR178W:CS T6/YIL036W:ZAP1/ YJL056C:EAP1/YK L204W:ACE2/YLR1 31C:EST1/YLR233 C:VPS36/YLR417W :GIM5/YML094W:S PT21/YMR179W:PH O23/YNL097C:GIM 3/YNL153C:GCR2/Y NL199C:PDR17/YN L264C:CSE2/YNR0 10W:ROX1/YPR065 W

ANEXO V

TermFinder results (PROCESS)-Resistentes ao GC7

GOLD	GO_term	Cluster frequency	Background frequency	P-value	FDR	Expected FP	Gene(s) annotated to the term
45851	pH reduction	7 out of 103 genes, 6.8%	25 out of 4735 background genes, 0.5%	0.0003	0	0	VPS3/YDR495C:VMA3/YEL027W:VMA16/YHR026W:VMA22/YHR060W:VP H2/YKL119C:VMA6/YLR447C:VMA11/YPL234C
51452	intracellular pH reduction	7 out of 103 genes, 6.8%	25 out of 4735 background genes, 0.5%	0.0003	0	0	VPS3/YDR495C:VMA3/YEL027W:VMA16/YHR026W:VMA22/YHR060W:VP H2/YKL119C:VMA6/YLR447C:VMA11/YPL234C
7035	vacuolar acidification	7 out of 103 genes, 6.8%	25 out of 4735 background genes, 0.5%	0.0003	0	0	VPS3/YDR495C:VMA3/YEL027W:VMA16/YHR026W:VMA22/YHR060W:VP H2/YKL119C:VMA6/YLR447C:VMA11/YPL234C
30641	regulation of cellular pH	7 out of 103 genes, 6.8%	27 out of 4735 background genes, 0.6%	0.00054	0	0	VPS3/YDR495C:VMA3/YEL027W:VMA16/YHR026W:VMA22/YHR060W:VP H2/YKL119C:VMA6/YLR447C:VMA11/YPL234C
51453	regulation of intracellular pH	7 out of 103 genes, 6.8%	27 out of 4735 background genes, 0.6%	0.00054	0	0	VPS3/YDR495C:VMA3/YEL027W:VMA16/YHR026W:VMA22/YHR060W:VP H2/YKL119C:VMA6/YLR447C:VMA11/YPL234C
6885	regulation of pH	7 out of 103 genes, 6.8%	29 out of 4735 background genes, 0.6%	0.00091	0	0	VPS3/YDR495C:VMA3/YEL027W:VMA16/YHR026W:VMA22/YHR060W:VP H2/YKL119C:VMA6/YLR447C:VMA11/YPL234C

30004	cellular monovalent inorganic cation homeostasis	7 out of 103 genes, 6.8%	36 out of 4735 background genes, 0.8%	0.0043	0.01	0.06	VPS3/YDR495C:VMA3/YEL027W:VMA16/YHR026W:VMA22/YHR060W:VP H2/YKL119C:VMA6/YLR447C:VMA11/YPL234C
55067	monovalent inorganic cation homeostasis	7 out of 103 genes, 6.8%	39 out of 4735 background genes, 0.8%	0.00752	0.01	0.06	VPS3/YDR495C:VMA3/YEL027W:VMA16/YHR026W:VMA22/YHR060W:VP H2/YKL119C:VMA6/YLR447C:VMA11/YPL234C
70070	proton-transporting V-type ATPase complex assembly	3 out of 103 genes, 2.9%	5 out of 4735 background genes, 0.1%	0.04466	0.01	0.08	VMA21/YGR105W:VMA22/YHR060W:VPH2/YKL119C
70072	vacuolar proton-transporting V-type ATPase complex assembly	3 out of 103 genes, 2.9%	5 out of 4735 background genes, 0.1%	0.04466	0.01	0.08	VMA21/YGR105W:VMA22/YHR060W:VPH2/YKL119C

