

unesp

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE QUÍMICA**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**Caracterização funcional de
eIF5A: análise genética e
molecular utilizando o modelo
de *Saccharomyces cerevisiae***

CLESLEI FERNANDO ZANELLI

Tese de doutorado
2006



CLESLEI FERNANDO ZANELLI

Caracterização funcional de eIF5A: análise
genética e molecular utilizando o modelo de
Saccharomyces cerevisiae

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini

Araraquara-SP
2006

DEDICATÓRIA

A meus pais, Aparecida Minin Zanelli e Arvelino Zanelli, e meus irmãos, José Aldo, Dalva, Cristina, Tadeu, Queila e Andréia pelo amor, carinho, exemplo, incentivo e suporte em todos os momentos.

A meus amigos, pela convivência e compartilhamento de momentos incríveis de minha vida.

AGRADECIMENTOS

A meu orientador, que cumpriu muito mais do que seu papel em minha orientação, pela oportunidade, pelo incentivo, pelo apoio, pela confiança e, acima de tudo, compreensão.

A Profa. Dra. Pamela Silver, por ter-me aceitado como aluno visitante em seu laboratório durante meu estágio de doutorando no exterior (“Sandwich” - CAPES).

A FAPESP e a CAPES, pelo apoio financeiro.

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas e o Departamento de Ciências Biológicas, por ter possibilitado a realização de todo o trabalho experimental.

A todos meus colegas de laboratório, Gloria, Mariana, Suzana, Wagner, Ana Letícia, Ana Paula, Carlos Alberto, José Rodrigo, Rogério, Veridiana, Luciano, Camila, Marcus, Mike e tantos outros, pelo convívio saudável e apoio em todos os momentos no laboratório.

À seção de Pós-graduação e aos docentes do Programa de Biotecnologia.

A bibliotecária Irani (FCF), pelo auxílio na revisão bibliográfica deste trabalho.

Mude (Clarice Lispector)

Mas comece devagar,
porque a direção é mais importante
que a velocidade.

Sente-se em outra cadeira,
no outro lado da mesa.
Mais tarde, mude de mesa.

Quando sair,
procure andar pelo outro lado da rua.
Depois, mude de caminho,
ande por outras ruas,
calmamente,
observando com atenção
os lugares por onde
você passa.

Tome outros ônibus.
Mude por uns tempos o estilo das roupas.
Dê os teus sapatos velhos.
Procure andar descalço alguns dias.

Tire uma tarde inteira
para passear livremente na praia,
ou no parque,
e ouvir o canto dos passarinhos.

Veja o mundo de outras perspectivas.
Abra e feche as gavetas
e portas com a mão esquerda.

Durma no outro lado da cama...
depois, procure dormir em outras camas.

Assista a outros programas de tv,
compre outros jornais...
leia outros livros,
Viva outros romances.

Não faça do hábito um estilo de vida.
Ame a novidade.
Durma mais tarde.
Durma mais cedo.

Aprenda uma palavra nova por dia
numa outra língua.
Corrija a postura.
Coma um pouco menos,
escolha comidas diferentes,
novos temperos, novas cores,
novas delícias.

Tente o novo todo dia.
o novo lado,
o novo método,
o novo sabor,
o novo jeito,
o novo prazer,
o novo amor.
a nova vida.

Tente.
Busque novos amigos.
Tente novos amores.

Faça novas relações.

Almoce em outros locais,
vá a outros restaurantes,
tome outro tipo de bebida
compre pão em outra padaria.
Almoce mais cedo,
jante mais tarde ou vice-versa.

Escolha outro mercado...
outra marca de sabonete,
outro creme dental...
tome banho em novos horários.

Use canetas de outras cores.
Vá passear em outros lugares.
Ame muito,
cada vez mais,
de modos diferentes.

Troque de bolsa,
de carteira,
de malas,
troque de carro,
compre novos óculos,
escreva outras poesias.

Jogue os velhos relógios,
quebre delicadamente
esses horrorosos despertadores.

Abra conta em outro banco.
Vá a outros cinemas,
outros cabeleireiros,
outros teatros,
visite novos museus.

Mude.
Lembre-se de que a Vida é uma só.
E pense seriamente em arrumar um outro emprego,
uma nova ocupação,
um trabalho mais light,
mais prazeroso,
mais digno,
mais humano.

Se você não encontrar razões para ser livre,
invente-as.
Seja criativo.

E aproveite para fazer uma viagem despreziosa,
longa, se possível sem destino.

Experimente coisas novas.
Troque novamente.
Mude, de novo.
Experimente outra vez.

Você certamente conhecerá coisas melhores
e coisas piores do que as já conhecidas,
mas não é isso o que importa.
O mais importante é a mudança,
o movimento,
o dinamismo,
a energia.
Só o que está morto não muda !

RESUMO

O fator de início de tradução de eucariotos 5A (eIF5A) é uma proteína altamente conservada desde arqueobactérias a mamíferos e sofre uma modificação pós-traducional única, necessária para sua maturação funcional, chamada de hipusinação. Apesar do grau de conservação de eIF5A, e da essencialidade de sua função nos organismos estudados, seu papel no metabolismo celular ainda se encontra indeterminado. Vários mutantes condicionais de eIF5A, sensíveis ao aumento de temperatura, têm sido isolados e caracterizados na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Utilizando um desses mutantes de eIF5A, o alelo *tif51A-1*, foi isolado o gene *PKC1* como um supressor em alto número de cópias do fenótipo de sensibilidade a temperatura deste mutante. O entendimento de como se dá esta interação genética foi um dos enfoques deste trabalho. Foi mostrado que a via de MAP quinases que atua abaixo de Pkc1 não é responsável pela supressão deste mutante e a identificação dos novos supressores do mutante *tif51A-1*, *GIC1* e *ZDS1*, levou à sugestão de uma nova via de sinalização a partir de Pkc1. Com a realização de experimentos subsequentes, foi confirmado que a nova via Pkc1-Zds1-Gic1 é responsável pela supressão do mutante *tif51A-1* promovida por *PKC1*. Além disso, estes três supressores são importantes para a polaridade celular em *S. cerevisiae*, um processo essencial para a progressão no ciclo celular deste organismo, e, interessante, os mutantes *tif51A-1* e *tif51A-3* de eIF5A evidenciaram defeitos na polarização do citoesqueleto de actina na temperatura não permissiva. Esses dados evidenciam uma correlação de eIF5A com progressão no ciclo celular de *S. cerevisiae*. Como eIF5A foi inicialmente envolvido com o processo de tradução, no intuito de avaliar melhor a função específica deste fator, foram

realizados ensaios de perfil polissomal e foi mostrado que eIF5A se associa a monossomos de uma maneira dependente à tradução e, além disso, mutantes de eIF5A exibem alterações no perfil polissomal que sugerem um possível defeito na etapa da elongação da tradução. Uma vez que outros estudos mostraram que eIF5A não é essencial para a síntese protéica de uma maneira geral, foi proposto na literatura que este fator seja necessário para a tradução de um subgrupo específico de mensageiros. Para investigar esta hipótese, foi analisado o perfil traducional do mutante *tif51A-1* por ensaios de “microarray” e os resultados realmente sugerem que vários transcritos sejam diferencialmente traduzidos nesse mutante na temperatura restritiva. Assim, espera-se que os avanços gerados neste estudo contribuam para a definição de como eIF5A influencia o processo de tradução de mRNAs e, conseqüentemente, exerce controle da expressão gênica em nível traducional.

ABSTRACT

The eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) is a highly conserved protein from archaeobacteria to mammals and undergoes hypusination, an essential unique post-translational modification. Despite the high degree of conservation of eIF5A and its essential function in the studied organisms, its cellular role remains unclear. Several temperature-sensitive eIF5A mutants have been isolated and characterized in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Using one of these mutants, the *tif51A-1* allele, *PKC1* was identified as a high-copy suppressor of the temperature-sensitive phenotype shown by this mutant. The understanding of this genetic interaction was one of the aims of this work. It was shown that the MAP kinase cascade downstream Pkc1 is not responsible for this phenotypic suppression and the identification of the new *tif51A-1* suppressors, *GIC1* and *ZDS1*, suggested a new signaling pathway branching from Pkc1. Further analysis confirmed that Pkc1-Zds1-Gic1 constitute a new pathway that is responsible for *tif51A-1* mutant suppression promoted by *PKC1*. Moreover, these three suppressors are important for cell polarity in *S. cerevisiae*, an essential process for cell cycle progression in yeast, and, interestingly, the eIF5A mutants *tif51A-1* and *tif51A-3* showed defects in actin cytoskeleton polarization at the restrictive temperature. These data supported a connection between eIF5A and cell cycle progression in *S. cerevisiae*. As eIF5A was originally implicated in the process of translation, in order to better investigate the specific function of this factor, polysomal profiling analysis was performed and it was demonstrated that eIF5A interacts with monosomes in a translation dependent manner and, besides that, eIF5A mutants show altered polysomal distribution suggesting a possible defect in the elongation step of translation. As other studies showed that eIF5A is not essential for

general protein synthesis, it was proposed in the literature that this factor is necessary for translation of a specific subset of mRNAs. In order to explore this hypothesis, it was analyzed the translational profile of the *tif51A-1* mutant using microarray assays and the results indeed suggest that several transcripts are differentially translated in this mutant at the restrictive temperature. Therefore, it is expected that the achievements of this work contribute for a definition of how eIF5A affects the translation of mRNAs and, thus, exerts control of gene expression at the translational level.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema do mecanismo de início de tradução em eucariotos.	27
Figura 2. Mecanismo de ação da puromicina.	28
Figura 3. Esquema da biossíntese de hipusina em eIF5A.	29
Figura 4. Estrutura tridimensional de eIF5A de <i>S. cerevisiae</i> gerada a partir de modelagem por homologia utilizando a estrutura de eIF5A da arqueobactéria <i>Methanococcus jannaschii</i> .	30
Figura 5. Esquema da via para integridade celular em <i>S. cerevisiae</i> com destaque da via de MAP quinases que age abaixo de Pkc1.	31
Figura 6. A supressão do mutante <i>tif51A-1</i> por <i>PKC1</i> é independente da via de MAP quinases.	69
Figura 7. Avaliação do efeito do número de cópias de <i>TIF51B</i> na supressão do mutante <i>tif51A-1</i> .	73
Figura 8. Análise de especificidade alélica da supressão promovida por <i>GIC1</i> , <i>ZDS1</i> e <i>PKC1</i> em alto número de cópias.	74
Figura 9. Esquema simplificado das vias de sinalização que levam ao estabelecimento de um citoesqueleto polarizado no começo da transição G1/S do ciclo celular em <i>S. cerevisiae</i> .	75
Figura 10. A supressão do mutante <i>tif51A-1</i> por <i>PKC1</i> é dependente dos genes <i>ZDS1</i> e <i>ZDS2</i> .	76
Figura 11. A supressão do mutante <i>tif51A-1</i> requer diferentes fatores relacionados à progressão do ciclo celular.	77
Figura 12. Esquema da polaridade celular em <i>S. cerevisiae</i> ao longo do ciclo de divisão celular.	78
Figura 13. O defeito de citoesqueleto de actina do mutante <i>tif51A-1</i> também é suprimido pelos genes <i>GIC1</i> , <i>ZDS1</i> e <i>PKC1</i> .	79
Figura 14. Expressão de <i>GIC1</i> a partir de plasmídeo de alto número de cópias pode gerar células alongadas.	80
Figura 15. <i>GIC1</i> e <i>BNI1</i> em alto número de cópias suprimem o fenótipo temperatura-sensível de uma linhagem mutante de <i>pkc1</i> (<i>stt1</i>).	81

- Figura 16.** Análise da distribuição de eIF5A ao longo do perfil polissomal na linhagem selvagem W303 (SVL82). 91
- Figura 17.** Análise do perfil polissomal das linhagens selvagem (SVL82), *tif51A-1* (SVL14) e *tif51A-3* (SVL32) nas temperaturas permissiva e restritiva. 92
- Figura 18.** Modelo esquemático das vias que agem abaixo de Pkc1. 105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Linhagens de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas neste estudo.	53
Tabela 2. Plasmídeos utilizados neste estudo.	54
Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados neste estudo.	56
Tabela 4. Genes analisados quanto a sua habilidade de suprimir o fenótipo de sensibilidade a temperatura do mutante <i>tif51A-1</i> .	70
Tabela 5. Genes clonados no rastreamento de supressores do fenótipo de sensibilidade a temperatura do mutante <i>tif51A-1</i> .	72
Tabela 6. Resultados obtidos no perfil transcricional, em número de genes, para as condições permissiva e restritiva.	93
Tabela 7. Análise comparativa dos resultados obtidos nos experimentos de perfil transcricional e perfil traducional.	94
Tabela 8. Classificação utilizando ontologia genética para os transcritos de níveis significativamente ($P < 0.05$) diminuídos ($R < 1$) nas frações polissomais no mutante <i>tif51A-1</i> na temperatura restritiva.	95
Tabela 9. Descrição dos termos de ontologia genética usados na Tabela 8.	96
Tabela 10. Classificação utilizando ontologia genética para os transcritos de níveis significativamente ($P < 0.05$) aumentados ($R > 1$) no mutante <i>tif51A-1</i> na temperatura restritiva.	97
Tabela 11. Descrição dos termos de ontologia genética usados na Tabela 10.	98

ABREVIACOES UTILIZADAS

μg : micrograma

μF : microfaraday

μL : microlitro

cDNA: DNA complementar

C-terminal: carboxi-terminal

Cy3-dUTP: "cyanine-3'-dUTP"

Cy5-dUTP: "cyanine-5'-dUTP"

DNA:  cido desoxirribonucléico

dNTPs: desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP)

D.O.: densidade óptica

dT₁₅: politimidina oligonucleotídeo (15 nucleotídeos)

DTT: dition treitol

dUTP: desoxirribo-uridilato

EDTA:  cido etilenodiaminotetracético

HCl:  cido clorídrico

HIV-1: vírus da imunodeficiência humana 1

KCl: cloreto de potássio

kDa: quilodalton

KH₂PO₄: fosfato dibásico de potássio

kV: quilovolt

LB: meio Luria-Bertani

M: molar

Met-tRNA_i: metionil-tRNA iniciador

MgCl₂: cloreto de magnésio

mL: mililitro

mM: milimolar

MOPS: ácido 3-(N-Morfolino)propanossulfônico

mRNA: RNA mensageiro

NaCl: cloreto de sódio

NaOH: hidróxido de sódio

Na₂HPO₄ : fosfato monobásico de sódio

ng: nanograma

nm: nanômetro

N-terminal: amino-terminal

ORF: "Open Reading Frame" (janela aberta de leitura)

PBS: "Phosphate Buffered Saline" (solução salina tamponada com fosfato)

PCR: "Polymerase Chain Reaction" (reação de polimerase em cadeia)

PEG: polietilenoglicol

pH: potencial hidrogeniônico

RNA: ácido ribonucléico

RNase A: ribonuclease A

rRNA: RNA ribossomal

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

SDS: dodecil-sulfato de sódio

SSC: "sodium chloride, sodium citrate" (solução de cloreto e citrato de sódio)

S-SPO: "super-sporulation media" (meio para esporulação de levedura)

TE: Tris-EDTA

Tris: tris-hidroximetilaminometano

Triton-X 100: polietileno-glicol-tert-octilfenil éter

tRNA: RNA transportador

Tween 20: monolaurato de polietilenoglicol-sorbitana

U: unidade de atividade enzimática

x(vezes)g: gravidade

YEPD: meio extrato de levedura-peptona-dextrose

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	32
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1. Material	34
3.2. Métodos	34
3.2.1. Clonagem empregando Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)	34
3.2.1.1. <i>Reações de PCR</i>	34
3.2.1.2. <i>Clonagem do produto de PCR</i>	35
3.2.2. Transformação bacteriana por choque térmico	35
3.2.2.1. <i>Preparação de E. coli competente</i>	35
3.2.2.2. <i>Transformação</i>	35
3.2.3. Eletroporação de bactérias	36
3.2.3.1. <i>Preparação de E. coli eletrocompetente</i>	36
3.2.3.2. <i>Eletroporação</i>	36
3.2.4. Preparação de plasmídeos a partir de E. coli	37
3.2.4.1. <i>Em pequena escala - Miniprep</i>	37
3.2.4.2. <i>Em média escala – Midiprep</i>	37
3.2.5. Sequenciamento de DNA	38
3.2.5.1. <i>Reação</i>	38
3.2.5.2. <i>Precipitação e separação eletroforética</i>	38
3.2.6. Transformação de leveduras	38
3.2.7. Preparação de plasmídeos a partir de leveduras	39
3.2.8. Cruzamento e esporulação de leveduras	39
3.2.8.1. <i>Cruzamento</i>	39
3.2.8.2. <i>Esporulação</i>	40
3.2.9. Dissecção e caracterização de tétrades	40
3.2.10. Teste de sensibilidade a temperatura	40
3.2.11. Rastreamento de genes supressores em alto número de cópias	41
3.2.12. Marcação do citoesqueleto de actina com rodamina-faloidina	42

3.2.13. Perfil polissomal de levedura e análise das amostras fracionadas	42
3.2.13.1. <i>Preparação do gradiente de sacarose</i>	42
3.2.13.2. <i>Preparação do extrato e centrifugação dos gradientes</i>	43
3.2.13.3. <i>Fracionamento dos gradientes e coleta das frações</i>	44
3.2.13.4. <i>Extração de proteína e RNA a partir de gradientes de sacarose</i>	44
3.2.13.5. <i>Western blot</i>	46
3.2.14. Análise de expressão gênica por “microarray”	46
3.2.14.1. <i>Extração de RNA total de levedura a partir de lisados (perfil transcricional)</i>	46
3.2.14.2. <i>Extração de RNA total de levedura a partir de gradientes de sacarose (perfil traducional)</i>	47
3.2.14.3. <i>Síntese de cDNA</i>	49
3.2.14.4. <i>Marcação de cDNA com fluoróforos</i>	50
3.2.14.5. <i>Hibridização, lavagem e análise dos “microarrays”</i>	50
4. RESULTADOS	57
4.1. Análise da interação funcional entre Pkc1 e eIF5A	57
4.1.1. <i>Análise da supressão do fenótipo de sensibilidade a temperatura de tif51A-1 pelas MAP quinases</i>	57
4.1.2. <i>Novos supressores de tif51A-1 sugerem a existência de uma nova via de sinalização que liga Pkc1 à polaridade celular</i>	58
4.1.3. <i>O mutante tif51A-1 de eIF5A interage geneticamente com fatores da transição G1/S envolvidos com a polaridade celular e é importante para a correta organização do citoesqueleto de actina</i>	63
4.1.4. <i>A superexpressão de GIC1 pode causar hiperpolarização celular</i>	67
4.1.5. <i>GIC1 e BNI1 suprimem o defeito de crescimento de um mutante temperatura-sensível de PKC1</i>	68
4.2. Análise da expressão gênica diferencial de um mutante de eIF5A	82
4.2.1. <i>Distribuição de eIF5A e efeito de mutantes de eIF5A no perfil polissomal</i>	82
4.2.2. <i>Perfil traducional do mutante tif51A-1 de eIF5A</i>	85
5. DISCUSSÃO	99

5.1. A supressão do mutante de eIF5A por <i>PKC1</i> é independente da via de MAP quinases	99
5.2. Uma nova via de sinalização liga Pkc1 a Gic1, um efector de Cdc42	100
5.3. A função de eIF5A é importante para a organização do citoesqueleto de actina	103
5.4. Envolvimento de eIF5A com tradução e expressão gênica diferencial num mutante deste fator	106
6. CONCLUSÕES	110
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111
ANEXO I	124
ANEXO II	136
ANEXO III	151
ANEXO IV	155

1. INTRODUÇÃO

O entendimento da função de fatores altamente conservados e que são essenciais para a viabilidade celular tem-se mostrado de grande importância para a compreensão dos processos biológicos que ocorrem em uma célula. O fator de início de tradução de eucariotos 5A (eIF5A – *eukaryotic translation initiation factor 5A*) é um destes fatores.

eIF5A é altamente conservado desde arqueobactérias a eucariotos, sendo que as proteínas eIF5A de *Saccharomyces cerevisiae* e de mamíferos são 63% idênticas (Schnier e cols., 1991; Chen e Liu, 1997). No entanto, eIF5A não é encontrado em eubactérias, as quais possuem o homólogo estrutural EF-P, um provável fator de alongação de tradução (Hanawa-Suetsugu e cols., 2004).

eIF5A foi originalmente purificado a partir de ribossomos de lisados de reticulócitos de coelho e, subsequentemente, foi determinado como fator de início de tradução de eucariotos devido a sua capacidade de estimular de 2 a 3 vezes a síntese *in vitro* de metionil-puromicina (Benne e cols., 1978).

O início da tradução em eucariotos é uma etapa complexa da síntese protéica e do processo da expressão gênica de uma maneira geral, sendo amplamente regulado na célula (Pestova e cols., 2001). Como ilustrado na Figura 1, o início de tradução em eucariotos compreende uma série de passos, subsequentes e paralelos, que levam à montagem de um ribossomo com um mRNA, o qual, por sua vez, precisa estar corretamente posicionado com seu códon iniciador, comumente AUG, interagindo com o anti-códon de um Met-tRNA_i no sítio ribossomal P. O antibiótico puromicina é um análogo estrutural da extremidade 3' de um tRNA aminoacilado e pode ocupar o sítio ribossomal A possibilitando que seu radical

amino primário interaja com um Met-tRNA_i, reproduzindo a formação de uma ligação peptídica (Figura 2). O ensaio de metionil-puomicina mede a incorporação de metionina radioativa, a partir de Met-tRNA_i, à puomicina, através de catálise ribossomal, sendo, portanto, um ensaio bastante utilizado para avaliar a influência de diferentes fatores no início da tradução.

Apesar da capacidade evidente de eIF5A estimular a síntese de metionil-puomicina *in vitro* utilizando-se tripletes AUG ou mRNA de globina, a não adição de eIF5A não mostrou nenhum impacto sobre a síntese de globina *in vitro*, discordando, assim, de resultados obtidos na ausência dos outros fatores e início de tradução eIF1, eIF1A, eIF3, eIF5B e eIF5, também testados (Benne e Hershey, 1978). Além disso, eIF5A não pareceu influenciar a formação *in vitro* de complexo ternário ou a ligação do mRNA de globina ou do Met-tRNA_i à subunidade 40S (Benne e Hershey, 1978). A possibilidade de eIF5A atuar na elongação da tradução também foi considerada, mas nenhum efeito positivo foi observado com a adição de eIF5A em um sistema de síntese protéica para polimerização de poli-fenilalanina a partir de ácido poli-uridílico, e ribossomos 80S e fatores de elongação eEF1 e eEF2 purificados (Benne e Hershey, 1978). Em concordância com esse trabalho inicial de caracterização funcional de eIF5A em sistemas *in vitro*, foram publicados posteriormente estudos mostrando que a inibição da maturação funcional de eIF5A (discutido abaixo) não se correlaciona a uma repressão da tradução em células de mamífero, e que a depleção deste fator em *S. cerevisiae* leva a uma pequena diminuição (30%) da taxa de síntese protéica (Duncan e Hershey, 1986; Kang e Hershey, 1994; Zuk e Jacobson, 1998). Assim, apesar de eIF5A ter sido denominado inicialmente um fator de início de tradução, a sua função como tal nunca foi claramente demonstrada.

S. cerevisiae possui no seu genoma dois genes que codificam para eIF5A, *TIF51A* (*HYP2*) e *TIF51B* (*ANB1*). Estes genes são regulados transcricionalmente pelos níveis de oxigênio, sendo expressos respectivamente em condições aeróbicas e anaeróbicas. *TIF51A* é essencial para o crescimento em condições aeróbicas (Schnier e cols., 1991; Wohl e cols., 1993; Valentini e cols., 2002).

eIF5A possui 17 kDa e sofre duas modificações pós-traducionais. A primeira delas consiste na fosforilação do resíduo de serina acetilado do N-terminal (Kang e cols., 1993; Klier e cols., 1993). A remoção deste resíduo revelou que a forma não fosforilada deste fator é suficiente para promover o crescimento de células *tif51A*Δ haplóides (Klier e cols., 1993), sugerindo que a fosforilação de eIF5A não seja essencial para o funcionamento *in vivo*.

A segunda modificação deste fator é única na célula e corresponde à hipusinação de um resíduo de lisina (Chen e Liu, 1997; Park e cols., 1997). A formação do aminoácido hipusina (do inglês “hypusine: hydroxyputrescine-lysine”) ocorre através da transferência, pela desoxi-hipusina sintase, de um grupo aminobutil da espermidina para o amino grupo livre de uma lisina específica, seguido de hidroxilação deste grupo pela desoxi-hipusina hidroxilase (Figura 3). O grau de conservação, nas diferentes espécies, dos resíduos flanqueadores do sítio de hipusinação revela a grande importância deste aminoácido raro (Chen e Liu, 1997; Magdolen e cols., 1994). Mutação neste resíduo (K51R em *S. cerevisiae*) leva a produção de eIF5A não hipusinado, que não permite o crescimento de células onde *TIF51A* foi nocauteado (Schnier e cols., 1991). Adicionalmente, o gene codificador da enzima desoxi-hipusina sintase é essencial para o crescimento de *S. cerevisiae* (Park e cols., 1997; Sasaki e cols., 1996). Curiosamente, a etapa da hidroxilação parece não estar presente em várias arqueobactérias (Bartig e cols., 1990) e não é

essencial para o crescimento em *S. cerevisiae* (Thompson e cols., 2003; Park e cols., 2006); enquanto que em *S. pombe* a deleção do gene para desoxi-hipusina hidroxilase causa sensibilidade a temperatura (Weir e Yaffe, 2004). Estes dados mostram que a hipusinação ou, ao menos sua primeira etapa, é essencial para a função *in vivo* de eIF5A. O fato de eIF5A ser a única proteína eucariótica que sofre hipusinação fortalece a idéia de que este fator seja de fundamental importância no metabolismo celular.

As estruturas tridimensionais de homólogos de eIF5A de três espécies de arqueobactérias e, mais recentemente, de dois protozoários, foram determinadas e revelaram várias características comuns (Kim e cols., 1998; Peat e cols., 1998; Yao e cols., 2003). Segundo esses estudos, eIF5A trata-se de uma proteína dividida em dois domínios predominantemente compostos por folhas beta (Figura 4). A comparação destes domínios com outras proteínas de estruturas tridimensionais conhecidas mostra que o domínio N-terminal, o qual contém a hipusina, possui um dobramento classificado como “Translation Protein SH3-like motif”, o qual também está presente em várias proteínas ribossomais e fatores de alongação de tradução (<http://supfam.org/SUPERFAMILY>; Gough e cols., 2001). O domínio C-terminal, por sua vez, é similar a dobramentos de proteínas que se ligam a ácidos nucleicos de fita simples (“Single-stranded Oligonucleotide Binding Fold”), o qual está presente em proteínas de diferentes funções celulares que se ligam a RNA ou DNA fita simples (<http://supfam.org/SUPERFAMILY>; Gough e cols., 2001). De fato, dois trabalhos publicados tentam correlacionar a função de eIF5A com a ligação a mRNAs, porém a extensão de tais estudos ainda necessita ser ampliada para se estabelecer um papel de eIF5A na interação física direta com mRNAs (Xu e Chen, 2001; Xu e cols., 2004).

Como dito anteriormente, a função de eIF5A é ainda obscura, apesar de quase trinta anos de estudo sobre este fator. Como apresentado acima, embora eIF5A tenha sido considerado inicialmente um fator de início de tradução (Benne e cols., 1978), a depleção deste fator em leveduras causa uma pequena redução (30%) nos níveis de síntese protéica (Kang e Hershey, 1994; Zuk e Jacobson, 1998). Este dado mostra que eIF5A não é um fator essencial na síntese protéica de forma geral. Alternativamente, foi proposto que eIF5A seja um fator envolvido na tradução de um grupo específico de mensageiros, por exemplo, daqueles envolvidos na transição G1/S do ciclo celular (Kang e Hershey, 1994; Park e cols., 1997). Esta hipótese foi levantada devido à observação de que a inibição das duas enzimas envolvidas na hipusinação de eIF5A bloqueia a proliferação celular de diferentes linhagens de células de mamíferos (Hanuske-Abel e cols., 1994; Park e cols., 1994; Chen e cols., 1996; Shi e cols., 1996). Outras observações também evidenciam o envolvimento de eIF5A com proliferação celular. Por exemplo, a expressão de eIF5A é induzida em linfócitos T ativados (Bevec e cols., 1994). Experimentos utilizando *D. melanogaster* mostraram uma perda do controle no ciclo celular no início do desenvolvimento deste inseto em consequência da alteração dos níveis de eIF5A (Lee e cols., 2001). E, por fim, um aumento no número de células paradas na fase G1 do ciclo celular é observado após a depleção de eIF5A em *S. cerevisiae* (Kang e Hershey, 1994).

Embora proposto previamente que eIF5A seja um cofator celular da proteína Rev de HIV-1 e esteja envolvido na exportação dos mensageiros tardios deste vírus (Ruhl e cols., 1993; Bevec e cols., 1996; Bevec e Hauber, 1997; Elfgang e cols., 1999; Rosorius e cols., 1999), outros estudos não evidenciam o envolvimento de

eIF5A com transporte nucleocitoplasmático (Shi e cols., 1997; Henderson e Percipale, 1997; Valentini e cols., 2002; Jao e Chen, 2002).

O fator eIF5A está envolvido ainda com o decaimento de mRNA. Foi mostrado que o mutante condicional de *S. cerevisiae ts1159* carregando um alelo temperatura-sensível de *TIF51A* exibe um defeito na degradação de RNA mensageiros, acumulando “uncapped” mRNAs na temperatura não permissiva (Zuk e Jacobson, 1998). No entanto, o efeito de eIF5A na degradação de mRNAs parece ser secundário, uma vez que a parada do crescimento celular de mutantes temperatura-sensíveis de eIF5A não se correlaciona temporalmente com o acúmulo de mRNAs (Valentini e cols., 2002).

Três novos mutantes condicionais de *S. cerevisiae* para o gene *TIF51A* (*tif51A-1*, *tif51A-2* e *tif51A-3*) foram descritos e caracterizados em nosso laboratório (Valentini e cols., 2002). A caracterização destes alelos de *TIF51A* mostrou que todos são mutantes temperatura-sensíveis com perda de função na temperatura não permissiva devido à rápida degradação de eIF5A (Valentini e cols., 2002; Apponi, L.H., dados não publicados). Esses mutantes apresentam também defeito no decaimento de mRNAs na temperatura não permissiva. Nesse estudo foi mostrado que eIF5A apresenta uma localização citoplasmática com maior concentração perinuclear. O que está de acordo com sua localização em células de mamíferos, onde eIF5A localiza-se principalmente no citoplasma (Shi e cols., 1997; Jao e Chen, 2002). Esta localização perinuclear não é alterada em leveduras contendo um alelo temperatura-sensível de *XPO1*, gene que codifica para CRM1/exportina1 em leveduras, na temperatura não permissiva. Assim como acontece em mamíferos, o bloqueio da ação de exportina1 em leveduras leva a um acúmulo da proteína Rev de HIV-1 no núcleo. Desta forma, como não ocorre acúmulo de eIF5A nas mesmas

condições onde ocorre acúmulo de Rev, fica comprometido o envolvimento de eIF5A com a exportação de proteínas através do receptor CRM1/exportina1 (Valentini e cols., 2002).

Buscando clonar genes supressores do fenótipo temperatura-sensível do mutante *tif51A-1*, seis genes foram clonados: *PAB1*, *PKC1*, *WSC1*, *WSC2*, *WSC3* e *YOR137C*, uma ORF não caracterizada, denominada por nosso laboratório como *SIA1* (suppressor of eIF5A 1; Valentini e cols., 2002). *PAB1* (poly(A)-binding protein) codifica para a principal proteína que se liga a cauda de poli-adenina em *S. cerevisiae* e está relacionada a várias fases do metabolismo de mRNA, atuando nos processos de tradução e decaimento de mRNA (Coller e cols., 1998). O fato de *PAB1* ter sido isolado neste rastreamento pode vir a reforçar o envolvimento de eIF5A com tradução e decaimento de mRNA. Os outros quatro supressores são genes intimamente relacionados entre si. *WSC1*, *WSC2* e *WSC3* (cell wall integrity and stress response component 1-3) são genes homólogos em levedura que codificam para receptores de superfície celular relacionados à resposta a choque hiposmótico; e *PKC1*, por sua vez, codifica para a proteína quinase C de *S. cerevisiae*, a qual também participa da resposta a choque hiposmótico desencadeada por Wsc1-3 (Heinisch e cols. 1999). Nesse estudo, foi testado também se os supressores *PAB1* e *PKC1* são capazes de estabilizar a proteína do mutante *tif51A-1*, e os resultados obtidos mostraram que este não parece ser o mecanismo pelo qual estes genes geram supressão em alto número de cópias (Valentini e cols., 2002). Uma vez que mutantes com defeitos em componentes da via de Pkc1 mostram, entre outras características comuns, supressão do fenótipo de sensibilidade a temperatura por adição de sorbitol 1 M ao meio de cultura (Heinisch e cols., 1999), foi testado se os mutantes de *TIF51A* apresentam este fenótipo.

Como esperado, os mutantes *tif51A-1*, *tif51A-2* e *tif51A-3* têm sua termo-sensibilidade suprimida por sorbitol 1 M (Valentini e cols., 2002).

Em levedura, existe apenas um homólogo de proteína quinase C de mamífero, *PKC1*, o qual tem sido extensivamente estudado e relacionado a vários processos celulares de resposta a condições do ambiente (Heinisch e cols., 1999). Assim como ocorre em outros organismos, Pkc1 em leveduras comanda uma via de MAP quinases regulando positivamente o crescimento e a proliferação celular. Esta via de transdução de sinal em *S. cerevisiae* é composta por quatro quinases: Bck1, Mkk1, Mkk2 e Mpk1, sendo que as homólogas Mkk1 e Mkk2 são funcionalmente redundantes. Esta via ativada por Pkc1 está envolvida na resposta a vários fatores ambientais como presença de feromônio, baixa osmolaridade e aumento de temperatura, e é conhecida como via para integridade celular (Figura 5). Com a ativação da via de integridade celular culminando na fosforilação da MAP quinase Mpk1, dois fatores de transcrição levam a expressão de genes envolvidos na biogênese e organização da parede celular, assim como genes importantes para a transição G1/S no ciclo celular. Entretanto, a deleção do gene para Pkc1 gera um fenótipo muito mais severo que a deleção das quinases da via de MAP, o que sugere uma ramificação desta via de sinalização a partir de Pkc1 (Gustin e cols., 1998; Heinisch cols., 1999; Hohmann, 2002). De fato, Pkc1 tem sido envolvido com uma série de processos que ocorrem independentemente da via de MAP. Os mais importantes deles parecem ser: despolarização transiente do citoesqueleto de actina em resposta a danos de parede celular ocasionados por choque hiposmótico, choque térmico, dodecil-sulfato de sódio (SDS) e zimoliase (Delley e Hall, 1999); e repressão da transcrição de genes para proteínas ribossomais e tRNAs em resposta ao bloqueio da via secretória (Li e cols., 2000).

Não podemos deixar de observar, no entanto, que as ações de Pkc1 sobre diferentes alvos não são tão simples de se desconectar umas das outras, uma vez que elas acontecem de maneira coordenada gerando uma resposta final de adaptação às condições ambientais. Assim, Pkc1 é responsável pela despolarização transiente do citoesqueleto de actina em resposta a danos da parede celular, mas também é necessária para a repolarização dos cabos de actina após o reparo desses danos de superfície celular. A primeira ação é independente da via de MAP quinases, enquanto que a segunda requer esta via (Delley e Hall, 1999). Essas respostas refletem o papel de Pkc1 na adaptação celular às adversidades do meio, e para se entender melhor a relação genética entre *TIF51A* e *PKC1*, é necessário que se entenda em que processos desencadeados por Pkc1 eIF5A participa.

Como já discutido, apesar do grande número de estudos realizados com eIF5A desde seu descobrimento, o papel deste possível fator de início de tradução nos processos biológicos celulares ainda é controverso e indeterminado. A utilização do modelo de *S. cerevisiae*, com o isolamento de mutantes de eIF5A sensíveis a temperatura, possibilitou a descoberta de interações genéticas importantes do ponto de vista funcional (Valentini e cols., 2002). No entanto, para que se possa atribuir um papel para eIF5A no contexto celular é necessário entender melhor como essas relações acontecem funcionalmente. A análise da relação entre eIF5A e as diversas vias de sinalização intracelular envolvendo Pkc1 foi um dos enfoques deste trabalho de doutorado. Ainda, além das análises genéticas descritas acima, o envolvimento desse fator no controle da expressão gênica em nível traducional também foi investigado, na tentativa de se entender melhor o possível papel de eIF5A na tradução.

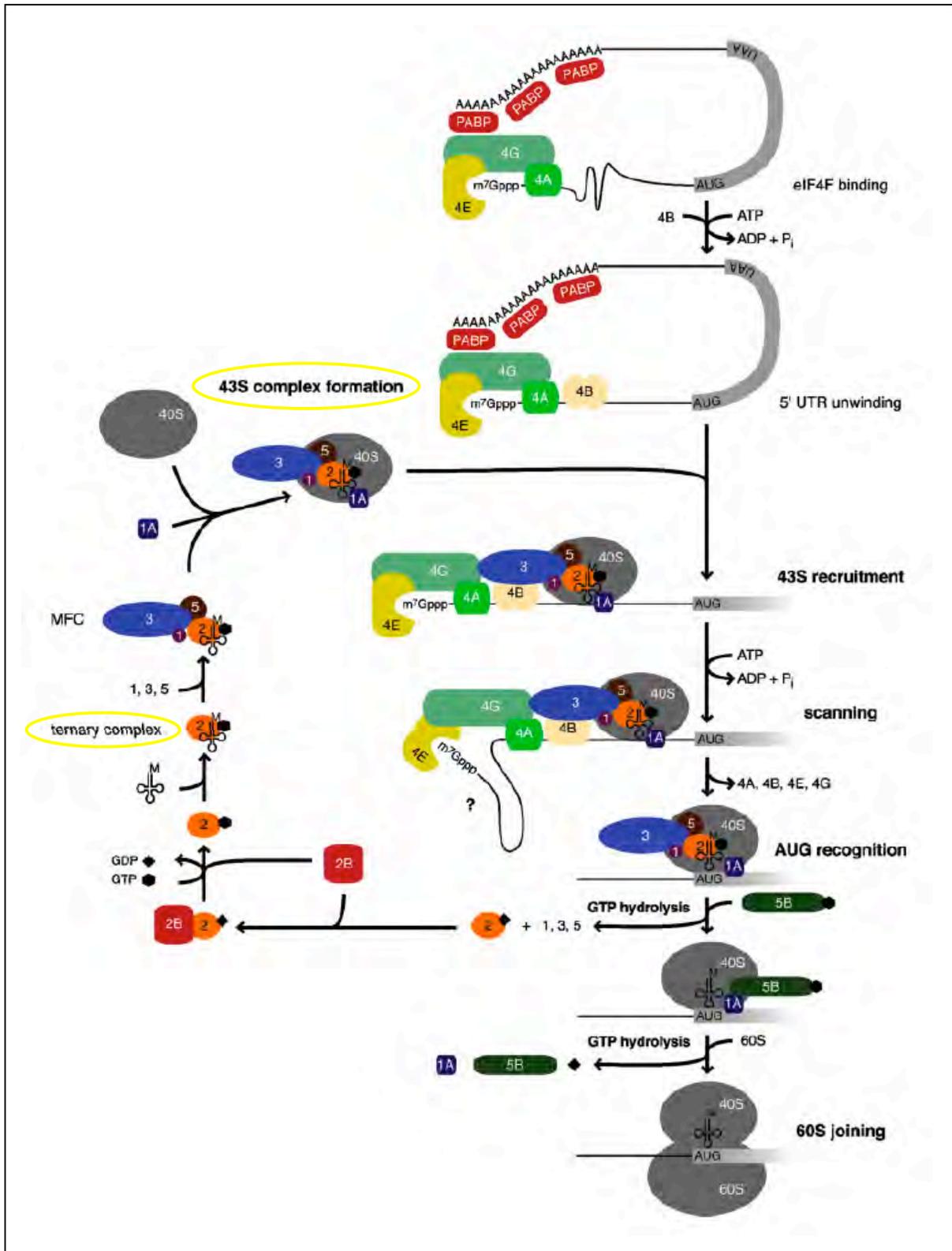


Figura 1. Esquema do mecanismo do início de tradução em eucariotos. Estão mostrados apenas os números ou números e letras que dão nome aos fatores de início de tradução de eucarioto após a sigla “eIF”. Os complexos ternário (“ternary complex”) e 43S (“43S complex”) estão circulos em amarelo. (Modificado de Preiss e Hentze, 2003)

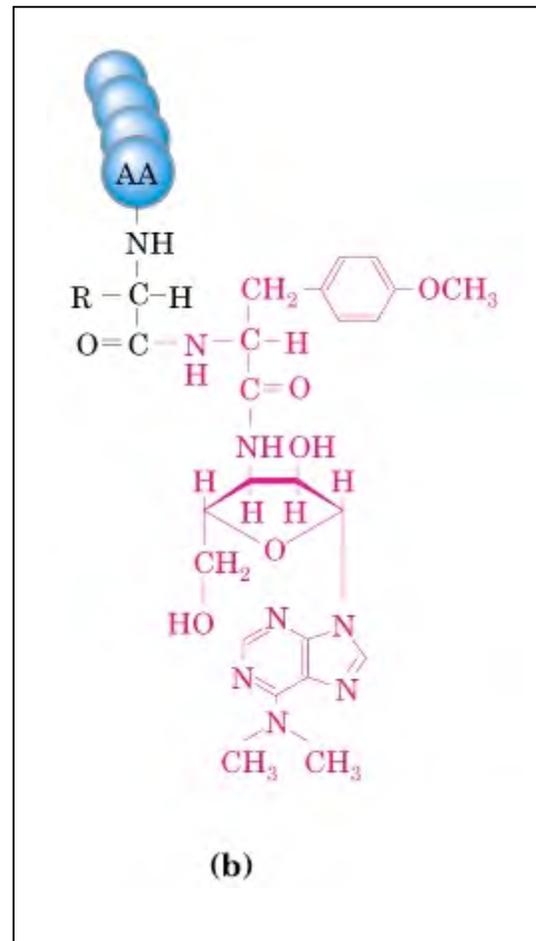
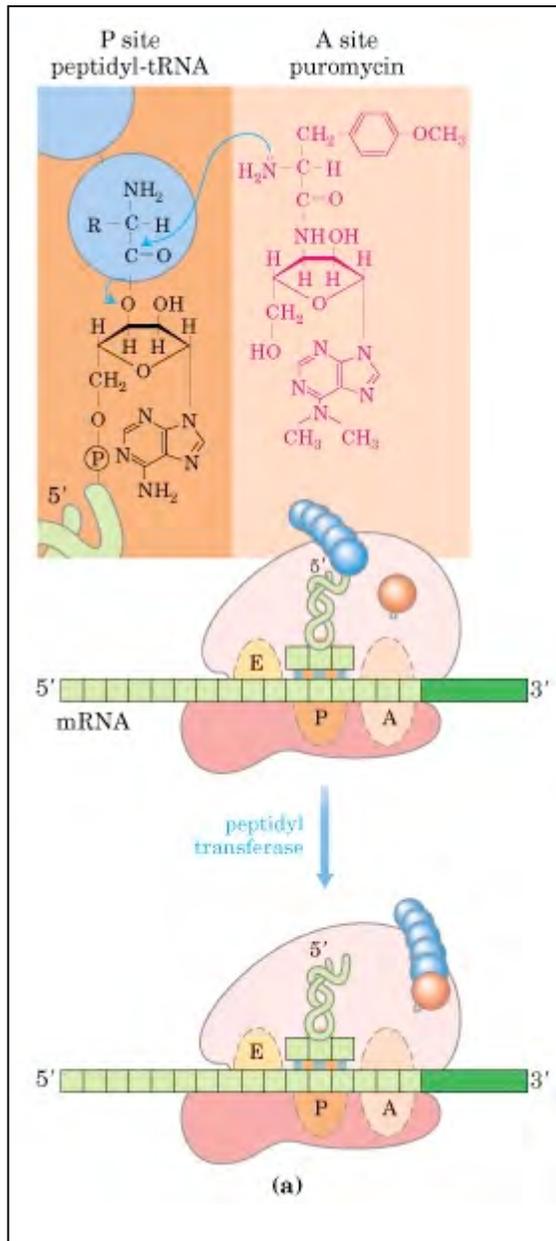


Figura 2. Mecanismo de ação da puromicina. (a) Ribossomo (rosa) ligado a mRNA (verde) e peptidil-tRNA. Em destaque, posicionamento do peptidil-tRNA no sítio P ribossomal e puromicina no sítio A. (b) Destaque da estrutura da peptidil-puromicina, ligada por uma ligação parecida à peptídica. (Nelson e Cox, 2004)

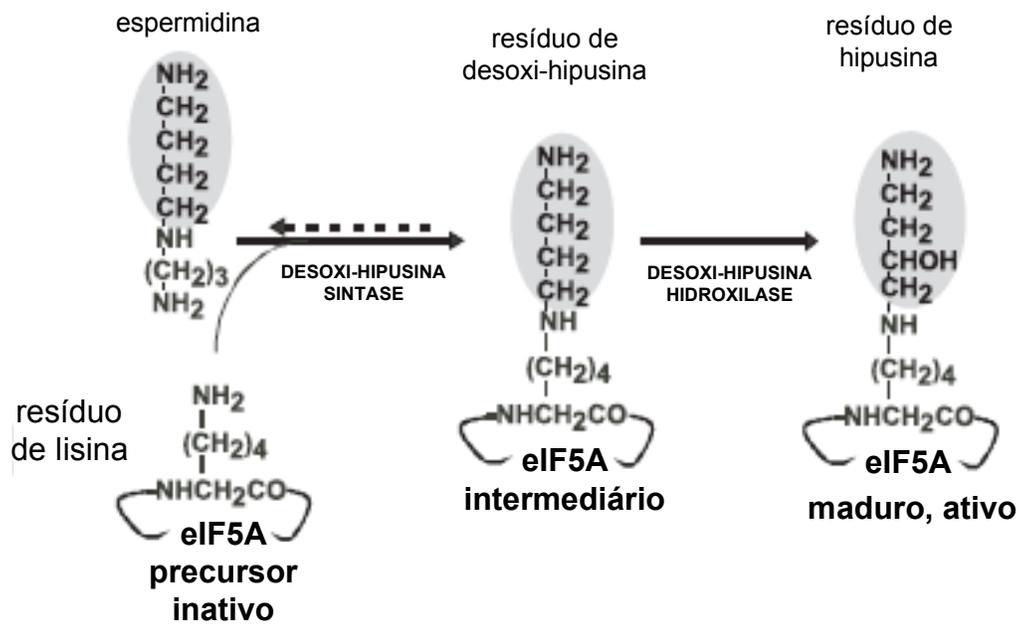


Figura 3. Esquema da biossíntese de hipusina em eIF5A. A porção 4-aminobutil transferida a partir da espermidina para eIF5A está sombreada. (Modificado de Park, 2006)