ANEXO VI

TermFinder results (COMPONENT)-Resistentes ao GC7

GOID	GO_term	Cluster frequency	Background frequency	P-value	FDR	Expected FP	Gene(s) annotated to the term
32991	macromolecular complex	51 out of 103 genes, 49.5%	1255 out of 4735 background genes, 26.5%	5.11E-05	0	0	ATG14/YBR128C:SNF5/YBR289W:SRO9/YCL037C:MDH3/YDL078C:RPP1B/YDL130W:VPS54/YDR027C:RGP1/YDR137W:SND1/YDR186C:REF2/YDR195W:XRS2/YDR369C:SPT3/YDR392W:RPL27B/YDR471W:VPS3/YDR495C:RIP1/YEL024W:VMA3/YEL027W:UBP3/YER151C:RPO41/YFL036W:GET1/YGL020C:RPL7A/YGL076C:DBP3/YGL078C:SNF4/YGL115W:RPL8A/YHL033C:VMA16/YHR026W:PIH1/YHR034C:SRB2/YHR041C:VMA22/YHR060W:IST3/YIR005W:TIF2/YJL138C:VP55/YJR044C:RPL14A/YKL006W:NUP120/YKL057C:VPH2/YKL119C:UBI4/YL039C:SDH2/YLL041C:RPL22A/YLR061W:VP53/YLR396C:VMA6/YLR447C:UBX2/YML013W:RPS18B/YML026C:UBC7/YMR022W:UBP8/YMR223W:RPL20A/YMR242C:CUE1/YMR264W:JJJ1/YNL227C:BRE5/YNR051C:TOP1/YOL006C:ARP8/YOR141C:PET123/YOR158W:VMA11/YPL234C:MAK3/YPR051W:BRR1/YPR057W
220	vacuolar proton-transporting V-type ATPase, V0	4 out of 103 genes, 3.9%	6 out of 4735 background genes, 0.1%	0.0004	0	0	VMA3/YEL027W:VMA16/YHR026W:VMA6/YLR447C:VMA11/YPL234C

	domain						
33179	proton-transporting V-type ATPase, V0 domain	4 out of 103 genes, 3.9%	6 out of 4735 background genes, 0.1%	0.0004	0	0	VMA3/YEL027 W:VMA16/YHR 026W:VMA6/YL R447C:VMA11/ YPL234C
22625	cytosolic large ribosomal subunit	8 out of 103 genes, 7.8%	68 out of 4735 background genes, 1.4%	0.01265	0.01	0.02	RPP1B/YDL130 W:RPL27B/YDR 471W:RPL7A/Y GL076C:RPL8A /YHL033C:RPL 14A/YKL006W: RPL22A/YLR06 1W:RPL20A/YM R242C:JJJ1/YN L227C
43234	protein complex	29 out of 103 genes, 28.2%	660 out of 4735 background genes, 13.9%	0.0138	0	0.02	SNF5/YBR289 W:VPS54/YDR0 27C:RGP1/YDR 137W:REF2/YD R195W:XRS2/Y DR369C:SPT3/ YDR392W:VPS 3/YDR495C:RIP 1/YEL024W:VM A3/YEL027W:U BP3/YER151C: GET1/YGL020C :SNF4/YGL115 W:VMA16/YHR 026W:PIH1/YH R034C:SRB2/Y HR041C:VMA22 /YHR060W:IST3 /YIR005W:TIF2/ YJL138C:VPS5 5/YJR044C:NU P120/YKL057C: VPH2/YKL119C :SDH2/YLL041 C:VPS33/YLR3 96C:VMA6/YLR 447C:UBP8/YM R223W:BRE5/Y NR051C:TOP1/ YOL006C:ARP8 /YOR141C:VMA 11/YPL234C
33177	proton-transporting two-sector ATPase complex, proton-transporting domain	4 out of 103 genes, 3.9%	13 out of 4735 background genes, 0.3%	0.01714	0	0.02	VMA3/YEL027 W:VMA16/YHR 026W:VMA6/YL R447C:VMA11/ YPL234C
44446	intracellular organelle part	54 out of 103 genes, 52.4%	1651 out of 4735 background genes, 34.9%	0.02175	0	0.02	ATG14/YBR128 C:SNF5/YBR28 9W:MDH3/YDL0 78C:RPP1B/YD L130W:VPS54/ YDR027C:RGP 1/YDR137W:RE F2/YDR195W:X RS2/YDR369C: SPT3/YDR392W