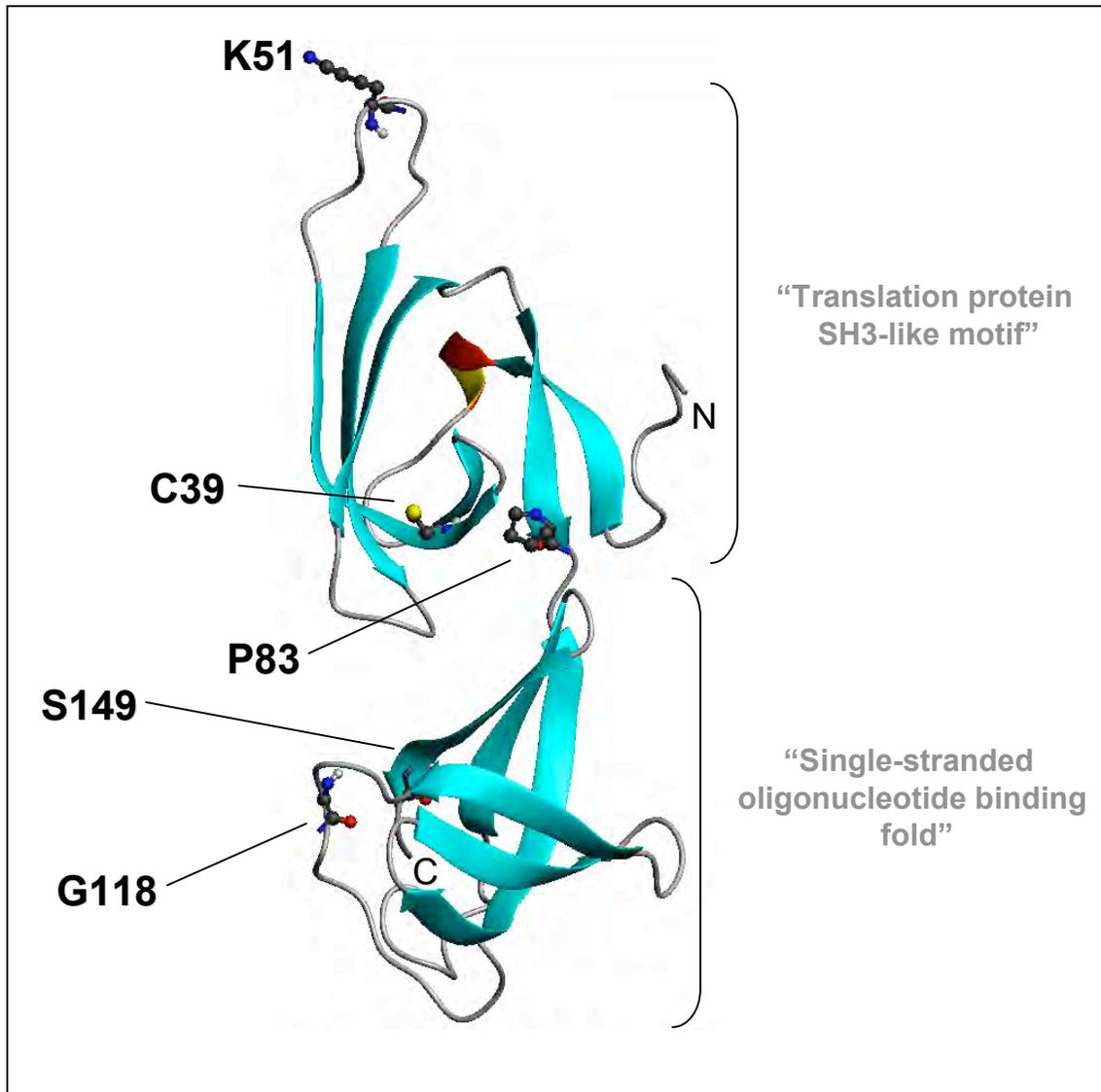


Figura 4. Estrutura tridimensional de eIF5A de *S. cerevisiae* gerada a partir de modelagem por homologia utilizando a estrutura de eIF5A da arqueobactéria *Methanococcus jannaschii*. Estão mostrados os dois domínios com suas classificações estruturais. Também está mostrada a posição dos resíduos de aminoácidos correspondentes àqueles mutados nos alelos *tif51A-1*, *tif51A-2*, *tif51A-3* e *ts1159* que serão discutidos à frente, e ao resíduo hipusinado (K51). O modelo foi gerado utilizando a ferramenta “Parmodel” (<http://laboheme.df.ibilce.unesp.br>).

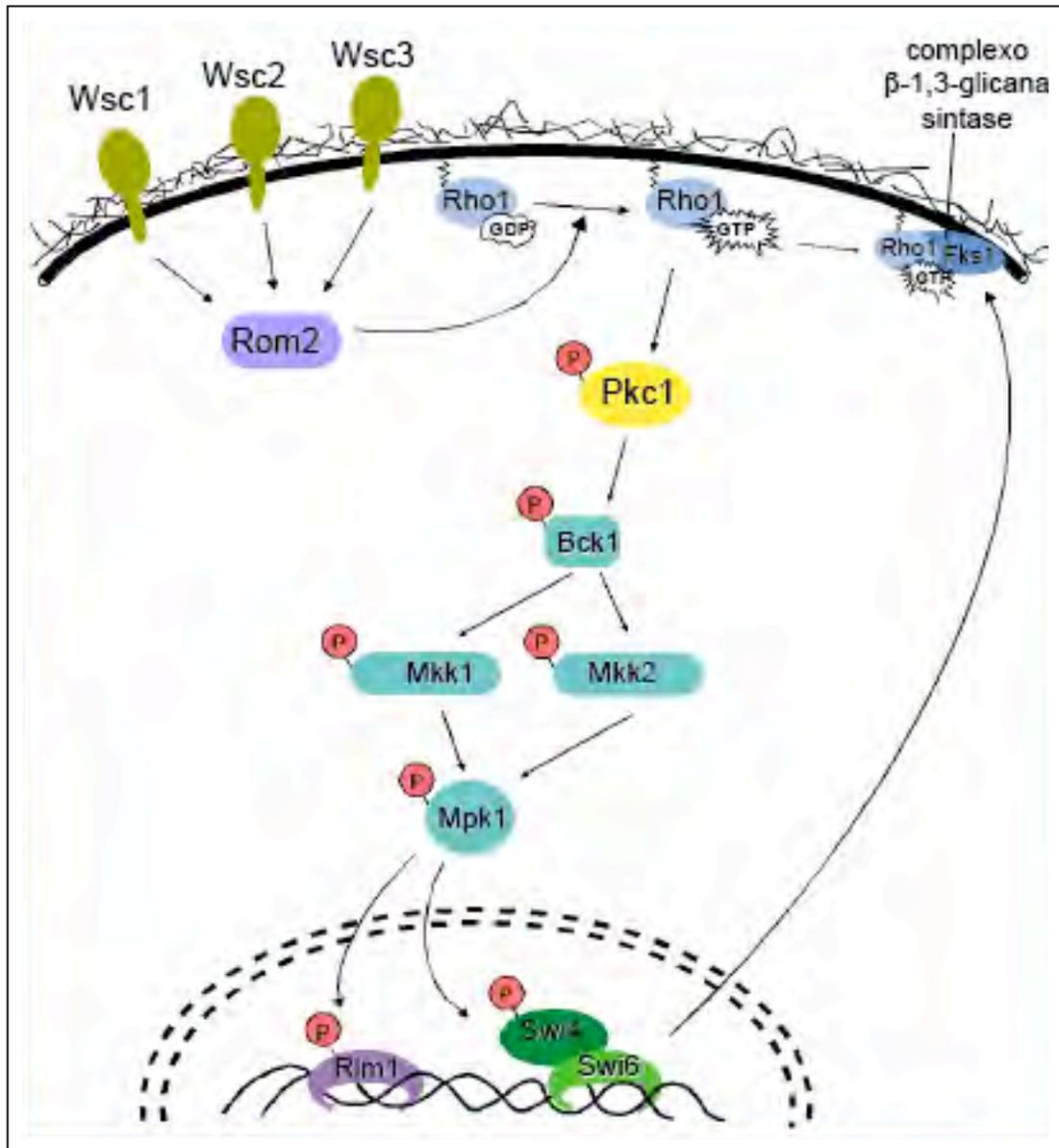


Figura 5. Esquema da via para integridade celular em *S. cerevisiae* com destaque da via de MAP quinases que age abaixo de Pkc1.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi o de melhorar a caracterização funcional de eIF5A utilizando o modelo de *S. cerevisiae*. Para isso, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

2.1. Investigar a interação funcional entre Pkc1 e eIF5A

Como descrito na Introdução, Pkc1 poderia agir através de diferentes efetores para promover a supressão do mutante *tif51A-1* de eIF5A. Foi proposto, então, analisar se a supressão promovida por *PKC1* em alto número de cópias é dependente da via de MAP quinases que age abaixo de Pkc1 ou outra via abaixo de Pkc1 já descrita ou desconhecida. Esta proposta inclui a análise genética utilizando mutantes de eIF5A e membros da via para integridade celular através do ensaio de supressão em alto número de cópias e teste de fenótipos sintéticos. Além do teste direto de genes específicos, foi proposta a realização de rastreamento de supressores em alto número de cópias do mutante sensível a temperatura *tif51A-1* e subsequente análise funcional das interações genéticas identificadas.

2.2. Analisar a expressão gênica diferencial de um mutante de eIF5A

Além das possibilidades de interação funcional sugeridas pelos ensaios genéticos, foi avaliada a participação de eIF5A no controle da expressão gênica em nível traducional utilizando o mutante *tif51A-1* de eIF5A. Desta maneira, propôs-se investigar inicialmente a associação de eIF5A com ribossomos e o efeito de mutantes de eIF5A no perfil polissomal. Finalmente, foi realizada a análise comparativa do conteúdo total de mRNAs e também daqueles transcritos associados

a polissomos do mutante *tif51A-1* com relação ao alelo selvagem utilizando “microarrays” de genes de levedura.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

As linhagens, plasmídeos e oligonucleotídeos utilizados estão descritos, respectivamente, nas Tabelas 1, 2 e 3. A manutenção e cultivo das linhagens de *S. cerevisiae* e *E. coli*, bem como o preparo dos meios de cultura e soluções seguiram procedimentos padrão (Guthrie e Fink, 1991; Ausubel e cols., 2004).

3.2. Métodos

3.2.1. Clonagem empregando Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)

3.2.1.1. Reações de PCR

Realizar as reações de PCR em tubos de microcentrífuga de 0,5 mL contendo 1 μ M de cada oligonucleotídeo contendo o sítio de uma determinada enzima de restrição, 20 a 40 ng de DNA plasmidial, 2 U da enzima Vent DNA polimerase (New England Biolabs) e 2 μ L de uma mistura de desoxinucleotídeos (10 mM cada), num volume final de reação de 100 μ L. Para obtenção dos fragmentos de PCR contendo os genes *TIF51B*, *HSP150*, *ZDS1* e *GIC1* foram utilizados os seguintes oligonucleotídeos: SVO65 e SVO66, SVO148 e SVO149, SVO150 e SVO151, SVO152 e SVO153, respectivamente. Estabelecer as condições das reações de acordo com a temperatura de desnaturação dos oligonucleotídeos utilizados. Após o último ciclo, manter a reação a 72°C por 5 minutos e, a seguir, a 4°C até o momento da próxima etapa. Analisar os produtos da reação por eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TAE 1x (Tris 40mM; ácido acético 20mM e EDTA 1mM).

3.2.1.2. Clonagem do produto de PCR

Submeter os produtos amplificados a digestão com as enzimas de restrição requeridas, seguindo as condições recomendadas pelo fabricante (New England Biolabs). Purificar os produtos de digestão após eletroforese em gel de agarose 0,8%, utilizando o Kit “QIAquick Gel Extraction” (Qiagen). Preparar a reação de ligação num volume de 10 μ L, utilizando tampão apropriado, um excesso de inserto em relação ao vetor (usualmente 10 vezes) e 200-400 U de T4 DNA ligase. Incubar a reação a 16°C por 4-24 horas.

3.2.2. Transformação bacteriana por choque térmico

3.2.2.1. Preparação de *E. coli* competente

Crescer uma colônia da cepa de *E. coli* desejada em 5 mL de meio LB (extrato de levedura 5 g/L; NaCl 5 g/L e triptona 10 g/L) a 37°C, durante a noite e sob agitação. No outro dia, diluir (1:100) a cultura em 100 mL de meio fresco e crescer a 37°C até $D.O_{600nm}=0,3-0,5$, sob agitação. Centrifugar o crescimento bacteriano a 3.500-4.000xg a 4°C por 10-15 minutos e suspender as células em 20 mL de cloreto cálcio 100 mM gelado. Manter as células no gelo por 20 minutos. A seguir, centrifugar a suspensão bacteriana a 3.500xg por 10 minutos a 4°C e suspender as células em 2-4 mL de cloreto de cálcio 100 mM gelado. Novamente, manter as células no gelo por 1-24 horas. A suspensão celular deve ser congelada em alíquotas individuais de 100-200 μ L a -80°C em 20% de glicerol.

3.2.2.2. Transformação

Descongelar alíquotas de células competentes em gelo. Adicionar o DNA e manter os tubos em gelo por 30 minutos. Realizar choque térmico a 42°C por 2 minutos. A seguir, adicionar 1 mL de caldo LB e incubar a 37°C por 1 hora, sob

agitação. Finalmente, plaquear as células em meio LB adicionado de ampicilina 50 µg/mL e incubar a 37°C até a obtenção de colônias.

3.2.3. Eletroporação de bactérias

3.2.3.1. Preparação de E. coli eletrocompetente

Crescer a linhagem desejada de *E. coli* em 100 mL de meio LB a 37°C, durante a noite e sob agitação. No outro dia, diluir a pré-cultura em 1 L de LB pré-aquecido e incubar novamente a 37°C até D.O._{600nm}=1,0-1,2, sob agitação. Centrifugar a cultura a 3.500xg por 20 minutos a 4°C. A seguir, lavar as células uma vez com 500 mL e duas vezes com 250 mL de água gelada, centrifugando a 2.500xg por 7 minutos a 4°C. Lavar o precipitado de células uma vez com 30 mL de glicerol 20% gelado, centrifugando a 2.500xg por 15 minutos a 4°C e descartar o sobrenadante com cuidado. Suspender as células em 3 mL de glicerol 20% gelado, aliquotar 40 µL por tubo e congelar a -80°C.

3.2.3.2. Eletroporação

Descongelar as alíquotas de células e mantê-las em gelo. Adicionar o DNA plasmidial de levedura (1 a 2 µL) e transferir para uma cubeta de eletroporação (0,1 cm). Submeter as células a um pulso elétrico nas seguintes condições: 1,7 kV, 200 Ω (ohm) e 25 µF. Imediatamente adicionar 1 mL de meio LB na cubeta para remover as células e transferi-las para um novo tubo estéril. Incubar a 37°C por 1 hora, sob agitação. Plaquear em meio seletivo e incubar a 37°C até obtenção de colônias.

3.2.4. Preparação de plasmídeos a partir de *E. coli*

3.2.4.1. *Em pequena escala - Miniprep*

Crescer a bactéria transformada com o plasmídeo desejado em 3mL de meio líquido LB contendo ampicilina na concentração de 50 mg/mL. Incubar o inóculo a 37°C sob agitação por uma noite. Centrifugar 1 mL da cultura bacteriana a 16.000xg por 2 minutos, descartar o sobrenadante e suspender as bactérias em 200 µL de TE pH 8,0 (Tris-HCl 10 mM pH8,0 e EDTA 1 mM pH8,0). Adicionar à suspensão 200 µL de solução SDS/NaOH (SDS 1% e NaOH 0,2 M), homogeneizar o conteúdo por inversão e incubar a 37°C por 5 minutos. Em seguida, adicionar 150 µL de acetato de sódio 3 M pH 4,8 e misturar a solução várias vezes por inversão. Centrifugar a 16.000xg por 6 minutos, transferir o sobrenadante para novos tubos e adicionar 1 mL de isopropanol. Misturar os tubos por inversão, incubá-los a 37°C por 5 minutos e, então, centrifugá-los a 12.000xg por 10 minutos. Descartar o sobrenadante, lavar o precipitado 2 vezes com 1 mL de etanol 75% gelado e, após secagem, suspender o precipitado em 50 µL de TE pH 8,0.

3.2.4.2. *Em média escala - Midiprep*

Crescer a bactéria transformada com o plasmídeo desejado em 25 mL de meio LB adicionado de ampicilina 50 µg/mL a 37°C durante a noite, sob agitação. A seguir, extrair e purificar os plasmídeos por lise alcalina, utilizando o kit “QIAfilter Plasmid Midi” (Qiagen).

3.2.5. Sequenciamento de DNA

3.2.5.1. Reação

Realizar a reação de sequenciamento num volume de 20 μL , contendo 3,2 pmol dos oligonucleotídeos adequados, 300 ng de DNA molde e 8 μL do reagente “Big Dye Terminator” (Applied Biosystems). Utilizar para essa reação, as seguintes condições de PCR: 1 ciclo de 2 segundos a 96°C; 35 ciclos de 96°C por 10 segundos, 55°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto; e terminar a reação com 1 ciclo de 1 minuto a 72°C.

3.2.5.2. Precipitação e separação eletroforética

Realizar a precipitação do DNA adicionando 16 μL de água Milli-Q autoclavada e 64 μL de etanol 95%. Centrifugar por 20 minutos a 14.000xg. Aspirar o sobrenadante e lavar o precipitado com 200 μL de etanol 75%. Em seguida, centrifugar novamente a amostra e repetir a lavagem mais duas vezes. Depois de precipitado, secar a amostra e ressuspender o DNA em tampão de aplicação e submeter a amostra à eletroforese utilizando sequenciador semi-automático ABI 377 (Applied Biosystems).

3.2.6. Transformação de leveduras

Fazer inóculo da levedura de interesse em 10 mL de meio YEPD (extrato de levedura 10 g/L; peptona 20 g/L e glicose 20 g/L) e incubar a 30°C sob agitação por uma noite. Centrifugar 1 mL da cultura a 3.000xg por 5 minutos, suspender as células em 1 mL de acetato de lítio 100 mM e incubá-las a 30°C por 15 minutos. Após este período, centrifugar a suspensão e remover o sobrenadante. Adicionar então às células 240 μL de PEG4000 40%, 36 μL acetato de lítio 1 M, 50 μg de DNA

carreador, 0,1-5 µg de DNA plasmidial e água Milli-Q estéril q.s.p 350 µL. Agitar a suspensão de células até homogeneização completa e incubar a 42°C por 20 minutos. Após incubação, coletar as células por centrifugação, suspendê-las em 200 µL de água Milli-Q estéril e plaqueá-las em meio seletivo adequado, de acordo com as marcas auxotróficas utilizadas.

3.2.7. Preparação de plasmídeos a partir de leveduras

Crescer a levedura desejada em 5 mL de meio seletivo adequado até fase estacionária. Centrifugar toda a cultura a 4.000xg por 5 segundos. Lavar as células com 1 mL de água estéril e, após nova centrifugação, suspender as células em 200 µL de tampão de lise (2% Triton X-100; 1% SDS; 100 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 8,0 e 1 mM EDTA pH8,0). Adicionar 200 µL da mistura fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e 300 mg de pérolas de vidro, agitar vigorosamente em vortex por 5 minutos e centrifugar a 16.000xg por 1 minuto. Transferir a fase aquosa para um novo tubo, adicionar 100 µL de isopropanol e misturar por inversão. A seguir, centrifugar a 16.000xg por 10 minutos, remover o sobrenadante e lavar o precipitado com 500 µL de etanol 75% gelado. Ressuspender em 50 µL de água Milli-Q.

3.2.8. Cruzamento e esporulação de leveduras

3.2.8.1. Cruzamento

Cruzar as cepas haplóides de *S. cerevisiae* desejadas na superfície de ágar YEPD e incubar por uma noite a 25°C. Realizar a seleção dos diplóides pela transferência, com veludo estéril, do crescimento obtido na placa de YEPD para a placa de meio duplo seletivo, de acordo com as marcas auxotróficas. Incubar as placas a 25°C. Após o crescimento, isolar os diplóides em meio seletivo duplo.

3.2.8.2. *Esporulação*

Crescer os diplóides em meio S-SPO líquido (2,5 g de extrato de levedura; 15 g acetato de potássio; 40 mg de adenina, uracil 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) a 25°C, sob agitação, até a formação de ascos.

3.2.9. **Dissecção e caracterização de tétrades**

Centrifugar momentaneamente 100-200 µL da cultura submetida à esporulação. Após a remoção do sobrenadante, suspender as células em 100 µL de sorbitol 20%. Então, adicionar 3 µL de zimoliase (10 mg/mL) e incubar a reação à temperatura ambiente por 15 minutos. A seguir, adicionar 1 mL de sorbitol 20% e manter as células em gelo até a dissecção. Dissecar os ascos utilizando microscópio de dissecção em placa de meio YEPD ou YEPD adicionado de sorbitol 1 M, quando necessário, e incubar a 25-30°C até a obtenção de colônias. Caracterizar as marcas auxotróficas das células haplóides obtidas utilizando diferentes meios de cultura seletivos. Definir o “mating type” através do cruzamento com cepas de “mating type” conhecido e seleção dos diplóides em meio seletivo. Checar o fenótipo de sensibilidade a temperatura fazendo o crescimento em meio YEPD em diferentes temperaturas de incubação.

3.2.10. **Teste de sensibilidade a temperatura**

Fazer inóculo das leveduras de interesse em meio seletivo adequado 24 horas antes do experimento. Medir a D.O._{600nm} e, com este dado, uniformizar a concentração celular em todas as amostras. Utilizando 100 µL de cada amostra,

realizar cinco diluições seriadas (1:10) em microplaca de 96 poços, e com ajuda de pipetador multicanal aplicar 4 µL das amostras e suas respectivas diluições nos meios de cultura apropriados. Incubar nas temperaturas desejadas.

3.2.11. Rastreamento de genes supressores em alto número de cópias

Crescer a linhagem mutante desejada em meio YEPD e transformá-la com uma biblioteca genômica de *S. cerevisiae* em vetor de alto número de cópias, contendo a marca auxotrófica *URA3* ($2\mu/URA3$). Após a transformação, plaquear em meio sintético sem uracila e incubar as placas a 25°C (temperatura permissiva) por aproximadamente 12 horas. A seguir, transferir as placas para a temperatura não permissiva e incubar por um período de 3-4 dias. Os clones que crescerem nessa condição devem ser cultivados em meio seletivo na temperatura permissiva. Em seguida, confirmar a supressão do fenótipo temperatura-sensível através do cultivo dos clones selecionados em meio seletivo nas temperaturas permissiva e não permissiva. Testar os clones quanto à sensibilidade ao ácido 5-fluor-orótico (5-FOA) em meio de cultura contendo essa droga nas temperaturas permissiva e não permissiva.

Finalmente, recuperar o plasmídeo dos clones que passaram pelo teste de 5-FOA e realizar o “plasmid-linkage” para cada plasmídeo, transformando-o novamente no mutante em estudo e testando o fenótipo de sensibilidade a temperatura. Após essa confirmação, sequenciar as extremidades do fragmento genômico contido no plasmídeo identificado. A definição final do gene supressor é obtida através de subclonagem do segmento genômico ou por clonagem por PCR de um determinado gene/ORF, usando o fragmento genômico como molde.

3.2.12. Marcação do citoesqueleto de actina com rodamina-faloidina

A marcação dos filamentos de actina foi feita essencialmente como descrito em Amberg (1998). As células foram cultivadas até a fase exponencial e fixadas à temperatura ambiente por 1 hora com formaldeído 3,7% no meio de cultura, seguido de mais uma hora de incubação em PBS com formaldeído 3,7%. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS e ressuspensas em 500 μ L de PBS. A marcação foi feita com a adição de 10 μ L de rodamina-faloidina (Molecular Probes) em 100 μ L de suspensão de células. As células foram então incubadas no escuro por 1 h, lavadas 5 vezes com 1 mL de PBS e finalmente suspensas em 100 μ L de solução anti-oxidante (glicerol 90%; PBS 0,1x e *p*-fenilenodiamina 92,5 mM, pH ajustado para 8 com carbonato de sódio 0,5 M pH 9,0). As células foram guardadas a -20°C até análise. As células coradas com rodamina-faloidina (2,5 μ L) foram aplicadas em lâminas limpas e cobertas com lamínula. As células foram visualizadas por microscopia de fluorescência usando um filtro de rodamina e um microscópio invertido Nikon TE300. As imagens foram capturadas com o programa Image-Pro Plus (Media Cybernetics).

3.2.13. Perfil polissomal de levedura e análise das amostras fracionadas

3.2.13.1. Preparação do gradiente de sacarose

Preparar os gradientes de sacarose, adicionando, subsequentemente, em tubo de polialômero (14x89 mm/13,2 mL - Beckman) 2,1 mL de soluções de sacarose 10%, 20%, 30%, 40% e 50% em tampão adequado (Tris-HCl 20 mM pH 7,5; KCl 50 mM; MgCl₂ 10 mM; DTT 1 mM; ciclo-heximida 100 μ g/mL e heparina 0,2 mg/mL), partindo-se da menor concentração e em sentido crescente de concentração, utilizando-se uma seringa de 3 mL e agulha de extremidade não-perfurante de 15

cm. Incubar os gradientes a 4°C durante a noite para permitir o equilíbrio entre as fases.

3.2.13.2. *Preparação do extrato e centrifugação dos gradientes*

Crescer uma cultura da linhagem de interesse em 100 mL de meio YEPD até a $D.O_{600nm}=0,4-0,6$ a 25°C. Nos experimentos em que for necessário a mudança de temperatura para inativação do mutante, crescer 200 mL de cultura até $D.O_{600nm}=0,2$ a 25°C e, então, transferir metade da cultura para um banho com agitação a 37°C por 3 horas. Bloquear a maquinaria de tradução adicionando cicloheximida para uma concentração final de 100 µg/mL (para as análises com a levedura selvagem, Figura 16) ou 75 µg/mL (para as análises envolvendo a utilização de linhagens mutantes, Figura 17) de cultura e incubar nas respectivas temperaturas por 5 minutos. Centrifugar as culturas em garrafas geladas a 3.500xg, por 5 minutos a 4°C. Em seguida, lavar as células ressuspensando-as em 2,5 mL de tampão de lise (Tris-HCl 20 mM pH 7,5; KCl 50 mM; MgCl₂ 10 mM; DTT 1 mM; cicloheximida 100 µg/mL e heparina 0,2 mg/mL), transferir para tubo cônico de 15 mL e centrifugar a 3.500xg, por 5 minutos a 4°C. Para realizar a lise, ressuspender o precipitado de células em 350 µL de tampão de lise adicionado de inibidores de protease (“EDTA-free, Complete Protease Inhibitors Cocktail” - Roche) e inibidor de RNase (1 µL/mL de “RNasin” - Promega), transferir para um tubo de 1,5 mL, adicionar 1 g de pérolas de vidro e quebrar as células em aparelho Fastprep (velocidade 6.0 e um ciclo de 13 segundos). Com uma agulha, perfurar o fundo do tubo, encaixá-lo em novo tubo de 1,5 mL, colocar ambos em um tubo cônico de 15 mL e centrifugar momentaneamente a 3.000xg para transferir o lisado para o novo tubo. Em seguida, centrifugar o lisado transferido a 14.000xg por 15 minutos a 4°C,

para clarificar o lisado. Transferir o sobrenadante para um novo tubo de 1,5 mL e determinar a $D.O._{260nm}$ da amostra.

3.2.13.3. *Fracionamento dos gradientes e coleta das frações*

Aplicar volume de lisado equivalente a 10 (para análise de perfil com EDTA), 20 (para todas as situações não especificadas) ou 25 (para perfil traducional) $D.O._{260nm}$ sobre o gradiente de sacarose e centrifugar a 39.000 rpm por 3 horas a 4°C em rotor SW-41Ti, utilizando ultracentrífuga Beckman.

Para fracionamento e coleta dos gradientes de sacarose contendo o extrato de levedura separado por densidade, foi utilizado um sistema “Econo Gradient Pump Kit” (Bio-Rad Laboratories), utilizando-se um fluxo contínuo de 1 mL/minuto de solução de sacarose 55% para empurrar a amostra do gradiente. A análise das amostras levou em conta a leitura de absorbância a 254 nm, que deu origem aos traçados mostrados nas figuras que tratam de perfil polissomal. O fracionamento dos gradientes foi realizado a 4°C e o volume e número de amostras coletadas foi feito de acordo com seu processamento subsequente.

3.2.13.4. *Extração de proteína e RNA a partir de gradientes de sacarose*

Para estes procedimentos, os gradientes a 4°C foram separados em 20 frações de 600 μ L. As frações de 600 μ L coletadas foram divididas em amostras de 400 μ L e 200 μ L em tubos de 1,5 mL e procedeu-se como descrito abaixo.

Para extração de RNA, adicionar ao tubo contendo 400 μ L do material fracionado, o mesmo volume da mistura fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), agitar vigorosamente por 30 segundos utilizando um vortex e centrifugar, em seguida, a 4°C por 5 minutos a 14.000xg. Transferir o sobrenadante para um novo

tubo contendo 20 μ L de acetato de sódio 3 M pH 5,2, misturar e adicionar 1,1 mL de etanol 100%. Incubar por 3 horas a -20°C . Centrifugar a 14.000xg por 30 minutos a 4°C , descartar o sobrenadante e lavar com 1 mL de etanol 70% gelado, utilizando o vortex para agitar vigorosamente o precipitado. Centrifugar a 14.000xg por 20 minutos a 4°C , descartar o sobrenadante e repetir a lavagem. Descartar o sobrenadante e secar o precipitado de RNA. Ressuspender o precipitado em 15 μ L de TE pH 8,0. Juntar a 15 μ L de cada amostra de RNA o mesmo volume de “Glyoxal Sample Loading Dye” (Ambion) e incubar a 50°C por 30 minutos para desnaturação completa de estruturas secundárias do RNA. Em seguida, aplicar 30 μ L da preparação de RNA com reagente de glicoxal em gel de agarose 1,2% preparado e pré-incubado por 30 minutos em tampão de corrida de RNA (MOPS 50 mM pH 7,0; EDTA 1 mM e formaldeído 3%) e submeter a eletroforese para separação das amostras. Analisar o gel com auxílio de luz ultravioleta, seguido de fotodocumentação.

Para extração de proteína para posterior ensaio de western blot, adicionar ao tubo contendo 200 μ L do material fracionado 45 μ L de ácido tricloroacético 100%, agitar utilizando vortex e incubar por uma noite a 4°C para precipitação das proteínas. Centrifugar a 14.000xg por 30 minutos a 4°C , aspirar o sobrenadante e lavar o precipitado com 1 mL de acetona gelada. Agitar vigorosamente por 10 segundos, centrifugar a 14.000xg por 10 minutos a 4°C , aspirar o sobrenadante e secar o precipitado. Ressuspender o precipitado em 30 μ L de tampão de carregamento de proteína 2x (Tris-HCl 100 mM pH 6,8; SDS 4%; azul de bromofenol 0,2%; DTT 200 mM e glicerol 20%). Aquecer a 100°C por 5 minutos, resfriar à temperatura ambiente e agitar vigorosamente até que nenhum precipitado seja mais

visível. Utilizar 20 µL desta amostra para proceder diretamente para SDS-PAGE, seguido de western blot (item 5.2.13.5).

3.2.13.5. *Western blot*

Separar as amostras protéicas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) e transferi-las para membrana de nitrocelulose. Bloquear a membrana com tampão PBS 1x (NaCl 140 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 10 mM e KH₂PO₄ 1,8 mM) adicionado de Tween-20 0,25% (PBST) contendo 5% de leite desnatado à temperatura ambiente por 30 minutos sob agitação. Em seguida, incubar a membrana com uma diluição adequada de anticorpo primário em PBST contendo 5% de leite desnatado por 1 hora à temperatura ambiente. Lavar a membrana com PBST por cinco minutos, por 3 vezes, e incubá-la em PBST contendo 5% de leite desnatado com anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase. Após três novas lavagens de cinco minutos com PBST, tratar a membrana com reagentes quimioluminescentes (ECL-Amershan) e expor a filme autorradiográfico.

3.2.14. **Análise de expressão gênica por “microarray”**

3.2.14.1. *Extração de RNA total de levedura a partir de lisados (perfil transcricional)*

Crescer a linhagem de levedura de interesse em 100 mL de YEPD até D.O._{600nm}=0,1 a 25°C e, então, transferir metade da cultura para um banho com agitação a 37°C por 3 horas. Centrifugar as culturas a 3.000xg por 2 minutos a temperatura ambiente, descartar o sobrenadante e congelar imediatamente em nitrogênio líquido. Estocar a -80°C até extração de RNA.

Descongelar os precipitados de levedura em gelo, transferir para um tubo de 1,5 mL, centrifugar a 14.000xg momentaneamente a 4°C e descartar o

sobrenadante. Ressuspender as células em 500 µL de TES (Tris-HCl 10 mM pH 7,5; EDTA 10 mM e SDS 0,5%) e adicionar 500 µL de fenol ácido. Incubar a 65°C por 1 hora, agitando em vortex por 10 segundos a cada 10 minutos. Em seguida, incubar em gelo por 5 minutos, centrifugar a 14.000xg por 5 minutos a 4°C e transferir o sobrenadante para um novo tubo contendo 500 µL de fenol ácido. Agitar em vortex por 10 segundos, incubar em gelo por 5 minutos, centrifugar a 14.000xg por 5 minutos a 4°C e transferir o sobrenadante para um novo tubo contendo 500 µL de clorofórmio. Agitar em vortex por 20 segundos, centrifugar a 14.000xg por 5 minutos a 4°C e transferir o sobrenadante para um novo tubo contendo 50 µL de acetato de sódio 3M pH 5,2. Misturar por inversão, adicionar 1 mL de etanol 100% gelado e incubar a -20°C por 3 horas. Centrifugar a 14.000xg por 10 minutos a 4°C e descartar o sobrenadante. Lavar o precipitado com 1 mL de etanol 70% gelado, centrifugar novamente a 14.000xg por 10 minutos a 4°C e descartar o sobrenadante. Após secar o precipitado, ressuspendê-lo em 100 µL de água livre de nuclease. Determinar a concentração de RNA por espectrofotometria e usar 100 µg de RNA total em subsequente purificação em coluna utilizando o Kit "RNeasy Mini" (Qiagen) e o protocolo de "Cleanup", eluindo no final com 100 µL de água livre de nuclease. Determinar novamente a concentração de RNA por espectrofotometria.

3.2.14.2. Extração de RNA total de levedura a partir de gradientes de sacarose (perfil traducional)

Para esse procedimento, foi realizado inicialmente o perfil polissomal (item 3.2.13) sem a adição de heparina. Em seguida foi feito o fracionamento dos gradientes a 4°C e coletadas as amostras em 12 frações de 900 µL.

Para cada réplica da análise foram utilizadas as 3 últimas frações de cada gradiente (contendo as frações polissomais) sendo que essas 3 frações foram agrupadas às 3 últimas frações de outros dois gradientes provenientes da mesma linhagem e condição (permissiva ou restritiva), com o objetivo de aumentar o rendimento da preparação.

Adicionar à essas frações agrupadas 25 mL de etanol 100% gelado e incubar a -20°C por uma noite. Centrifugar a $12.000\times g$ por 20 minutos a 4°C . Descartar o sobrenadante, centrifugar a $12.000\times g$ por 2 minutos a 4°C e secar o precipitado. Ressuspender o precipitado em 1 mL de tampão P (Tris-HCl 10 mM pH 7,5; EDTA 1 mM; SDS 0,2% e Proteinase K - Invitrogen 0,8 mg/mL), transferir para um tubo de 1,5 mL e incubar a 37°C por 20 minutos. Em um tubo de 2 mL, adicionar 1 mL de fenol ácido e, em seguida, a amostra, agitar por 10 segundos e centrifugar a $14.000\times g$ por 15 minutos a 4°C . Transferir o sobrenadante para um novo tubo de 2 mL contendo 1 mL de fenol:clorofórmio (5:1 pH 4,5) e agitar por 10 segundos. Centrifugar a $14.000\times g$ por 5 minutos a 4°C . Transferir o sobrenadante para um novo tubo de 2 mL contendo 1 mL de clorofórmio, agitar vigorosamente por 30 segundos e centrifugar a $14.000\times g$ por 5 minutos a 4°C . Transferir, dividindo, cada sobrenadante para dois tubos novos de 2 mL contendo $45\ \mu\text{L}$ de acetato de sódio 3M pH 5,2, misturar e adicionar 1,35 mL de etanol 100% gelado. Incubar a -20°C por 3 horas. Centrifugar a $14.000\times g$ por 20 minutos à temperatura ambiente. Descartar o sobrenadante, lavar os precipitados com 1 mL de etanol 70% gelado, agitar utilizando vortex e centrifugar a $14.000\times g$ por 20 minutos a 4°C . Descartar sobrenadante e secar o precipitado. Dissolver cada precipitado em $50\ \mu\text{L}$ de água livre de nuclease e agrupar novamente cada amostra separada na etapa de precipitação anterior. Determinar a concentração de RNA por espectrofotometria e

usar 100 µg de RNA total em subsequente purificação em coluna utilizando o Kit “RNeasy Mini” (Qiagen) e o protocolo de “Cleanup”, eluindo no final com 100 µL de água livre de nuclease. Determinar novamente a concentração de RNA por espectrofotometria.

3.2.14.3. Síntese de cDNA

Montar a primeira etapa da reação de transcrição reversa como segue: 55 µg de RNA total, 500 ng de oligonucleotídeo dT₁₅ e mistura de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) 1 mM cada. Aquecer a 65°C por 5 minutos e incubar em gelo por 5 minutos. Centrifugar momentaneamente os microtubos contendo as reações e adicionar a segunda etapa da reação: 1x “First-Strand Buffer” (Invitrogen), DTT 0,01 M, “RNasin” (Promega) 1 µL/mL e 1.600 unidades de transcriptase reversa “SuperScript III” (Invitrogen). Misturar a reação e incubar a 50°C por 3 horas. Como controle de contaminação por DNA na preparação de RNA total, retirar $\frac{1}{10}$ da reação antes da adição de transcriptase reversa e submeter aos mesmos procedimentos.

Em seguida, hidrolisar o RNA com a adição de EDTA 5 mM pH 8,0 e NaOH 500 mM, incubando a 65°C por 20 minutos. Neutralizar a reação com adição de HCl 500 mM. Adicionar ao volume final da reação neutralizada (240 µL) igual volume de isopropanol e incubar a -20°C por 3 horas para precipitação do cDNA formado. Centrifugar a amostra a 14.000xg por 20 minutos a 4°C, descartar o sobrenadante e lavá-lo com 1 mL de etanol 70% gelado. Centrifugar novamente a 14.000xg por 20 minutos a 4°C, descartar o sobrenadante, secar o precipitado e ressuspender em 27 µL de água livre de nuclease. Determinar a presença de DNA em gel de agarose 0,8% utilizando 6 µL da amostra.

3.2.14.4. Marcação de cDNA com fluoróforos

Utilizar 21 μL da amostra produzida com a reação do item anterior (normalmente, por volta de 15-20 μg de cDNA) e adicionar 20 μL de “Random Primers Solution” (BioPrime DNA Labeling System - Invitrogen). Incubar por 5 minutos a 100°C e mais 5 minutos em gelo. Todas as etapas seguintes devem ser realizadas sob a maior proteção possível de luz direta. Adicionar 5 μL de mistura de dNTPs de baixa concentração de dTTP (dATP, dCTP e dGTP 1,2 mM; dTTP 0,6 mM), 3 μL dos fluoróforos Cy3-dUTP ou Cy5-dUTP (1,0 mM - PelkinElmer) e 1 μL de enzima Klenow (40 U/ μL - Invitrogen). Incubar a 37°C por 1 hora. Purificar a reação por coluna de afinidade utilizando o Kit “QIAquick PCR Purification” (Qiagen). Eluir em 100 μL de tampão de eluição do Kit e precipitar o material pela adição de 12 μL de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 260 μL de etanol 100%, e incubação a -20°C por 3 horas. Centrifugar a 14.000xg por 40 minutos a 4°C, descartar o sobrenadante e lavar o precipitado com 500 μL de etanol 70% gelado. Centrifugar a 14.000xg por 20 minutos a 4°C, descartar o sobrenadante, secar o precipitado e ressuspender em 10 μL de água livre de nuclease.

3.2.14.5. Hibridização, lavagem e análise dos “microarrays”

Para este protocolo, foram utilizados “microarrays” de genes de *S. cerevisiae*, arranjados sobre lâmina de vidro e produzidos pela Universidade de Toronto (www.microarrays.ca/products/types.html#Y6.4K). Estes “microarrays” são compostos por 6.240 genes de *S. cerevisiae* duplicadas, mais controles, totalizando 12.800 pontos arranjados em 48 blocos.

Inicialmente, preparar 110 μL de solução de hibridização da seguinte maneira: juntar 100 μL de “DIG Easy Hyb” (Roche), 5 μL de tRNA de levedura 10 mg/mL (Sigma) e 5 μL de DNA fita simples 10 mg/mL (Sigma). Incubar a 65°C por 2 minutos e deixar esfriar à temperatura ambiente. Combinar as amostras de cDNA marcado (item 3.2.14.4) provenientes das linhagens selvagem e mutante. A seguir, adicionar 60 μL da solução de hibridização obtendo, assim, 80 μL de mistura de hibridização. Incubar a 65°C por 2 minutos e esfriar à temperatura ambiente. Colocar cada “microarray” em uma câmara de hibridização e cobrir cada um com uma lamínula suspensa (“lifter slip”). Aplicar cuidadosamente o maior volume possível da mistura de hibridização sobre os arranjos do “microarray” e incubar em câmara de hibridização a 37°C por uma noite.

Para dar início à lavagem de cada “microarray”, retirar a lamínula suspensa mergulhando-o em solução de SSC 1x (citrato de sódio 15 mM e cloreto de sódio 150 mM), previamente aquecida a 50°C. Colocar cada “microarray” em uma jarra de Coplin contendo 100 mL de solução de SSC 1x a 50°C. Em seguida, transferir cada “microarray” para um suporte de metal vazado para lâminas de vidro submerso em aproximadamente 300 mL de solução de SSC 1x e SDS 0,1% a 50°C, em um recipiente adequado. Incubar a 50°C por 10 minutos. Repetir esse passo de lavagem mais duas vezes. Por fim, transferir cada “microarray” para um novo suporte de lâminas em um novo recipiente contendo uma nova solução de SSC 1x a 50°C. Utilizando uma presilha que se encaixa no suporte de metal, lavar as lâminas fazendo movimentos rápidos na vertical. Secar os “microarrays” utilizando o suporte de metal encaixado em um rotor de microplaca e centrifugar a 300xg por 5 minutos.

Para escanear as lâminas de “microarray”, foi utilizado um aparelho “GenePix 4000B Scanner” e o programa de computador “GenePix Pro 6” (Axon Instruments).

A preparação das imagens para extração dos dados preliminares e a extração desses dados foram também realizadas utilizando-se o programa “GenePix Pro 6”. A análise dos dados obtidos foi feita com os programas “Rosetta Resolver System” (Rosetta Biosoftware) e “Excel” (Microsoft). As análises envolvendo ontologia genética foram realizadas considerando-se todos os genes com resultados de P-value $<0,05$ e utilizando-se a ferramenta disponível na internet “FuncAssociate” (<http://lama.med.harvard.edu/cgi/func/funcassociate>). Para a classificação dos transcritos de níveis alterados no mutante *tif51A-1* segundo as anotações de ontologia genética, foram utilizados os dados das colunas 2 e 3 do documento <ftp://ftp.geneontology.org/pub/go/gene-associations>. Para apresentação dos resultados na forma de tabelas, foi utilizada a ferramenta “GO Term Finder” (<http://db.yeastgenome.org/cgi-bin/GO/goTermFinder>).

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

Linhagem	Genótipo	Origem
SVL14	<i>MAT_a ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1</i> <i>can1-100 ssd1-d tif51A-1</i>	Valentini e cols., 2002
SVL26	<i>MAT_a ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1</i> <i>can1-100 ssd1-d tif51A-1</i>	Pamela Silver
SVL32	<i>MAT_a ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1</i> <i>can1-100 ssd1-d tif51A-3</i>	Valentini e cols., 2002
SVL82 (W303)	<i>MAT_a ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1</i> <i>can1-100 ssd1-d</i>	Pamela Silver
SVL170 (DLY486)	<i>MAT_α ade8 his3 leu2 met3 ura3 stt1 (pkc1)</i>	David Levin
SVL248	<i>MAT_a ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1</i> <i>can1-100 ssd1-d ts1159</i>	Valentini e cols., 2002
SVL411	<i>MAT_a ade2 his3 leu2 ura3 trp1 zds1ΔHIS3</i> <i>zds2ΔkanMX4 ssd1-d tif51A-1</i>	Este estudo
SVL412	<i>MAT_a ade2 his3 leu2 ura3 trp1 ssd1ΔLEU2 tif51A-1</i>	Este estudo

Tabela 2. Plasmídeos utilizados neste estudo.

Plasmídeo	Descrição	Origem
pSV64 (pRS425)	<i>LEU2, 2μ</i>	Christianson e cols., 1992
pSV65 (pRS426)	<i>URA3, 2μ</i>	Christianson e cols., 1992
pSV107	<i>TIF51A, URA3, 2μ</i>	Valentini e cols., 2002
pSV108	<i>TIF51A, LEU2, 2μ</i>	Valentini e cols., 2002
pSV115	<i>WSC1, URA3, 2μ</i>	Valentini e cols., 2002
pSV116	<i>WSC2, URA3, 2μ</i>	Valentini e cols., 2002
pSV117	<i>WSC3, URA3, 2μ</i>	Valentini e cols., 2002
pSV143	<i>TIF51B, URA3, CEN</i>	Este estudo
pSV181	<i>PKC1, URA3, 2μ</i>	Valentini e cols., 2002
pSV292 (pROM2)	<i>ROM2, TRP1, 2μ</i>	Helliwell e cols., 1998
pSV293 (pRHO2)	<i>RHO2, TRP1, 2μ</i>	Helliwell e cols., 1998
pSV294 (pBCK1-20)	<i>BCK1-20, URA3, CEN</i>	Helliwell e cols., 1998
pSV295 (pMKK1)	<i>MKK1, URA3, 2μ</i>	Helliwell e cols., 1998
pSV296 (pMPK1)	<i>MPK1 (SLT2), URA3, 2μ</i>	Helliwell e cols., 1998
pSV304	<i>GIC1, URA3, 2μ</i>	Este estudo
pSV352 (YE _p 24-BNI1)	<i>BNI1, URA3, 2μ</i>	Helliwell e cols., 1998
pSV376 (YE _p 351-CDC24)	<i>CDC24, LEU2, 2μ</i>	Richman e cols., 1999
pSV377 (YE _p 351-CDC42)	<i>CDC42, LEU2, 2μ</i>	Richman e cols., 1999
pSV381 (YE _p 13-BEM3)	<i>BEM3, LEU2, 2μ</i>	Richman e cols., 1999
pSV383 (YE _p 13-RGA1)	<i>RGA1, LEU2, 2μ</i>	Richman e cols., 1999
pSV384 (pFK2CU)	<i>SSD1, URA3, CEN</i>	Uesono e cols., 1994

pSV387 (YEp13-MID2)	<i>MID2, LEU2, 2μ</i>	de Bettignies e cols., 2001
pSV388 (YEp13-MTL1)	<i>MTL1, LEU2, 2μ</i>	de Bettignies e cols., 2001
pSV396 (EBO459)	<i>CLN2, URA3, 2μ</i>	Lenburg e O'Shea, 2001
pSV401 (pDLB678)	<i>BEM1, URA3, 2μ</i>	Gladfelter e cols., 2002
pSV403 (pDLB722)	<i>CLA4, URA3, 2μ</i>	Gladfelter e cols., 2002
pSV407 (YEp352- STE20)	<i>STE20, URA3, 2μ</i>	Gladfelter e cols., 2002
pSV411 (MPO120)	<i>PCL1, URA3, 2μ</i>	Lenburg e O'Shea, 2001
pSV412 (MPO121)	<i>PCL2, URA3, 2μ</i>	Lenburg e O'Shea, 2001
pSV454 (pKT1057)	<i>BEM2, LEU2, 2μ</i>	Kawasaki e cols., 2003
pSV455 (pKT1130)	<i>BUD1, LEU2, 2μ</i>	Kawasaki e cols., 2003
pSV501	<i>TIF51A, TRP1, CEN</i>	Este estudo
pSV531 (pTH123)	<i>GIC1, LEU2, 2μ</i>	Höfken e Schiebel, 2004
pSV532 (pTH124)	<i>GIC2, LEU2, 2μ</i>	Höfken e Schiebel, 2004
pSV534 (pTH179)	<i>GIC1^{CRIB-}, LEU2, 2μ</i>	Höfken e Schiebel, 2004
pSV535 (pTH185)	<i>GIC1-pr, LEU2, 2μ</i>	Höfken e Schiebel, 2004
pSV588 (YEp-ZDS2)	<i>ZDS2, URA3, 2μ</i>	Yu e cols., 1996
pSV589	<i>ZDS1, URA3, 2μ</i>	Este estudo
pSV590	<i>HSP150, URA3, 2μ</i>	Este estudo
pSV790	<i>TIF51B, URA3, 2μ</i>	Este estudo

Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados neste estudo.