							:RPL27B/YDR4 71W:VPS3/YDR 495C:RIP1/YEL 024W:VMA3/YE L027W:HEM14/ YER014W:RPO 41/YFL036W:G ET1/YGL020C: RPL7A/YGL076 C:DBP3/YGL07 8C:SNF4/YGL1 15W:VMA21/YG R105W:SHY1/Y GR112W:NSR1/ YGR159C:RPL8 A/YHL033C:VM A16/YHR026W: SRB2/YHR041C :VMA22/YHR06 0W:APQ12/YIL0 40W:IST3/YIR0 05W:SNA3/YJL 151C:VPS55/YJ R044C:RPL14A /YKL006W:NUP 120/YKL057C:V PH2/YKL119C: SDH2/YLL041C :RPL22A/YLR0 61W:ARV1/YLR 242C:VPS33/YL R396C:VMA6/Y LR447C:UBX2/ YML013W:RPS 18B/YML026C: UBC7/YMR022 W:ABF2/YMR07 2W:ATP25/YMR 098C:UBP8/YM R223W:RPL20A /YMR242C:CUE 1/YMR264W:JJ J1/YNL227C:S WM2/YNR004W :TOP1/YOL006 C:ARP8/YOR14 1C:PET123/YO R158W:TGS1/Y PL157W:VMA1 1/YPL234C:BR R1/YPR057W
44422	organelle part	54 out of 103 genes, 52.4%	1659 out of 4735 background genes, 35.0%	0.0251	0	0.02	ATG14/YBR128 C:SNF5/YBR28 9W:MDH3/YDL0 78C:RPP1B/YD L130W:VPS54/ YDR027C:RGP 1/YDR137W:RE F2/YDR195W:X RS2/YDR369C: SPT3/YDR392W :RPL27B/YDR4 71W:VPS3/YDR 495C:RIP1/YEL 024W:VMA3/YE L027W:HEM14/ YER014W:RPO 41/YFL036W:G ET1/YGL020C: RPL7A/YGL076 C:DBP3/YGL07 8C:SNF4/YGL1 15W:VMA21/YG R105W:SHY1/Y

							GR112W:NSR1/ YGR159C:RPL8 A/YHL033C:VM A16/YHR026W: SRB2/YHR041C :VMA22/YHR06 0W:APQ12/YIL0 40W:IST3/YIR0 05W:SNA3/YJL 151C:VPS55/YJ R044C:RPL14A /YKL006W:NUP 120/YKL057C:V PH2/YKL119C: SDH2/YLL041C :RPL22A/YLR0 61W:ARV1/YLR 242C:VPS33/YL R396C:VMA6/Y LR447C:UBX2/ YML013W:RPS 18B/YML026C: UBC7/YMR022 W:ABF2/YMR07 2W:ATP25/YMR 098C:UBP8/YM R223W:RPL20A /YMR242C:CUE 1/YMR264W:JJ J1/YNL227C:S WM2/YNR004W :TOP1/YOL006 C:ARP8/YOR14 1C:PET123/YO R158W:TGS1/Y PL157W:VMA1 1/YPL234C:BR R1/YPR057W
837	Doa10p ubiquitin ligase complex	3 out of 103 genes, 2.9%	6 out of 4735 background genes, 0.1%	0.02517	0	0.02	UBX2/YML013 W:UBC7/YMR0 22W:CUE1/YM R264W
16471	vacuolar proton- transporting V-type ATPase complex	4 out of 103 genes, 3.9%	16 out of 4735 background genes, 0.3%	0.04149	0	0.02	VMA3/YEL027 W:VMA16/YHR 026W:VMA6/YL R447C:VMA11/ YPL234C
33176	proton- transporting V-type ATPase complex	4 out of 103 genes, 3.9%	16 out of 4735 background genes, 0.3%	0.04149	0	0.02	VMA3/YEL027 W:VMA16/YHR 026W:VMA6/YL R447C:VMA11/ YPL234C