Oligonucleotídeo	Descrição
SVO65	5'- CGCGGATCCATATTCGACGATGTCTCACACG -3'
SVO66	5'- CGCGGATCCACTGCGCATATAAAGGCGAGAACG -3'
SVO148	5'- CGCGGATCCATTAGGCGACCCTCACAATG -3'
SVO149	5'- CGCGGATCCATAGACGTAGCCACATGCAG -3'
SVO150	5'- CGCGGATCCTGGAATTCTATCGAGCGACC -3'
SVO151	5'- CGCGGATCCCTCTGTTCTTATACGGTTCC -3'
SVO152	5'- CGGGGTACCAATACGTACCCGGGTAGTAG -3'
SVO153	5'- CGGGGTACCGTCTGAGCAGGAATAAAGAG -3'

4. RESULTADOS

4.1. Análise da interação funcional entre Pkc1 e eIF5A

4.1.1. Análise da supressão do fenótipo de sensibilidade a temperatura de *tif51A-1* pelas MAP quinases

Em um trabalho anterior de nosso laboratório, três alelos temperatura-sensíveis de *TIF51A*, *tif51A-1*, *tif51A-2* e *tif51A-3* foram caracterizados e usados para estudar a função de eIF5A em levedura (Valentini e cols., 2002). Como *PKC1* e *WSC1-3* foram identificados como supressores em alto número de cópias do mutante *tif51A-1* (Valentini e cols., 2002), decidiu-se analisar o mecanismo que governa esta supressão. Pkc1, homólogo de proteína quinase C de levedura, juntamente com seus reguladores propostos Wsc1-3, desempenham um papel importante na manutenção da integridade celular. Esta função é exercida por Pkc1 pela sinalização através de diferentes efetores para levar a remodelagem da parede celular e reorganização do citoesqueleto de actina na resposta a diversos estímulos, incluindo choque térmico, feromônio, baixa osmolaridade, depleção de nutrientes e progressão do ciclo celular (Heinisch e cols., 1999). Um efector bem estabelecido abaixo de Pkc1 é a via composta pela cascata de MAP quinases, que é composta pelas quinases Bck1, Mkk1/Mkk2 e Mpk1 (Figura 5). A ativação de Mpk1 regula positivamente a transcrição de uma série de genes envolvidos na progressão do ciclo celular e na síntese da parede celular (Gustin e cols., 1998). Embora seja conhecido que a transcrição de um grande número de genes é mediada pela cascata de MAP quinases em resposta a diferentes danos da parede celular, pouco é sabido sobre outros efetores que atuam abaixo de Pkc1 (Ketela e cols., 1999; Andrews e Stark, 2000; Li e cols., 2000; Nanduri e Tartakoff, 2001; Chai e cols.,

2002; Valdivia e Schekman, 2003). Dessa forma, a fim de se determinar se a supressão de *tif51A-1* promovida por *PKC1* em alto número de cópias ocorre através da via de MAP quinases, foi examinado se *MKK1* e *MPK1* em alto número de cópias, ou um alelo ativado de *BCK1*, *BCK1-20*, poderiam suprimir o fenótipo temperatura-sensível de *tif51A-1*. Ao contrário de *PKC1*, nenhum dos genes de MAP quinase puderam suprimir o defeito de crescimento de *tif51A-1* na temperatura não-permissiva de 37°C (Figura 6A). Por outro lado, como controle, o alelo ativado *BCK1-20* suprimiu com sucesso o defeito do mutante *stt1* de *PKC1* (Yoshida e cols., 1994; Figura 6B). Este resultado sugere que, embora *BCK1-20* possa suprimir o fenótipo temperatura-sensível do mutante *pkc1 (stt1)*, a ativação da via de MAP quinases não é suficiente para suprimir o fenótipo de crescimento de *tif51A-1*. Ao contrário dos resultados obtidos com genes de fatores que atuam abaixo de Pkc1, plasmídeos contendo genes que codificam para ativadores de Pkc1 (*WSC1-3*, *MID2*, *MTL1*, *ROM2* e *RHO2*) suprimem o fenótipo do mutante *tif51A-1* (Hohmann, 2002; Tabela 4). Considerando os resultados mostrados, é fortemente sugerido que Pkc1 não age através de sua cascata de MAP quinases para promover a supressão do fenótipo temperatura-sensível de *tif51A-1*.

4.1.2. *Novos supressores de tif51A-1 sugerem a existência de uma nova via de sinalização que liga Pkc1 à polaridade celular*

Uma vez que a atividade aumentada de membros da cascata de MAP quinases de integridade celular não suprimiu o fenótipo temperatura-sensível do mutante *tif51A-1*, foi realizado novamente um rastreamento de supressores em alto número de cópias no intuito de que os novos genes identificados pudessem auxiliar na compreensão da relação funcional entre Pkc1 e eIF5A.

Com relação ao rastreamento, então efetuado, aproximadamente 4×10^5 leveduras foram transformadas com a biblioteca genômica. Um total de 335 transformantes mostrou crescimento na temperatura não permissiva e foram, então, inicialmente selecionadas para os testes subsequentes. Chegaram ao ensaio de ligação do plasmídeo (“plasmid linkage”) 92 clones e apenas 25 confirmaram a capacidade de supressão em alto número de cópias do fenótipo de sensibilidade a temperatura do alelo *tif51A-1*. Após subclonagem dos fragmentos contidos nos plasmídeos selecionados para definição dos genes supressores, foi realizada clonagem desses supressores por PCR (dados não mostrados). Como esperado, a maior parte dos fragmentos genômicos selecionados possuíam genes já previamente caracterizados como supressores (Valentini e cols., 2002), além do próprio gene *TIF51A* e seu homólogo, *TIF51B* (Tabela 5). Por outro lado, seis dos plasmídeos caracterizados mostraram três novos genes não caracterizados anteriormente como supressores do mutante *tif51A-1*.

É interessante ressaltar que o aparecimento de *TIF51B* (também chamado de *ANB1*, para “ANaeroBically incuced 1”) como supressor em alto número de cópias, diferentemente de *TIF51A*, era inesperado, uma vez que a expressão de *TIF51B* é inibida transcricionalmente em condições aeróbicas (Lowry e Zitomer, 1984; Klinkenberg e cols., 2005). Uma vez que a repressão gênica controlada por oxigênio em *S. cerevisiae* parece ser um processo complexo e bastante regulado, o aumento no número de cópias de *TIF51B* poderia ter levado à perda da repressão gênica. Para confirmar que o alelo *TIF51B* selecionado nesse rastreamento possui, de alguma maneira ainda, uma regulação negativa transcricional, este gene foi clonado por PCR em um plasmídeo centromérico e a supressão do mutante *tif51A-1* foi avaliada. Os resultados estão mostrados na Figura 7. Como pode ser observado,

baixo número de cópias de *TIF51B* (em vetor centromérico), isto é, condições mais próximas daquelas normais na célula, não levam à complementação do mutante de *TIF51A*, o que sugere fortemente que o aparecimento de *TIF51B* no rastreamento descrito aqui se deve ao fato da perda do controle da repressão gênica por algum tipo de saturação dos complexos envolvidos nesse processo pelo aumento do número de cópias de *TIF51B*.

Entre os novos supressores identificados, apareceu *HSP150*. Hsp150 (Pir2) é uma proteína da família de glicoproteínas “PIR-repeat”, cujos membros estão frequentemente envolvidos com estrutura de parede celular e morfologia celular (<http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Pfam/getacc?PF00399>). Além de compor a parede celular durante o crescimento vegetativo, Hsp150 também pode ser induzida por choque térmico e ser secretada para o meio. Embora seja funcionalmente redundante com Pir1, Pir3 e Cis3, outros membros da família “PIR-repeat”, Hsp150 é necessária para a estabilidade da parede celular, principalmente em condições de estresse térmico, oxidativo e de limitação de nitrogênio (Toh-e e cols., 1993; Ezaki e cols., 1998; Mrsa e Tanner, 1999; Kapteyn e cols., 1999). Apesar de bastante interessante do ponto de vista funcional, principalmente com relação a possíveis interações com a morfologia e integridade celular, nenhum estudo mostrou até o momento algum papel para Hsp150 na progressão do ciclo celular ou na via para integridade celular comandada por Pkc1.

Outros dois novos supressores em alto número de cópias identificados foram : *GIC1* e *ZDS1* (Figura 8) e são apresentados mais adiante.

O mutante usado no rastreamento acima é um dos quatro mutantes de eIF5A descritos em *S. cerevisiae*: *ts1159* (Zuk e Jacobson, 1998), *tif51A-1*, *tif51A-2* e *tif51A-3* (Valentini e cols., 2002). Com o intuito de analisar se a supressão

promovida por *PKC1*, *ZDS1* e *GIC1* é alelo-específica, foi testada a sensibilidade a temperatura dos mutantes de eIF5A descritos na presença de três supressores (Figura 8). Como pode ser observado, apenas o alelo *tif51A-2* também é suprimido por *PKC1*, *ZDS1* e *GIC1*, enquanto que nenhuma melhora no crescimento ocorre nos alelos *ts1159* e *tif51A-3*. É interessante ressaltar que os alelos *tif51A-1* e *tif51A-2* possuem substituições de amino ácidos no mesmo resíduo (P83S e P83L, respectivamente – Figura 4). Por outro lado, os mutantes que não foram suprimidos contêm mudanças de amino ácidos em diferentes pontos de eIF5A: *ts1159* (S149P – Figura 4) e *tif51A-3* (C39Y e G118D – Figura 4). Dessa forma, esta supressão alelo-específica deve refletir a presença de defeitos similares em *tif51A-1* e *tif51A-2* que podem ser melhorados por *PKC1*, *ZDS1* e *GIC1*. Entretanto, como os mutantes *ts1159* e *tif51A-3* são muito mais severos que os outros (dados não mostrados; Valentini e cols., 2002), a ausência de supressão por esses genes não deve refletir a ocorrência de fenótipos completamente diferentes entre *ts1159/tif51A-3* e *tif51A-1/tif51A-2*, mas sim, uma maior amplitude de defeitos nos primeiros. Em concordância com esta hipótese está o fato de que *PKC1*, *ZDS1* e *GIC1* não são capazes de suprimir o mutante *tif51AΔ*, ou os mutantes *tif51A-1* e *tif51A-2* em temperaturas mais elevadas (dados não mostrados), demonstrando que estes supressores conseguem corrigir apenas parcialmente os defeitos dos mutantes analisados.

Gic1 é um efetor de *Cdc42* importante para o surgimento do broto e possui um domínio CRIB (“*Cdc42/Rac*-interactive-binding”), necessário para a interação com *Cdc42*-GTP (Brown e cols., 1997). *Gic1*, juntamente com seu homólogo *Gic2*, exerce sua função durante a transição G1/S do ciclo celular, ligando-se ao principal organizador da polarização celular *Cdc42* e à formina *Bni1*, que é responsável pela

indução da polimerização de actina (Pruyne e cols., 2004; Figura 9). Zds1 também está correlacionado com progressão do ciclo celular, porém com uma função menos definida (Ma e cols., 1996). *ZDS1* e *ZDS2*, seu homólogo funcionalmente redundante, foram isolados em uma série de rastreamentos de supressor em alto número de cópias (Schwer e Shuman, 1996; Tsuchiya e cols., 1996; Bourbonnais e cols., 2001; Sekiya-Kawasaki e cols., 2002). Curiosamente, níveis elevados de Zds1 podem diminuir a atividade Cdc42 (Bi e Pringle, 1996) e dados de duplo-híbrido mostraram interações físicas entre Pkc1, Zds2, Zds1 e Gic1 (Drees e cols., 2001).

Para investigar a relação entre Pkc1, Zds1 e Gic1, foi testado se a função de Zds é importante para a supressão mediada por *PKC1* ou por *GIC1*. Para responder essa questão, foi gerada uma linhagem *tif51A-1* que não possui *ZDS1* e *ZDS2* (SVL411), e foi testada a capacidade de *PKC1* ou *GIC1* de suprimir o fenótipo temperatura-sensível de crescimento deste mutante (Figura 10). Para evitar possíveis influências de “background” genético na supressão de *PKC1*, este ensaio foi realizado em paralelo com a linhagem SVL412, obtida da mesma tétrade que SVL411, mas contendo somente o mutação *tif51A-1*. De maneira bastante interessante, *PKC1* não foi capaz de suprimir o mutante *tif51A-1* na ausência de *ZDS1* e *ZDS2*, enquanto que *GIC1* manteve sua capacidade de supressão (comparar as linhas indicadas pelas setas na Figura 10A e 10B). Além disso, a linhagem *tif51A-1 zds1Δ zds2Δ* demonstra sensibilidade a temperatura agravada, abaixando de 37°C para 35°C a temperatura restritiva do mutante triplo em relação ao alelo *tif51A-1* sozinho (Figura 10A e 10B, painéis da direita). Este fenótipo sintético de piora do fenótipo de sensibilidade a temperatura entre esses genes reforça sua conexão funcional. Estes dados, juntamente com as interações físicas anteriormente descritas (Drees e cols., 2001), sugerem um modelo em que Pkc1 age

em uma via de sinalização diferente daquela da cascata de MAP quinases. Além disso, estes dados sugerem que Zds1 e Gic1 participam nesta via de sinalização. Assim, uma vez que todos estes fatores agem na mesma via para promover a supressão do mutante de eIF5A, é possível que eIF5A possua um papel na polaridade celular.

*4.1.3. O mutante *tif51A-1* de eIF5A interage geneticamente com fatores da transição G1/S envolvidos com a polaridade celular e é importante para a correta organização do citoesqueleto de actina*

Para compreender melhor a função de eIF5A, outros genes relacionados funcionalmente àqueles supressores identificados no rastreamento foram testados para determinar se poderiam também suprimir o defeito de crescimento do mutante *tif51A-1* (Tabela 4). Como mencionado antes, para aqueles genes relacionados à via da integridade celular, somente os membros que possivelmente agem acima de Pkc1 (Wsc1-3, Mid2, Mtl1, Rom2 e Rho2 - Hohmann, 2002) puderam suprimir o fenótipo temperatura-sensível do mutante *tif51A-1*. Além do papel de Pkc1 na via da integridade celular, essa quinase é também correlacionada geneticamente às ciclinas G1 através de uma rede de interações (Lenburg e O'Shea, 2001). Assim, foi testado se a superexpressão das ciclinas de G1 *PCL1*, *PCL2* e *CLN2* suprimiria o mutante *tif51A-1*. Notavelmente, somente *PCL1* pôde suprimir o mutante *tif51A-1* (Figura 11B e Tabela 4).

Em seguida, os genes ligados funcionalmente a Gic1 (Figura 9) foram testados quanto à supressão do mutante *tif51A-1*. Inicialmente, o homólogo de *GIC1*, *GIC2*, e o gene que codifica o recrutador de Gic1, *CDC42*, foram testados. Inesperadamente, nenhum deles pôde suprimir o fenótipo do mutante *tif51A-1*, sugerindo que a supressão é dependente de uma função específica de Gic1 (Figura 11A e Tabela 4).

Os genes que codificam para outros efetores de Cdc42, *CLA4* e *STE20*, e o ativador de Cdc42, *CDC24*, também não puderam suprimir o fenótipo *tif51A-1* (Tabela 4). Esses dados reforçam a hipótese de que uma função específica de Gic1 é necessária para a supressão de *tif51A-1*.

A fim de determinar se a interação entre Gic1 e Cdc42 é requerida para a supressão de *tif51A-1* mediada por *GIC1*, foi testado se *GIC1^{CRIB-}*, um alelo que leva à perda de interação física com Cdc42 (Brown e cols., 1997), é capaz de suprimir o mutante *tif51A-1*. Como mostrado na Figura 11A, *GIC1* sem o domínio CRIB não suprime o mutante *tif51A-1*, sugerindo que, embora *CDC42* não seja um supressor por si só, a interação física Gic1-Cdc42 deve ser necessária para a supressão em alto número de cópias promovida por *GIC1* do fenótipo temperatura-sensível de *tif51A-1*.

Além da função de Gic1 na polarização de actina, um rastreamento de supressor em alto número de cópias com *let1Δ*, mutante de um componente de MEN (“mitotic exit network”), recentemente relacionou Gic1 a este processo. Esse novo papel de Gic1 é separável de sua função na transição G1/S, já que uma forma prenilada de Gic1 não possui atividade com relação à saída da mitose, mas mantém sua função na polaridade celular. Essa forma prenilada de Gic1 (*Gic1-pr*) elimina a sua localização nuclear, permitindo apenas a sua interação com o córtex celular (Höfken e Schiebel, 2004). Para determinar qual função de Gic1 é necessária para suprimir o fenótipo do mutante *tif51A-1*, foi testado *Gic1* restrito ao córtex quanto à capacidade de supressão de *tif51A-1*. Como mostrado na Figura 11A, *Gic1-pr* promove o crescimento do mutante *tif51A-1* na temperatura não-permissiva. Esse resultado dá suporte ao modelo em que a função de Gic1 na transição G1/S é a responsável pela supressão do mutante *tif51A-1*.

O último grupo de genes ligados funcionalmente a *GIC1* inclui: *BEM2*, *BEM1*, *BNI1* e *BUD1* (*RSR1*). Esses genes são envolvidos com o crescimento celular polarizado e mostram defeitos genéticos quando combinados com *gic1Δ gic2Δ* (Chen e cols., 1997; Jaquenoud e Peter, 2000; Kawasaki e cols., 2003). Foi então testado se algum desses genes poderia suprimir o fenótipo do mutante *tif51A-1*. Esta análise revelou que *BEM1* e *BNI1* também são supressores em alto número de cópias de *tif51A-1* (Figura 11B e Tabela 4). Esses resultados mostram que outros fatores importantes para a transição G1/S em *S. cerevisiae* também podem suprimir o mutante *tif51A-1*.

Finalmente, foi testado se os seguintes genes correlacionados a *ZDS1* poderiam suprimir *tif51A-1*: *ZDS2*, seu homólogo; *RGA1* e *BEM3*, que codificam para reguladores negativos de Cdc42; e *SSD1*, um gene de função desconhecida que suprime defeitos da via de integridade celular e tem seu mutante nulo suprimido por *ZDS1* (Tsuchiya e cols., 1996; Kaeberlein e Guarente, 2002). Entre esses genes, somente *ZDS2* e *SSD1* suprimem o fenótipo de *tif51A-1* (Figura 11B e Tabela 4). Esses resultados mostram que *ZDS2* compartilha a função de *ZDS1* necessária para a supressão do mutante *tif51A-1*. O fato de a presença de *SSD1* compensar consideravelmente a perda da função de eIF5A será discutido mais adiante. A observação de que nem *RGA1* nem *BEM3* foram identificados como supressores sugere que a função de Zds1 importante para a supressão não está relacionada a seu papel de regulação negativa de Cdc42 (Bi e Pringle, 1996).

É importante ressaltar que todos os plasmídeos testados de resultados negativos quanto a supressão do mutante *tif51A-1* foram também testados em outros ensaios para garantir a sua funcionalidade e confirmar que a ausência de supressão do mutante *tif51A-1* não se deve a problemas de expressão ou identidade

dos plasmídeos utilizados. Os resultados dos ensaios funcionais utilizados para validação dos plasmídeos que não foram capazes de suprimir o fenótipo de sensibilidade a temperatura do alelo *tif51A-1* estão apresentados no Anexo II (Material Suplementar do artigo “Pkc1 acts through Zds1 and Gic1 to suppress growth and cell polarity defects of a yeast eIF5A mutant”, apresentado no Anexo I).

Dessa maneira, os resultados apresentados apontam para a existência de um defeito de G1/S no mutante *tif51A-1*, uma vez que a maioria dos supressores descritos acima atuam na polaridade celular durante a progressão do ciclo celular. Um evento importante na transição de G1/S em *S. cerevisiae* é o estabelecimento de um eixo central de polaridade. Imediatamente após o posicionamento dos fatores relacionados a Cdc42 no local do broto, a montagem de um citoesqueleto de actina polarizado é crucial para a progressão do ciclo celular de G1 até o final de G2 (Pruyne e cols., 2004; Figura 12 e Figura 9). Dessa maneira, foi testado se dois mutantes de *TIF51A*, *tif51A-1* e *tif51A-3*, exibem algum defeito na polarização de actina. Interessantemente, ambos os mutantes mostraram defeitos marcantes na organização do citoesqueleto de actina na temperatura não-permissiva. Por outro lado, os cabos e os “patches” de actina parecem normais durante o crescimento na temperatura permissiva (Figura 13A).

Para testar se *PKC1* e os novos supressores identificados, *GIC1* e *ZDS1*, podem suprimir o defeito da organização de actina assim como o fenótipo de crescimento do mutante *tif51A-1* na temperatura não-permissiva, foi analisada a organização do citoesqueleto de actina do mutante *tif51A-1* na presença de *PKC1*, *GIC1* e *ZDS1* em alto número de cópias (Figura 13B). Os resultados demonstram que a supressão do fenótipo temperatura-sensível de crescimento está correlacionado com a supressão do defeito da organização de actina na temperatura

restritiva e sugerem que eIF5A desempenhe um papel no estabelecimento da polaridade celular.

4.1.4. A superexpressão de *GIC1* pode causar hiperpolarização celular

Ao analisar o efeito da superexpressão de *GIC1* com relação ao defeito de citoesqueleto de actina do mutante *tif51A-1*, notou-se que aproximadamente 10-20% das células exibiam brotos alongados com o citoesqueleto de actina hiperpolarizado (Figura 13B, painel *GIC1* inferior). Para investigar se essa hiperpolarização estava correlacionada à supressão do mutante *tif51A-1* por *GIC1*, a morfologia das células crescendo na temperatura restritiva foi verificada. Observou-se que ambas as morfologias alongadas e normais estavam presentes, porém as alongadas ocorriam em um número muito mais baixo, aparentemente na mesma frequência que aquela vista durante a observação do citoesqueleto do actina (dados não mostrados). Além disso, para verificar se as células que adquirem morfologia alongada podem progredir através do ciclo celular e não estão, portanto, doentes ou inviáveis, foi realizada análise microscópica de uma mesma célula em diferentes intervalos de tempo. Esta análise não revelou nenhum defeito aparente no crescimento e, além disso, a geração de novos brotos também foi observada (Figura 14). Esses dados implicam que o hiperpolarização de actina não é necessária para a supressão por *GIC1* e que as células alongadas resultantes podem progredir através do ciclo celular.

4.1.5. *GIC1* e *BNI1* suprimem o defeito de crescimento de um mutante temperatura-sensível de *PKC1*

Os resultados apresentados acima sugerem uma via que ramifica de Pkc1 para Gic1. Dessa maneira, foi hipotetizado que um aumento nos níveis de Gic1 suprimiriam um mutante de *PKC1*. Para testar essa hipótese, foi avaliada a habilidade de *GIC1* em alto número de cópias, assim como da formina *BNI1*, de suprimir o fenótipo temperatura-sensível do mutante *stt1* de *PKC1* (Figura 15). Confirmando a hipótese proposta, *GIC1* e *BNI1* em alto número de cópias foram capazes de melhorar o crescimento do mutante de *PKC1* (*stt1*) na temperatura restritiva. Este dado fortalece a existência de uma nova via envolvendo Gic1 abaixo de Pkc1.

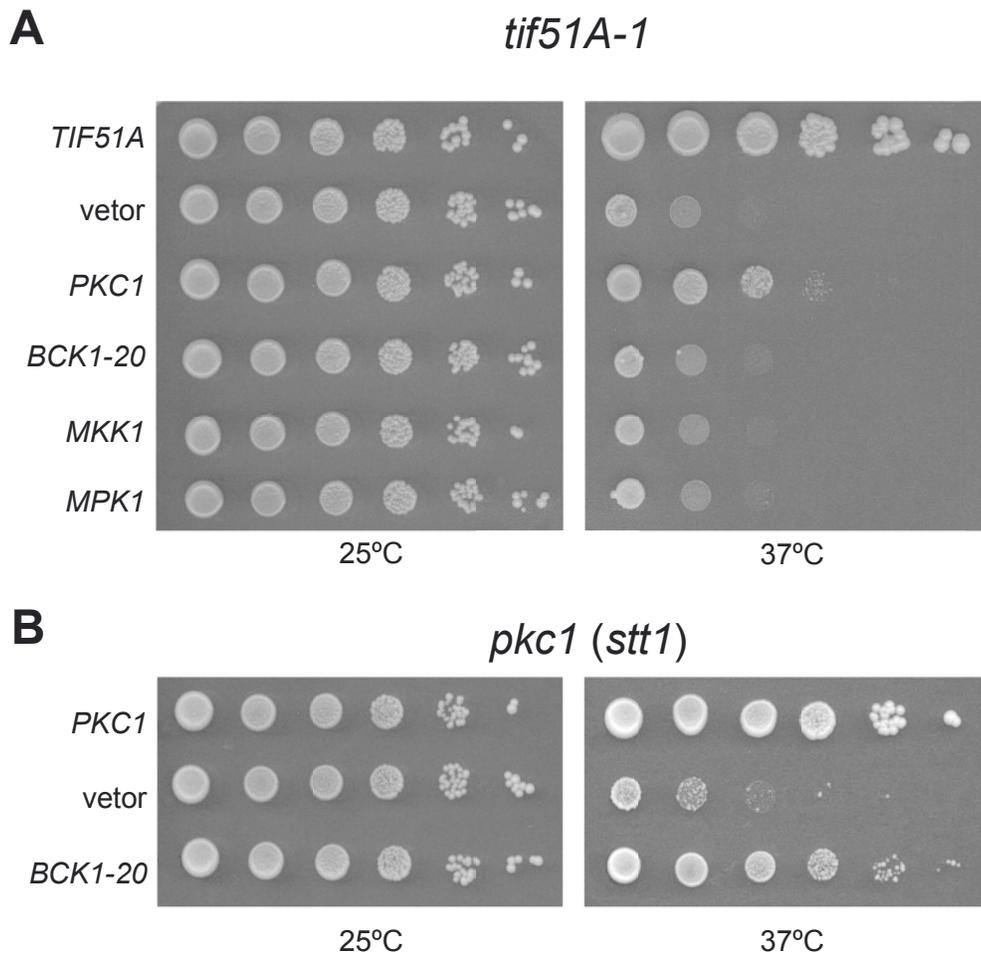


Figura 6. A supressão do mutante *tif51A-1* por *PKC1* é independente da via de MAP quinases. (A) Diluições seriadas 1:10 de culturas de *tif51A-1* (SVL14) contendo pSV107 (*TIF51A*), pSV65 (vetor), pSV181 (*PKC1*), pSV294 (*BCK1-20*), pSV295 (*MKK1*) ou pSV296 (*MPK1*) foram plaqueadas em meio SC sólido para determinar o crescimento nas temperaturas permissiva (25°C) ou não-permissiva (37°C). (B) Células do mutante temperatura-sensível de *PKC1* (SVL170) contendo pSV181 (*PKC1*), pRS426 (vetor) ou pSV294 (*BCK1-20*) foram testadas como descrito em (A). As placas foram fotografadas após 3-4 dias de crescimento.

Tabela 4. Genes analisados quanto a sua habilidade de suprimir o fenótipo de sensibilidade a temperatura do mutante *tif51A-1*.

Gene	Informação funcional	Supressão
<i>TIF51A</i> (pSV107 e pSV108)	Provável fator de início de tradução 5A (eIF5A)	+
<i>WSC1</i> (pSV115)	Sensor para sinalização de integridade da superfície celular, possui um papel na ativação da via Pkc1-MAPK; família Wsc	+
<i>WSC2</i> (pSV116)	Sensor para sinalização de integridade da superfície celular; família Wsc	+
<i>WSC3</i> (pSV117)	Sensor para sinalização de integridade da superfície celular; família Wsc	+
<i>MID2</i> (pSV387)	Sensor para sinalização de integridade da superfície celular, possui um papel na ativação da via Pkc1-MAPK; homólogo de Mtl1	+
<i>MTL1</i> (pSV388)	Proteína que age na sinalização de estresse de parede celular, possui um papel na regulação da sinalização de integridade da superfície celular; homólogo de Mtl1	+
<i>ROM2</i> (pSV292)	GEF (“GDP/GTP exchange fator”) para Rho1 e Rho2	+
<i>RHO2</i> (pSV293)	Proteína ligante de GTP, membro da subfamília Rho de proteínas semelhantes a Ras	+
<i>PKC1</i> (pSV181)	Proteína quinase C, regula cascata de MAP quinases envolvida na regulação do metabolismo de parede celular (via de integridade da superfície celular)	+
<i>BCK1-20</i> ^(a) (pSV294)	MAP quinase quinase quinase, componente da via de integridade da superfície celular	-
<i>MKK1</i> (pSV295)	MAP quinase quinase, componente da via de integridade da superfície celular	-
<i>MPK1</i> (pSV296)	MAP quinase, componente da via de integridade da superfície celular	-
<i>ZDS1</i> (pSV589)	Proteína que atua na polaridade celular e silenciamento transcricional; homólogo de Zds2	+
<i>GIC1</i> (pSV304 e pSV531)	Efector de Cdc42, importante para o brotamento; homólogo de Gic2	+
<i>GIC1^{CRIB-}</i> ^(b) (pSV534)	Efector de Cdc42, importante para o brotamento; homólogo de Gic2	+
<i>GIC1-pr</i> ^(c) (pSV535)	Efector de Cdc42, importante para o brotamento; homólogo de Gic2	+
<i>PCL1</i> (pSV411)	Ciclina de Pho85 específica de G1/S	+
<i>PCL2</i> (pSV412)	Ciclina de Pho85 específica de G1/S	-

<i>CLN2</i> (pSV396)	Ciclina de Cdc28 específica de G1/S	-
<i>GIC2</i> (pSV532)	Efetuor de Cdc42, importante para o brotamento; homólogo de Gic1	-
<i>CDC42</i> (pSV377)	GTPase do tipo Rho envolvida na montagem do complexo para brotamento e polaridade celular	-
<i>CLA4</i> (pSV403)	PAK quinase necessária para citocinese, efetuor de Cdc42	-
<i>STE20</i> (pSV407)	PAK quinase da via de feromônio; também regula crescimento polarizado, efetuor de Cdc42	-
<i>CDC24</i> (pSV376)	GEF ("GDP/GTP exchange factor") para Cdc42, envolvido no brotamento, seleção do local de brotamento e crescimento da projeção para acasalamento	-
<i>BUD1</i> (pSV455)	Proteína ligante de GTP da superfamília Ras, atua na seleção do local de brotamento	-
<i>BEM1</i> (pSV401)	Proteína "scaffold" para complexos envolvidos em estabelecimento de polaridade celular e fatores de morfogênese como Cdc24 e Bud1	+
<i>BEM2</i> (pSV454)	GAP ("GTPase activating protein") para Rho1	-
<i>BNI1</i> (pSV352)	Formina envolvida na polarização do citoesqueleto e citocinese	+
<i>ZDS2</i> (pSV588)	Proteína que atua na polaridade celular e silenciamento transcricional, homólogo de Zds1	+
<i>RGA1</i> (pSV383)	GAP ("GTPase activating protein") para Cdc42	-
<i>BEM3</i> (pSV381)	GAP ("GTPase activating protein") para Cdc42	-
<i>SSD1</i> (pSV384)	Proteína ligante de mRNA; possui um papel na manutenção da integridade celular	+

^(a) Codifica para uma versão constitutivamente ativa de Bck1 (Lee e Levin, 1992).

^(b) Codifica para uma versão de Gic1 sem o domínio CRIB (Höfken e Schiebel, 2004).

^(c) Codifica para uma versão prenilada de Gic1 (Höfken e Schiebel, 2004).

Tabela 5. Genes clonados no rastreamento de supressores do fenótipo de sensibilidade a temperatura do mutante *tif51A-1*.

Número de clones isolados	Gene supressor identificado
1	<i>TIF51A</i>
1*	<i>TIF51B</i>
4	<i>YOR137C / SIA1</i>
1	<i>PKC1</i>
2	<i>WSC1</i>
8	<i>WSC2</i>
2	<i>PAB1</i>
4*	<i>GIC1</i>
1*	<i>HSP150</i>
1*	<i>ZDS1</i>

* clones contendo genes que não haviam sido identificados antes como supressores.

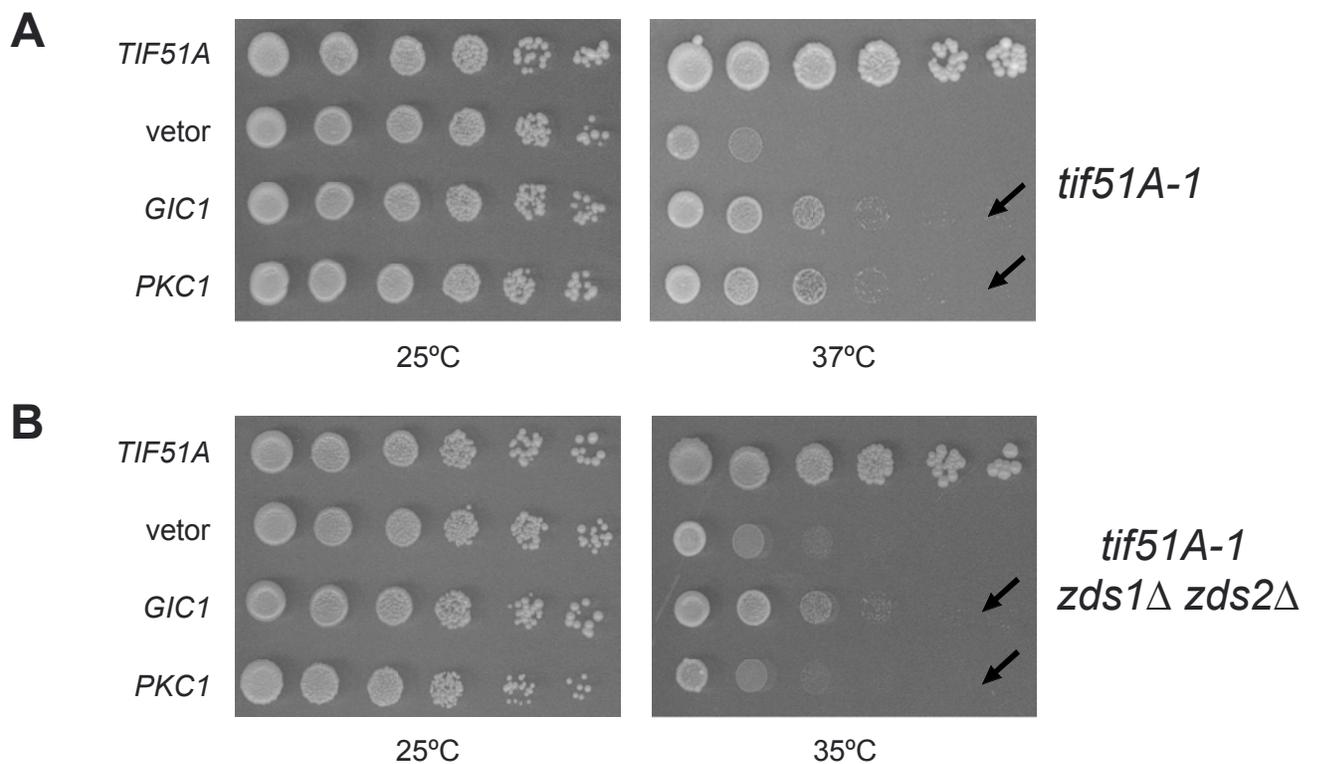


Figura 10. A supressão do mutante *tif51A-1* por *PKC1* é dependente dos genes *ZDS1* e *ZDS2*. Diluições seriadas das linhagens *tif51A-1* (SVL412 - painel A) e *tif51A-1 zds1Δ zds2Δ* (SVL411 - painel B) contendo os plasmídeos pSV107 (*TIF51A*), p65 (vetor), pSV304 (*GIC1*) ou pSV181 (*PKC1*) foram crescidas por 3-4 dias em placas de SC a 25°C, 35°C ou 37°C.

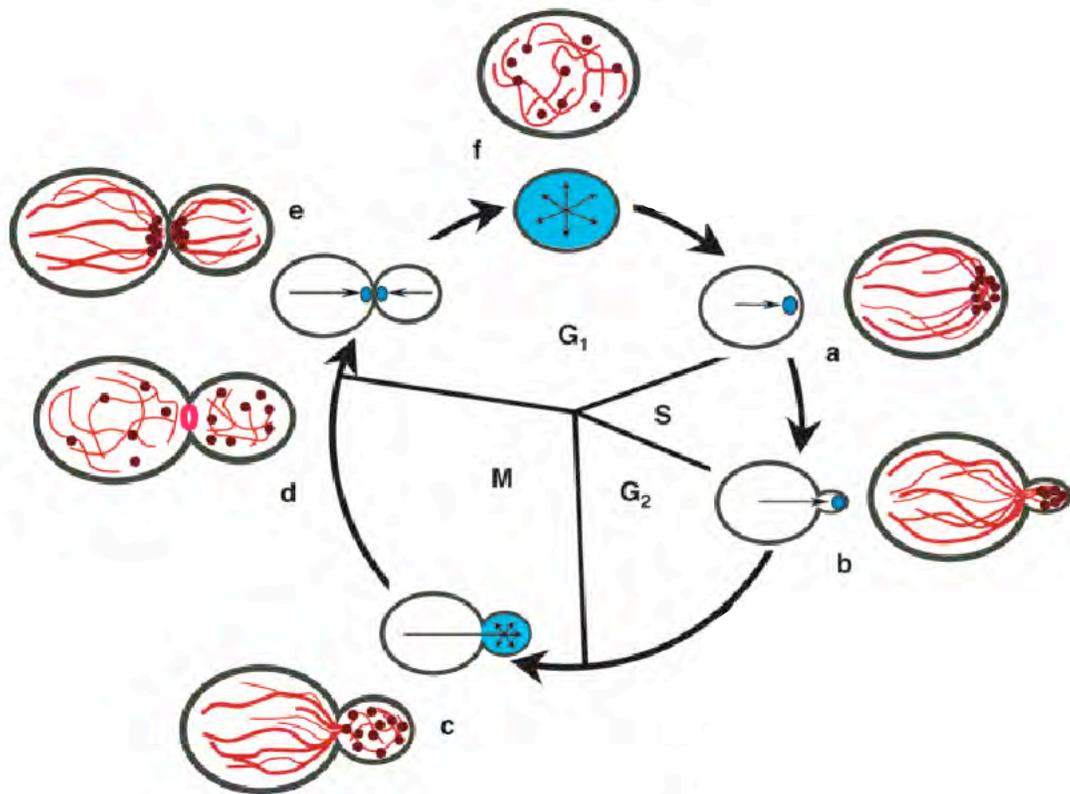


Figura 12. Esquema da polaridade celular em *S. cerevisiae* ao longo do ciclo de divisão celular. (Modificado de Pruyne e Bretscher, 2000)

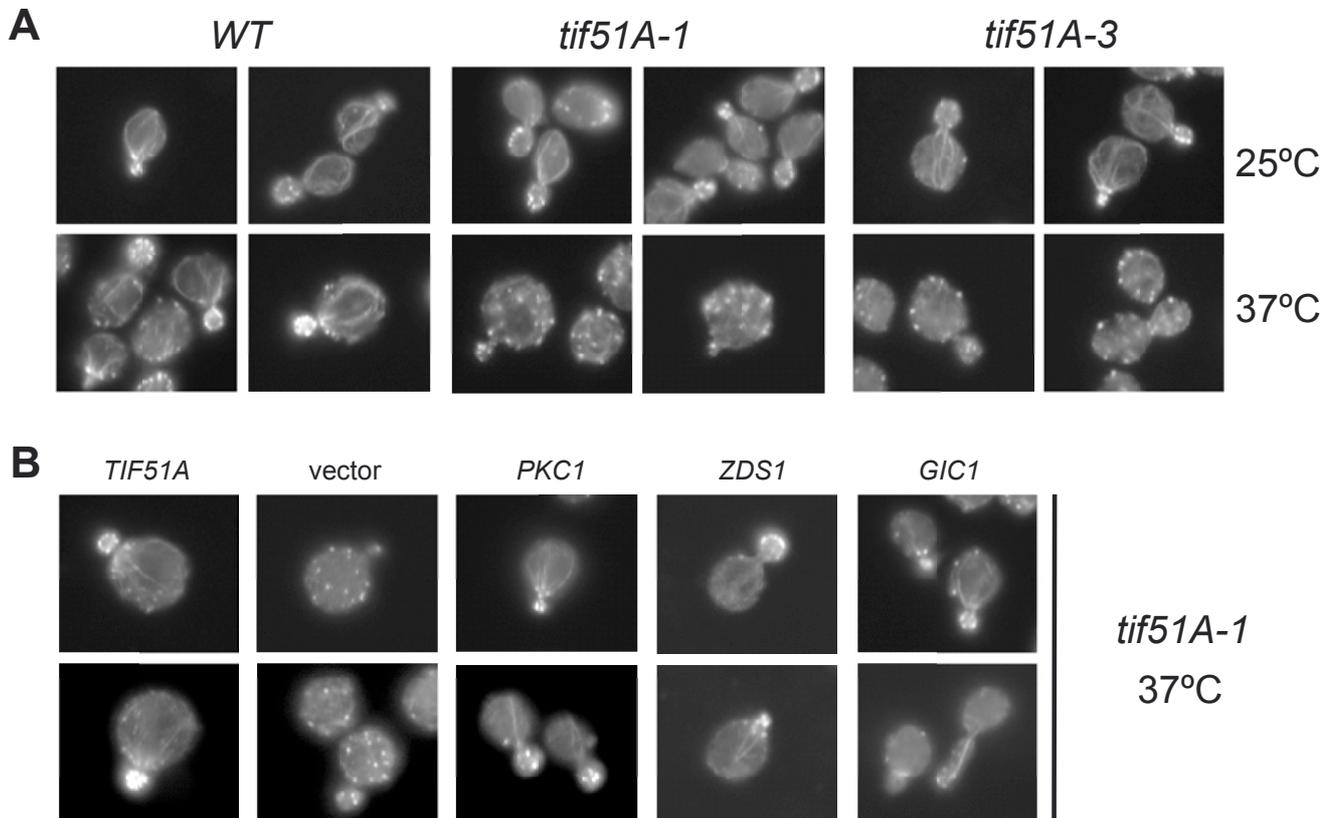


Figura 13. O defeito de citoesqueleto de actina do mutante *tif51A-1* também é suprimido pelos genes *PKC1*, *ZDS1* e *GIC1*. (A) A linhagem selvagem SVL82 (W303) e os mutantes *tif51A-1* e *tif51A-3* (SVL14 e SVL32) foram crescidos a 25°C e em seguida incubados a 37°C por 4 h. O citoesqueleto de actina foi marcado com o conjugado faloidina-rodamina e visualizado por microscopia de fluorescência. (B) Células do mutante *tif51A-1* (SVL14) contendo pSV107 (*TIF51A*), p65 (vetor), pSV181 (*PKC1*), pSV589 (*ZDS1*) e pSV304 (*GIC1*) foram analisadas como descrito em (A).

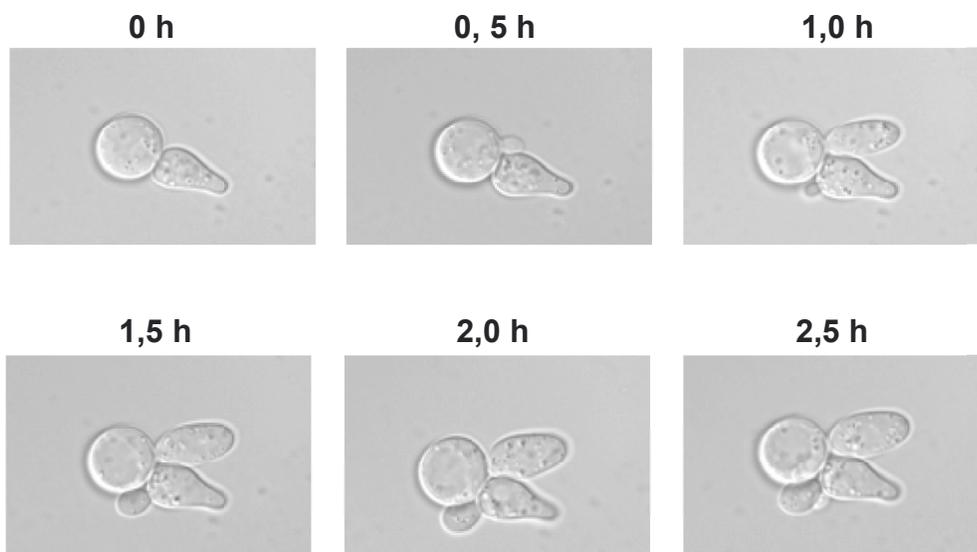


Figura 14. Expressão de *GIC1* a partir de um plasmídeo de alto número de cópias pode gerar células alongadas. Imagens microscópicas de uma mesma célula do mutante *tif51A-1* (SVL14) contendo o pSV304 (*GIC1*) em diferentes intervalos de tempo. Uma alíquota de cultura em fase logarítmica de células crescendo em meio líquido SC foi coletada e monitorada por microscopia em diferentes intervalos de tempo após imobilização das células em lâmina coberta com SC sólido. As células foram fotografadas em intervalos de 30 minutos por 150 minutos à temperatura ambiente.

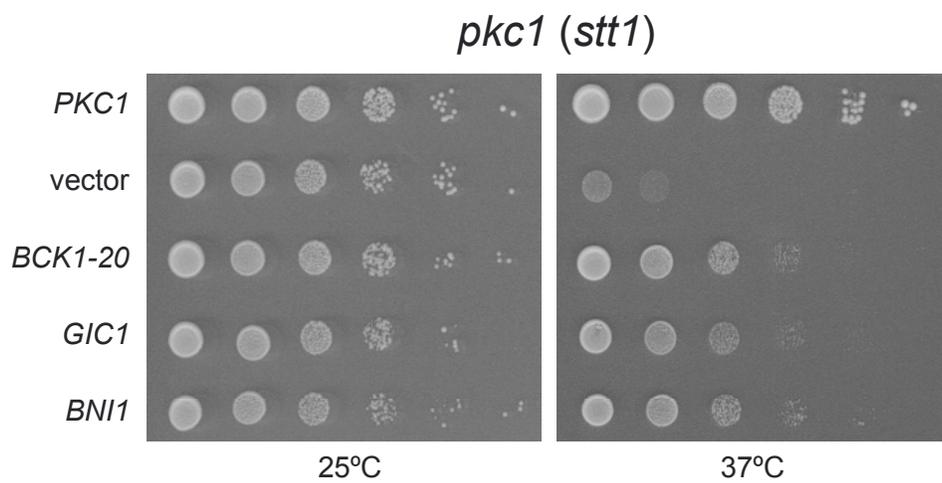


Figura 15. *GIC1* e *BNI1* em alto número de cópias suprimem o fenótipo temperatura-sensível de uma linhagem mutante *pkc1 (stt1 - SVL170)*. Diluições seriadas da linhagem *pkc1 (stt1 - SVL170)* contendo os plasmídeos pSV181 (*PKC1*), pSV65 (vetor), pSV294 (*BCK1-20*) ou pSV304 (*GIC1*) foram crescidas por 3-4 dias em placas de SC a 25°C e 37°C.

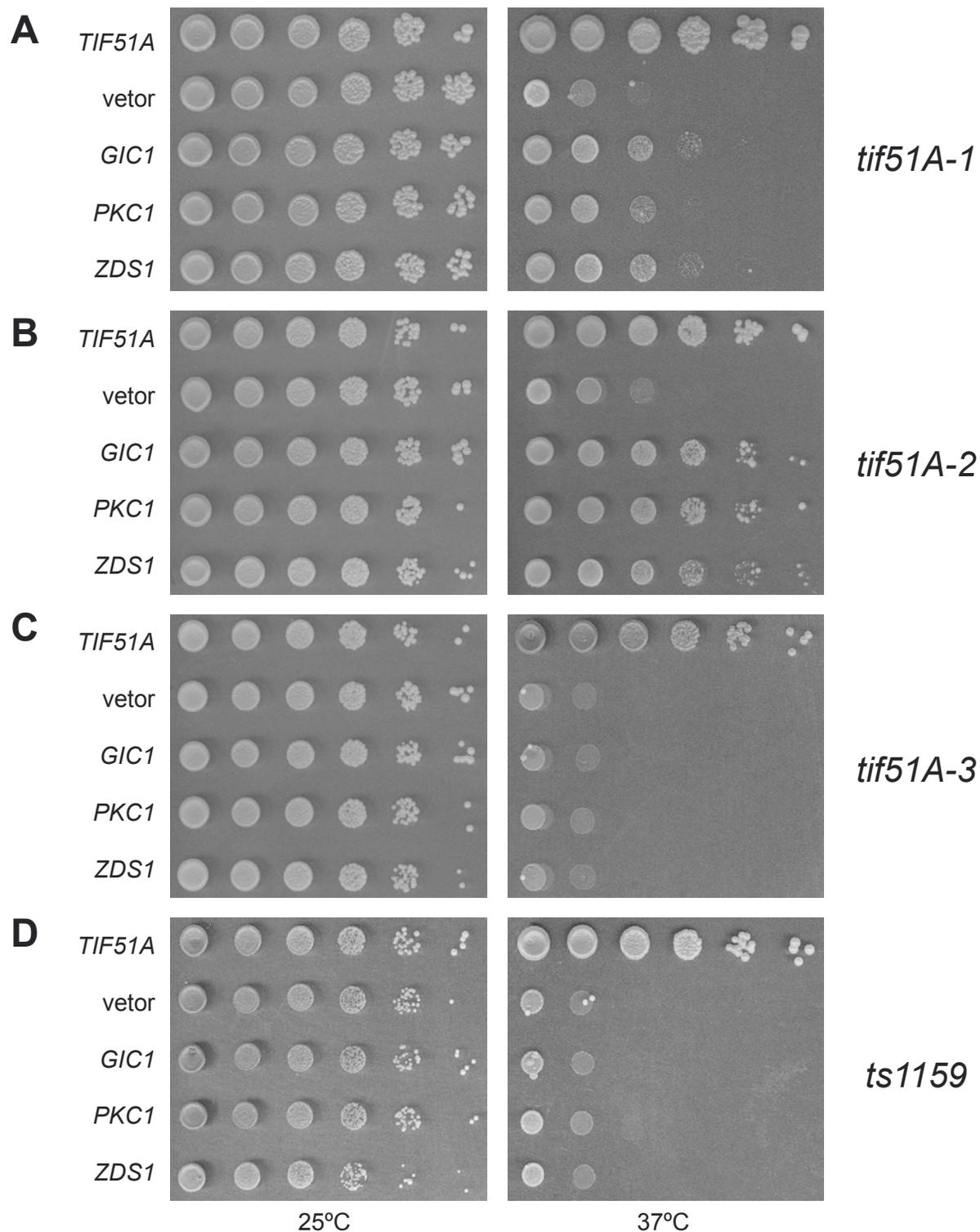


Figura 8. Análise de especificidade alélica da supressão promovida por *GIC1*, *ZDS1* e *PKC1* em alto número de cópias. Diluições das linhagens *tif51A-1* (SVL14), *tif51A-2* (SVL26), *tif51A-3* (SVL32) e *ts1159* (SVL248) contendo os plasmídeos pSV107 (*TIF51A*), pSV65 (vetor), pSV304 (*GIC1*), pSV181 (*PKC1*) e pSV589 (*ZDS1*) foram crescidas por 3-4 dias em placas de SC a 25°C e 37°C.

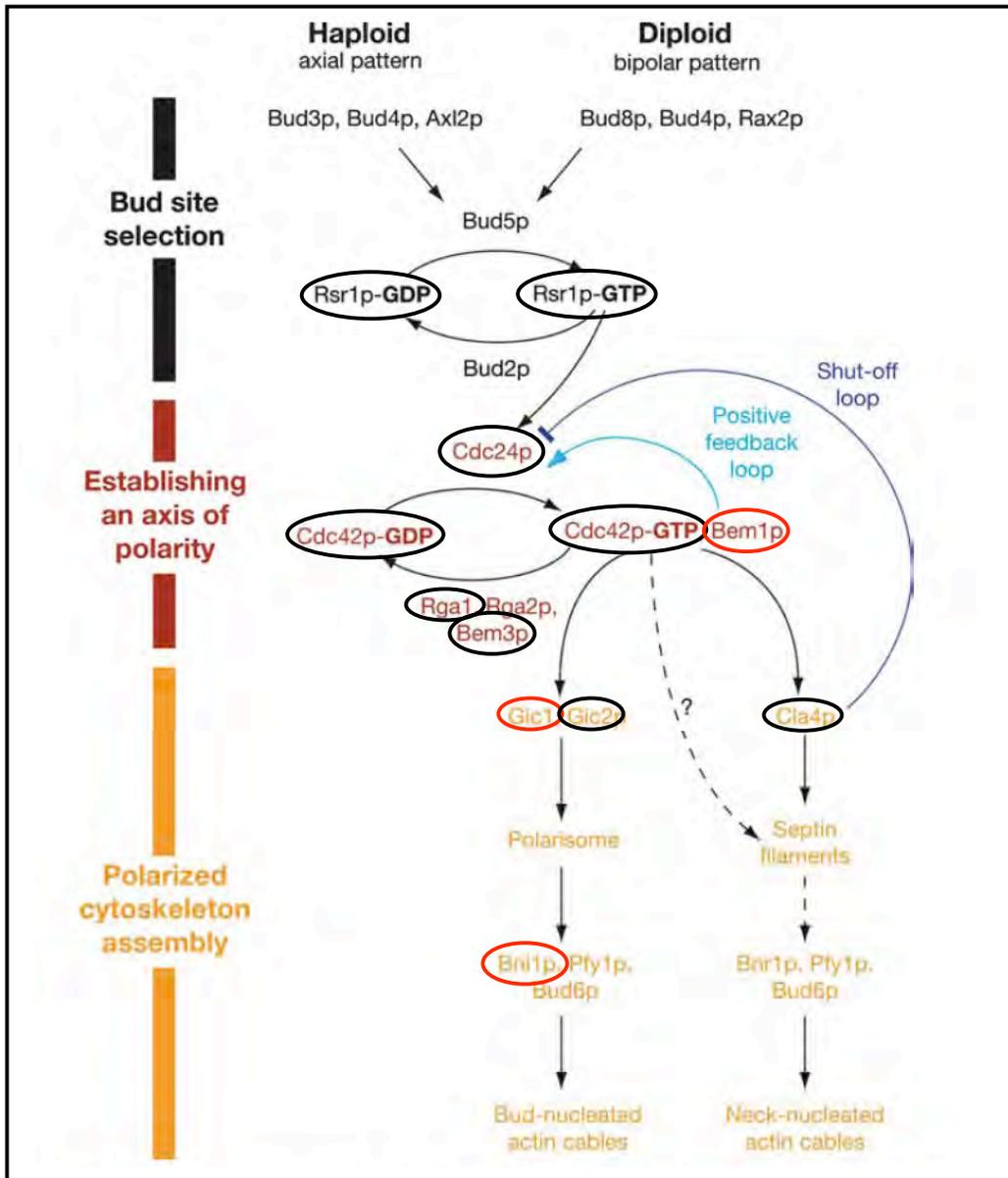


Figura 9. Esquema simplificado das vias de sinalização que levam ao estabelecimento de um citoesqueleto polarizado no começo da transição G1/S do ciclo celular em *S. cerevisiae*. Os membros circulos são todos aqueles testados como supressores do alelo *tif51A-1*, enquanto que apenas aqueles circulos em vermelho apresentaram resultado positivo. (Modificado de Pruyne e cols., 2004)

4.2. Análise da expressão gênica diferencial de um mutante de eIF5A

4.2.1. Distribuição de eIF5A e efeito de mutantes de eIF5A no perfil polissomal

Como apresentado na Introdução, eIF5A foi originalmente isolado de ribossomos de lisados de reticulócitos de coelho, um sistema, então, utilizado para a identificação de fatores envolvidos com o início da síntese protéica de eucariotos (Benne e cols., 1978). Apesar de outros trabalhos não terem confirmado o envolvimento deste fator com o processo geral de tradução, foi proposto que eIF5A seja importante para a tradução de um subgrupo específico de mRNAs (Benne e Hershey, 1978; Kang e Hershey, 1994). É importante ressaltar que os experimentos descritos neste item e no item seguinte foram realizados no laboratório da Dra. Pamela Silver, da “Harvard Medical School” – Boston, MA-EUA.

No intuito de contribuir para a definição do papel de eIF5A na tradução, inicialmente foi analisado se eIF5A se associa especificamente a ribossomos que estão participando do processo de tradução. Para isso, utilizou-se a separação das frações ribossomais em gradiente de sacarose para a determinação do perfil polissomal de uma linhagem selvagem W303 (SVL82). As amostras coletadas dos gradientes foram utilizadas para determinação do conteúdo das proteínas eIF5A e L5 por western blot, e rRNA, por visualização em gel de agarose (Figura 16). Como pode ser visto nessa figura, a distribuição da proteína ribossomal L5 da subunidade maior e do rRNA 25S corresponde à distribuição da subunidade ribossomal 60S (sozinha ou acoplada) no traçado gerado pela Abs_{254nm} (Figura 16A). Da mesma maneira, a distribuição do rRNA 18S corresponde à distribuição da subunidade ribossomal 40S (sozinha ou acoplada) no traçado gerado pela Abs_{254nm} (Figura 16A). Essas marcações revelam uma boa qualidade do fracionamento realizado. Assim, pode-se concluir que eIF5A encontra-se distribuída principalmente desde as frações

pré-ribossomais até as frações que correspondem ao início dos polissomos (Figura 16A).

Na tentativa de se determinar se esta co-localização de eIF5A com frações ribossomais se dá de maneira específica, foram realizados alguns procedimentos que levam à interferência com o processo de tradução, e a localização de eIF5A foi novamente verificada nestas circunstâncias.

Primeiramente, foi realizado o perfil polissomal sem a utilização do antibiótico ciclo-heximida, o qual é responsável pela estabilização dos ribossomos 80S ligados ao mRNA (que formam os polissomos). Como pode ser visto na Figura 16B, a ausência de ciclo-heximida leva à uma diminuição muito grande da quantidade de polissomos e ao aumento das frações 40S, 60S e 80S. Nessa condição, houve uma diminuição significativa de eIF5A nas amostras correspondentes a 80S em diante (comparar canaletas 9 e 10 nos painéis A e B da Figura 16), indicando uma diminuição da possível associação de eIF5A com os ribossomos presentes nestas frações.

Em seguida, foram realizados tratamentos com EDTA e RNase A das amostras antes de preparação do perfil polissomal. O EDTA leva à perda de interação entre as subunidades 40S e 60S, por se complexar com íons magnésio, necessários para a montagem do 80S, gerando, então, dois picos claros, correspondentes às duas subunidades ribossomais separadas (Figura 16C). A RNase A, por sua vez, ocasiona a degradação do mRNA acessível entre os ribossomos, levando à perda das frações polissomais e convertendo-as em apenas um pico de 80S (Figura 16D). Como pode ser visto nos painéis C e D da Figura 16, a associação de eIF5A é diminuída com relação àquela observada na Figura 16A, dando suporte à hipótese de que eIF5A se associa especificamente a 80S (monossomos) engajados no

processo de tradução. À título de observação, na Figura 16C, a localização de L5 não corresponde à localização da subunidade maior 60S, pois esta proteína ribossomal perde a associação com 60S na presença de EDTA (Nazar e cols., 1979).

Um outro aspecto analisado foi o efeito da perda de função de eIF5A nos mutantes de *TIF51A* com relação ao perfil polissomal observado. Mutantes que levam à diminuição do início da tradução, sem alterar os processos de elongação e término da tradução, fazem com que ocorra uma diminuição considerável da quantidade de polissomos, alterando assim, o formato do perfil polissomal (Pestova e cols., 2001). Então, foi realizado o perfil polissomal das linhagens selvagem e dois mutantes de eIF5A (*tif51A-1* e *tif51A-3*) cultivadas nas temperaturas permissiva e restritiva. Observando-se a Figura 17, na temperatura permissiva, não é possível perceber nenhuma diferença bastante significativa nos mutantes com relação ao selvagem. Além disso, essa mesma figura mostra que, na temperatura restritiva, não existe uma redução muito grande da quantidade de polissomos, levando à redução do número máximo de ribossomos observados na fração polissomal de 8, no selvagem, para 6 nos mutantes. No entanto, é também possível de se observar uma diferença no formato da figura formada dos polissomos no selvagem com relação aos mutantes e da altura desses picos correspondentes aos mRNAs contendo 2, 3 e 4 ribossomos. O aumento da altura dos picos poderia indicar que, em vez de ocorrer um defeito na associação de novos ribossomos ao mesmo mRNA, como ocorre nos mutantes de fatores de início de tradução bem caracterizados (Greenberg e cols., 1998; Ptushkina e col., 1998), poderia estar ocorrendo um defeito de acúmulo de alguns polirribossomos, talvez pela inibição parcial da elongação da tradução.

Por fim, apesar de ser difícil evidenciar claramente o efeito da perda de função

de eIF5A sobre o perfil polissomal, as alterações do perfil observadas nos mutantes *tif51A-1* e *tif51A-3* fortalecem os dados de associação física de eIF5A com ribossomos envolvidos na tradução, trazendo, mais uma vez a possibilidade de uma função para este fator na tradução, talvez na etapa de alongação ao invés do início da tradução.

4.2.2. Perfil traducional do mutante *tif51A-1* de eIF5A

Uma vez que há muito foi proposto um papel para eIF5A na tradução de mRNAs específicos e que os dados apresentados anteriormente e de outros laboratórios dão, de certa forma, suporte para esta possibilidade, decidiu-se procurar por genes diferencialmente expressos no mutante *tif51A-1* com relação ao selvagem.

Para isso, foi realizado um ensaio de “microarray” utilizando mRNAs purificados a partir das frações polissomais obtidas do perfil polissomal (Beilharz e Preiss, 2004). O perfil de genes gerado desta maneira é chamado, então, de perfil traducional. No entanto, para que os resultados gerados reflitam apenas as alterações nos níveis de transcritos associados aos polissomos, é necessário, também, determinar o conteúdo total de mRNAs (perfil transcricional), uma vez que os níveis totais de um determinado mRNA pode influenciar diretamente os níveis deste transcrito nas frações polissomais.

Dessa maneira, foram realizados inicialmente ensaios de “microarray” utilizando mRNA total purificado das leveduras selvagem e mutante nas temperaturas permissiva e restritiva. Após realização de três réplicas provenientes de diferentes amostras biológicas, os dados foram extraídos e os resultados foram combinados para gerar um arquivo contendo as informações referentes a cada gene

do “microarray”. Foram excluídos de qualquer análise posterior aqueles genes cujos resultados não se mostraram consistentes entre as replicatas, utilizando-se a análise de probabilidade “Fisher’s Exact Test”, realizado pelo programa “Rosetta Resolver”. Para as análises subsequentes, foram levados em consideração essencialmente os valores da razão entre os níveis de um gene no mutante com relação ao selvagem (“Ratio”) e a probabilidade de hipótese nula (“P-value”), e foram considerados significantes todos os números de “P-value” inferiores a 0,05. Como pode ser visto na Tabela 6, a variação média nos níveis de transcritos do mutante em relação ao selvagem foi maior na temperatura restritiva do que na permissiva, o que é, na realidade, bastante esperado, uma vez que o mutante *tif51A-1* apresenta fenótipos bastante similares ao selvagem na temperatura permissiva (Valentini e cols., 2002; dados não mostrados).

Em seguida, foram analisadas as ontologias genéticas a que pertencem os transcritos significativamente alterados nas temperaturas permissiva e restritiva do mutante *tif51A-1*. Uma vez que os resultados obtidos utilizando-se diferentes valores de “P-value” não resultaram em grandes diferenças nas ontologias genéticas obtidas, foram escolhidos os valores de menor “P-value” para apresentação dos resultados.

As tabelas do Anexo III mostram as funções moleculares, os processos e os componentes celulares a que pertencem os transcritos que mostraram uma redução ($R < 1$) significativa ($P < 0,001$) no mutante *tif51A-1* na temperatura restritiva. Através desta classificação, obteve-se 1 função, 6 processos e 4 componentes. É importante ressaltar que um mesmo gene, ou um grupo de genes, pode fazer parte de diferentes funções, processos ou componentes celulares. Por exemplo, o gene *ERG7* codifica para a enzima lanosterol sintase, a qual está envolvida em diferentes

processos do metabolismo de derivados esteróides e do ergosterol, e, além disso, o produto de *ERG7* localiza-se no retículo endoplasmático. No entanto, o produto de *ERG7* também se localiza na membrana plasmática e em partículas lipídicas (<http://db.yeastgenome.org/cgi-bin/locus.pl?locus=erg7>), mas esses dois termos não foram obtidos na classificação mostrada na tabela do Anexo III, pois não houve um número mínimo de genes, na categoria analisada nesta tabela ($R < 1$ e $P < 0,001$), cujos produtos também apresentam tais localizações, não sendo, assim, significantes. Portanto, os genes cujos níveis estão diminuídos no mutante *tif51A-1* na temperatura restritiva, de uma maneira geral, estão envolvidos nos processos de transporte de sódio, e de derivados esteróides e ergosterol, e têm seus produtos localizados no retículo endoplasmático e vacúolo (Anexo III). As descrições de cada termo de ontologia genética obtidos também estão mostradas no Anexo III. Uma vez que eIF5A não deve possuir uma função direta na transcrição destes genes, baseando-se em sua literatura, podemos considerar que tais alterações nos níveis destes transcritos deve-se atribuir a efeitos indiretos da perda de função de eIF5A no mutante em questão. Partindo desse pressuposto, a inativação de eIF5A pode levar a alterações de função do retículo endoplasmático e do vacúolo, e também no transporte de sódio e síntese de ergosterol. Outra possibilidade, é que possa existir uma correlação direta da estabilidade desses mensageiros com a função de eIF5A, uma vez que eIF5A já foi correlacionada a esta função (Zuk e Jacobson, 1998; Valentini e cols., 2002).

Com relação aos genes de razão de expressão menor que 0,5 no mutante *tif51A-1* com relação ao selvagem, isto é, aqueles que tiveram uma redução maior ou igual a 2 vezes, nenhum resultado significativo de ontologia genética foi obtido.

Ainda com relação ao perfil transcricional, considerando-se os genes de

transcritos aumentados no mutante *tif51A-1*, com relação ao selvagem, na temperatura restritiva, foi obtido um número muito maior de termos de ontologia genética (Anexo IV), quando comparado com os genes de níveis reduzidos (apresentados anteriormente). Apesar de um grande número de termos obtidos para a classificação desses genes, podemos dividi-los, compreensivamente, em termos relacionados a: 1- metabolismo de aminoácidos, de ácidos carboxílicos e de enxofre; 2- biogênese de ribossomos citoplasmáticos e mitocondriais; 3- brotamento e divisão celular; e 4- replicação de retrotransposons (Ty1 e Ty2). Esses processos podem se correlacionar de diferentes maneiras aos fenótipos já conhecidos dos mutantes de *TIF51A* e serão discutidos mais adiante (ver Discussão).

É interessante ressaltar aqui o aparecimento de transcritos pertencentes aos retrotransposons Ty1 e Ty2 com níveis aumentados no mutante *tif51A-1* na temperatura restritiva. Curiosamente, o mesmo acontece em mutantes dos genes envolvidos com NMD (“Non-sense Mediated Decay”), os quais são importantes para o reconhecimento e destruição de uma série de transcritos contendo mutações que levam à perda da correta janela de leitura (He e cols., 2003). Além disso, a maior parte desses transcritos (85%) possui um aumento, com relação ao selvagem, igual ou maior que 2 vezes, na temperatura restritiva e o seu aumento também ocorre, em menor proporção, na temperatura permissiva (dados não mostrados).

Como já mencionado no parágrafo anterior, os transcritos pertencentes aos retrotransposons Ty1 e Ty2 estão aumentados 2 vezes ou mais no mutante na temperatura restritiva. Além deles, apresentam este grau de aumento com relação ao selvagem nesta condição, uma pequena parte dos transcritos envolvidos com metabolismo de aminoácidos e citocinese.

Além de necessária para a definição do perfil traducional, o estudo das

diferenças no conteúdo total de mRNAs (perfil transcricional) deve contribuir para a proposta de novos experimentos de análise dos defeitos apresentados pelo mutante *tif51A-1* nas temperatura permissiva e restritiva.

Após concluídas as análises do perfil transcricional, foram então realizados os ensaios de perfil traducional do mutante e selvagem e os dados obtidos foram processados e analisados como descrito no início deste item. Como a relação sinal/ruído foi muito menor para os experimentos de “microarray” com os mRNAs polissomais, somente foi possível utilizar para as análises os transcritos de razão menor ou maior que 1 e de “P-value” menor ou igual a 0,05. Foi feita, em seguida, utilizando-se esses grupos de genes de ambas as análises de “microarray”, a comparação dos resultados obtidos no perfil transcricional e no perfil traducional, para a subtração dos genes em comum. A Tabela 7 mostra os dados da comparação entre os experimentos de “microarray”, utilizando-se os resultados obtidos para transcritos de “P-value” menor ou igual a 0,05. Em seguida, foram utilizados os genes presentes apenas nos experimentos de perfil traducional (indicado na Tabela 7 como mRNA polissomal apenas) para as análises de ontologia genética.

Primeiramente, foram analisados os genes cujos transcritos se apresentavam diminuídos nas frações polissomais do mutante *tif51A-1* com relação ao selvagem na temperatura restritiva. Os resultados obtidos foram utilizados para montar a Tabela 8. A descrição dos termos obtidos na Tabela 8 está mostrada na Tabela 9. Curiosamente, os termos metabolismo de ácido carboxílico e ácido orgânico apareceram também entre os genes aumentados na análise do conteúdo total de mRNAs (Anexo IV). A obtenção dos mesmos termos em categorias opostas ($R < 1$ no perfil traducional e $R > 1$ no perfil transcricional) nos diferentes experimentos de

“microarray” poderia indicar que a tradução diminuída desses genes leva a um aumento nos níveis de sua transcrição, determinando, assim, um possível mecanismo de tentativa de compensação na expressão gênica.

A categoria “protein carrier activity”, também diminuída no perfil traducional, é composta pelos genes *NMD5*, *KAP95*, *SXM1*, *SRP1* e *PSE1*, que codificam para transportadores nucleocitoplasmáticos (Tabela 8). O aparecimento desta classe completa de transportadores nucleocitoplasmáticos poderia significar uma nova forma de controle da importação ou exportação nuclear não descrito até o momento.

Com relação aos genes de níveis aumentados no mutante *tif51A-1* com relação ao selvagem, dois termos de ontologia genética foram obtidos e estão mostrados na Tabela 10. Na Tabela 11 está descrito o componente a que pertencem os genes classificados. Ambos os termos estão relacionados a via secretória e também é bastante interessante o seu aparecimento, uma vez que mutantes de eIF5A interagem geneticamente com diferentes membros da via secretória (ver Discussão).

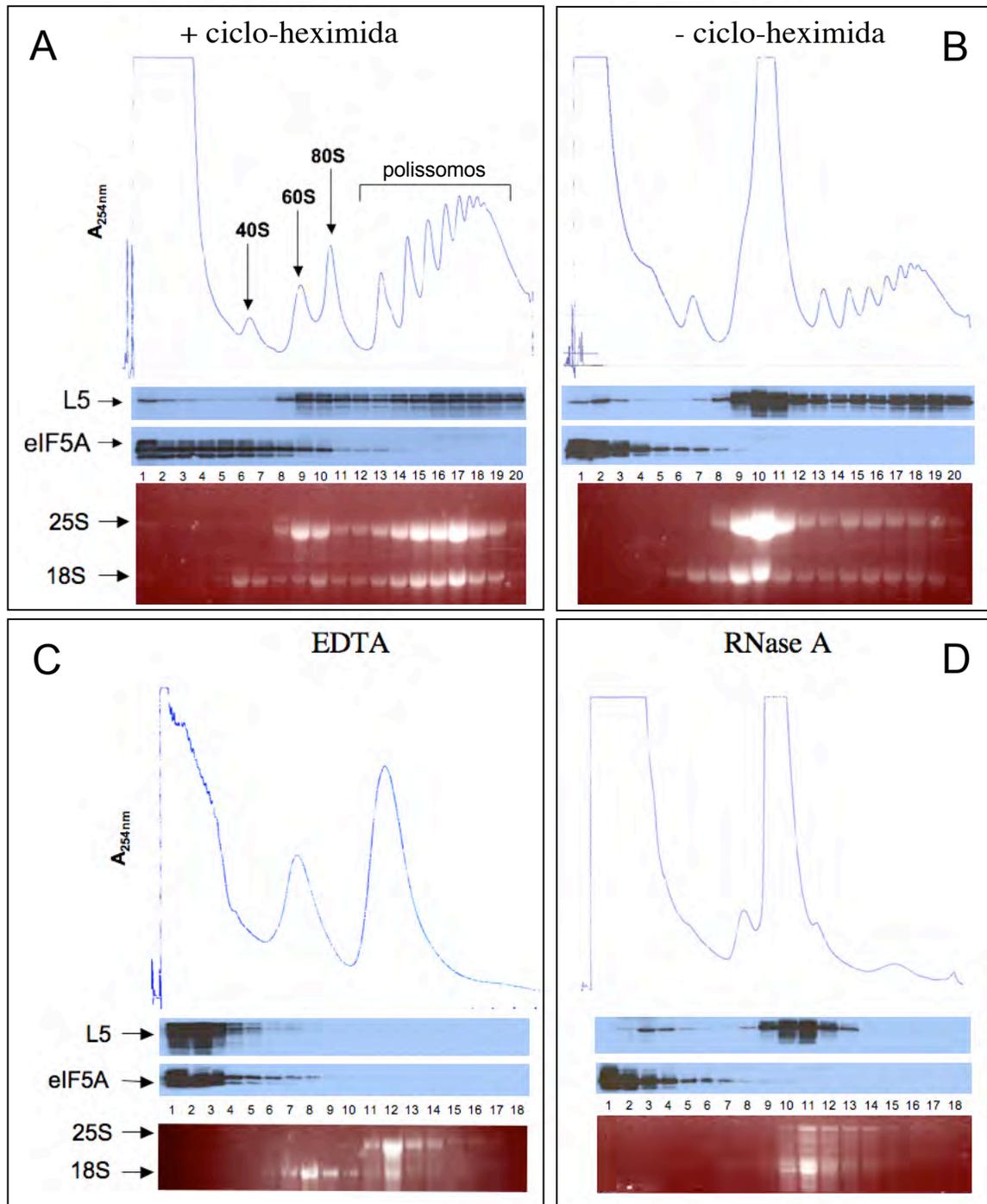


Figura 16. Análise da distribuição de eIF5A ao longo do perfil polissomal na linhagem selvagem W303 (SVL82). (A) Perfil polissomal realizado de maneira padrão. (B) Perfil polissomal realizado sem a utilização de ciclo-heximida para reduzir a quantidade de ribossomos envolvidos com o processo de tradução. (C) Perfil polissomal realizado com a adição de EDTA 40 mM. (D) Perfil polissomal realizado com a adição de RNase A 300 µg/mL.

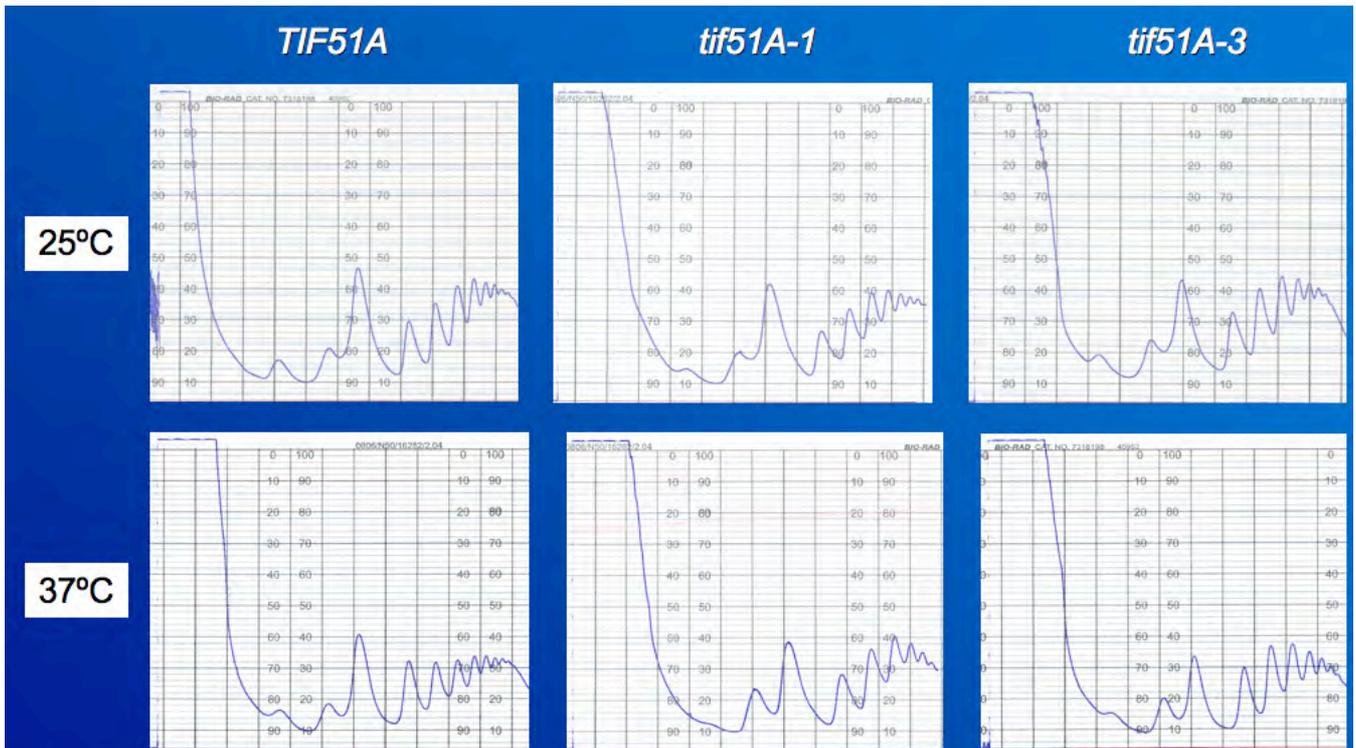


Figura 17. Análise do perfil polissomal das linhagens selvagem (SVL82), *tif51A-1* (SVL14) e *tif51A-3* (SVL32) nas temperaturas permissiva e restritiva. Os traçados representam a leitura de absorbância a 254nm dos gradientes de cada amostra.

Tabela 6. Resultados obtidos no perfil transcricional, em número de genes, para as condições permissiva e restritiva.

Grupo Condição	R ^a <1	R<1	R<1	R<0,5	R>1	R>1	R>1	R>2
	P ^b <0,05	P<0,01	P<0,001	P<0,001	P<0,05	P<0,01	P<0,001	P<0,001
Permissiva	204	65	35	14	301	142	71	12
Restritiva	1139	831	576	41	1317	981	664	62

^a R corresponde à razão (“Ratio”) dos níveis de cada transcrito no alelo *tif51A-1* com relação ao selvagem.

^b P corresponde ao “P-value” calculado para o resultado obtido para cada gene representado no “microarray”.

Tabela 7. Análise comparativa dos resultados obtidos nos experimentos de perfil transcricional e perfil traducional.

Grupo Condição	mRNA total apenas	comuns	mRNA polissomal apenas	mRNA total apenas	comuns	mRNA polissomal apenas
	R<1	R<1	R<1	R>1	R>1	R>1
Permissiva	189	15	42	273	28	37
Restritiva	999	140	290	1144	173	313

Tabela 8. Classificação utilizando ontologia genética para os transcritos de níveis significativamente ($P < 0.05$) diminuídos ($R < 1$) nas frações polissomais no mutante *tif51A-1* na temperatura restritiva.

GOID	GO_term	Probability	Genes
Molecular Function			
0008320	protein carrier activity	2.86e-15	NMD5 KAP95 SXM1 SRP1 PSE1
0003824	catalytic activity	2.70e-62	HSP33 ERR2 TKL2 SPC3 YGR287C YDR018C YEL047C VMA5 ERG9 MDH3 CPA1 POL2 TYS1 PGK1 RPT5 ASN2 PDR5 DPM1 RIB2 NAT5 GLO4 TDH2 KIN1 DLD2 PRO2 YHR020W QNS1 URA7 TOP3 ERG12 GFA1 TRM9 POT1 ACS2 TFP1 DPP1 YPL276W YNL274C KAE1 MET12 ERG20 VPS1 DAK2 ADE16 ARR2 LYS2 KCC4 FET3 MCM3 UBC9 HEF3 PFK2 SNQ2 GDH1 CUL3 GSP1 NAM7 PRS5 PAN6 RPC25 AFG2 GPM1 MPD1 SAM4 RPA135 YOL098C YPT32 PHR1 PLC1 ASN1 MGM1 ACO1 ADE8 GUS1 ALG12 PMA2 GPD1 GLC3 RIM11 OST1 UBA1 GSY1 RVB2 DDR48 SEC59 ARG4 GDH3 SLM3 FAS1 ARL3 TRM7 GLO1 FOL1 POL12 THS1 CYR1 GLT1 DHR2 MTD1 GAL1 MET8 ROT2 YRF1-6 GSP2 MRM1 YLL058W UBR1 FUS3 SGS1 INP53 RIP1 HIS2 DIA3
Cellular Process			
0019752	carboxylic acid metabolism	7.96e-41	MDH3 CPA1 TYS1 PGK1 ASN2 TDH2 DLD2 PRO2 YHR020W POT1 YPL276W MET12 LYS2 GDH1 PRS5 GPM1 SAM4 ASN1 ACO1 GUS1 ARG4 GDH3 FAS1 FOL1 GLT1 HIS2 CHA4 GID7 SPT23
0006082	organic acid metabolism	7.96e-41	MDH3 CPA1 TYS1 PGK1 ASN2 TDH2 DLD2 PRO2 YHR020W POT1 YPL276W MET12 LYS2 GDH1 PRS5 GPM1 SAM4 ASN1 ACO1 GUS1 ARG4 GDH3 FAS1 FOL1 GLT1 HIS2 CHA4 GID7 SPT23

Tabela 9. Descrição dos termos de ontologia genética usados na Tabela 8.

GOID	GO_term	Ontology	Definition
0008320	protein carrier activity	F	Catalysis of the transfer of proteins from one side of the membrane to the other.
0003824	catalytic activity	F	physiological temperatures. In biologically catalyzed reactions, the reactants are known as substrates, and the catalysts are naturally occurring macromolecular substances known as enzymes. Enzymes possess specific binding sites for substrates, and are usually composed wholly or largely of protein, but RNA that has catalytic activity (ribozyme) is often also regarded as enzymatic.
0019752	carboxylic acid metabolism	P	The chemical reactions involving carboxylic acids, any organic acid containing one or more carboxyl (COOH) groups or anions (COO ⁻).
0006082	organic acid metabolism	P	The chemical reactions involving organic acids, any acidic compound containing carbon in covalent linkage.

Tabela 10. Classificação utilizando ontologia genética para os transcritos de níveis significativamente ($P < 0.05$) aumentados ($R > 1$) no mutante *tif51A-1* na temperatura restritiva.

GOID	GO_term	Probability	Genes
Molecular Function			
0005485	v-SNARE activity	5.01e-17	SNC1 TLG1 BOS1 VTI1 TLG2 SNC2
Cellular Component			
0030133	transport vesicle	3.36e-12	SNC1 SNC2 SLY1 APM2 APM1

Tabela 11. Descrição dos termos de ontologia genética usados na Tabela 10.

GOID	GO_term	Ontology	Definition
0005485	v-SNARE activity	F	(sem definição explicativa)
0030133	transport vesicle	C	Any of the vesicles of the constitutive secretory pathway, which carry cargo from the endoplasmic reticulum to the Golgi, between Golgi cisternae, and to destinations within or outside the cell.

5. DISCUSSÃO

5.1. A supressão do mutante de eIF5A por *PKC1* é independente da via de MAP quinases

Neste trabalho, foi investigado o mecanismo da supressão por *PKC1* em alto número de cópias do mutante temperatura-sensível *tif51A-1* de eIF5A. Embora *PKC1* e alguns de seus possíveis ativadores mostrem interação genética com o mutante *tif51A-1*, nossa análise indica que os membros da cascata de MAP quinases abaixo de *Pkc1* não são capazes de suprimir o mutante *tif51A-1*, sugerindo que uma ramificação de sinalização de *Pkc1* diferente e menos caracterizada esteja envolvida nesta supressão. Já foi proposto que *Pkc1* possui outros efetores, uma vez que o fenótipo do mutante *pkc1Δ* é consideravelmente mais severo do que aqueles associados com a falta dos genes que codificam para os componentes da cascata de MAP quinases (Heinisch e cols., 1999). De fato, existem diversos mecanismos celulares em que *Pkc1* desempenha um papel que são independentes da via de MAP quinases (Ketela e cols. 1999; Andrews e Stark 2000; Li e cols. 2000; Nanduri e Tartakoff 2001; Chai e cols., 2002; Valdivia e Schekman, 2003; Vilella e cols., 2005).

Além disso, de maneira consistente com os dados de supressão, embora os mutantes de eIF5A mostrem o crescimento melhorado em meio de cultura contendo sorbitol 1M (Valentini e cols., 2002), os mesmos não possuem outros fenótipos associados a mutantes da via de MAP quinase, tais como: lise celular na temperatura restritiva ou sensibilidade a cafeína, a estaurosporina (um inibidor específico de proteínas quinases C) e a calcoflúor branco (Heinisch e cols., 1999; dados não mostrados). Assim, considerando o fato de que a supressão por *PKC1* é

independente da via de MAP quinases, procuramos por novos supressores do mutante *tif51A-1* que pudessem revelar os efetores abaixo de Pkc1 que levam à melhora de crescimento deste mutante de eIF5A.

5.2. Uma nova via de sinalização liga Pkc1 a Gic1, um efector de Cdc42

PKC1 já era um supressor conhecido do mutante *tif51A-1*, e foi mostrado aqui que *ZDS1* e *GIC1* também são capazes de melhorar o crescimento deste mutante. Uma vez que as proteínas codificadas por estes três genes participam de uma rede de interações físicas (Drees e cols., 2001), foi testada a hipótese de que Pkc1-Zds1-Gic1 constitui uma nova via de sinalização, ilustrada no modelo da Figura 18. Confirmando este modelo, a supressão por *PKC1* é abolida em células de *tif51A-1* que também possuem as mutações *zds1* Δ e *zds2* Δ . Por outro lado, *GIC1* em alto número de cópias ainda suprime o mutante triplo *tif51A-1 zds1* Δ *zds2* Δ . Considerando que Pkc1 age em resposta a Rho1 (Heinisch e cols., 1999), este é o primeiro estudo que demonstra dados funcionais que ligam vias reguladas por Rho1 e por Cdc42 através de Zds1 e Zds2.

Além do fato de as proteínas Zds interagirem fisicamente com fatores importantes para o crescimento polarizado, organização das septinas e citocinese (Drees e cols., 2001), *ZDS1* e *ZDS2* interagem geneticamente com os genes *CDC42* e *SWE1*, que dão origem a fatores importantes que regulam a progressão e a morfogênese do ciclo celular (Bi e Pringle, 1996; Ma e cols., 1996). Assim, as proteínas Zds devem agir como um ponto da integração para vias de sinalização distintas para manter um equilíbrio entre os diferentes sinais. Este modelo poderia explicar porque Zds1 regula negativamente tanto a via de Pkc1-MAP quinases como a atividade de Cdc42 (Bi e Pringle, 1996; Griffioen e cols., 2003).

De fato, *ZDS1* em alto número de cópias não suprime o fenótipo temperatura-sensível do mutante *stt1* de *PKC1* (dados não mostrados), como faz *GIC1* (discutido em seguida). Entretanto, embora a superexpressão de *ZDS1* cause um defeito da integridade celular em temperaturas elevadas (Griffioen e cols., 2003), *PKC1* em alto número de cópias não é tóxico às células *zds1Δ zds2Δ* em nenhuma temperatura (dados não mostrados). Conseqüentemente, a inabilidade de *PKC1* agir como um supressor na linhagem *tif51A-1 zds1Δ zds2Δ* não é o resultado de toxicidade devido à superativação de Pkc1. Assim, Zds1 deve exercer retroalimentação negativa na via de Pkc1-MAP quinases e também agir como membro de uma via que leva a Gic1.

Além disso, a influência de Zds1 e Zds2 sobre Cdc42 não deve ocorrer somente como uma regulação negativa. Dois dados dão suporte a essa idéia: 1- *ZDS1* em alto número de cópias pode induzir o polarização de actina no mutante *tif51A-1* na temperatura restritiva; e 2- a diminuição de atividade de Cdc42 através da superexpressão de suas GAPs (“GTPase Activating Proteins”) conhecidas, Rga1 e Bem3, não suprime o mutante *tif51A-1*, sugerindo que Zds1 promove a supressão através de um mecanismo que não envolve a inibição de Cdc42.

É importante notar que *CDC42* em alto número de cópias não suprime o mutante *tif51A-1*, mas sua função deve ser necessária para a supressão por *GIC1*, uma vez que a perda da interação Cdc42-Gic1, através de mutações do domínio CRIB, leva à perda também da supressão por *GIC1*. Esta possibilidade da participação de uma função específica de Gic1 na supressão de *tif51A-1* é reforçada pelo fato de que nenhum outro efetor de Cdc42 foi identificado como supressor deste mutante de eIF5A. Também consistente com esta observação, a superexpressão de Bni1, uma formina que age após e de maneira dependente de

Gic1 (Jaquenoud e Peter, 2000), também suprime o fenótipo temperatura-sensível de *tif51A-1*.

Finalmente, foi possível demonstrar que os níveis elevados de Gic1 e de Bni1 podem suprimir o defeito temperatura-sensível de crescimento do mutante *stt1* de *PKC1*, indicando que estes fatores podem funcionar abaixo de Pkc1. Por outro lado, *ZDS1* não suprime o mutante *stt1* (dados não mostrados), mas este fato poderia ser devido ao seu papel proposto em manter o equilíbrio entre diferentes vias de sinalização, como mencionado acima. Dessa maneira, os dados mostrados sustentam fortemente a existência da via proposta que liga Pkc1 a Gic1 através de Zds1 e Zds2 (Figura 18), e conectam sinalização de Pkc1 com crescimento polarizado.

Curiosamente, *SSD1* em plasmídeo de baixo número de cópias também foi caracterizado como supressor de *tif51A-1*. *SSD1* é um gene polimórfico cujos diferentes alelos podem dar origem a uma proteína funcional ou não, dependendo do “background” genético da linhagem considerada (Stettler e cols., 1993). Embora seu papel específico não seja determinado, alelos funcionais de *SSD1* podem suprimir diferentes mutantes relacionados à integridade celular e também o mutante duplo *gic1* Δ *gic2* Δ . Além disso, os fenótipos apresentados por *ssd1* Δ podem ser suprimidos por *ZDS1* (Kaeberlein e Guarente, 2002; Chen e cols., 1997; Tsuchiya e cols., 1996). Conseqüentemente, o isolamento de *SSD1* como um supressor de *tif51A-1* fortalece a interação funcional entre eIF5A e a via Pkc1-Zds1-Gic1.

5.3. A função de eIF5A é importante para a organização do citoesqueleto de actina

A identidade dos supressores do mutante de eIF5A descritos aqui levantou a hipótese de que um defeito no estabelecimento da polaridade celular ocorre no mutante *tif51A-1*. A análise subsequente do citoesqueleto de actina da linhagem *tif51A-1* confirmou que este mutante possui defeitos na organização de actina na temperatura restritiva. Estes dados estão de acordo com um estudo anterior, em que foi proposto que eIF5A é importante para a tradução de um subconjunto de mRNAs envolvidos na transição G1/S, uma vez que a depleção deste fator em levedura causa somente um defeito minoritário da taxa total da tradução e um aumento no número de células grandes com morfologia de fase G1 (Kang e Hershey, 1994).

eIF5A é um fator altamente conservado durante toda a evolução, desde arqueobactérias até mamíferos, e isto deve refletir de alguma maneira uma conservação de função. Conseqüentemente, como o brotamento não é um mecanismo usado por todos eucariotos para progredir no ciclo celular, não seria apropriado propôr uma função direta para eIF5A no estabelecimento da polaridade celular em *S. cerevisiae*. Por outro lado, eIF5A poderia controlar a expressão de alguns fatores importantes para a transição G1/S, tais como alguns dos supressores do mutante de eIF5A. Conseqüentemente, estudos futuros que envolvem os supressores revelados aqui podem contribuir para a elucidação do papel desempenhado por eIF5A na expressão gênica específica.

Apesar dos avanços conseguidos com a utilização de mutantes de eIF5A sensíveis a temperatura, nenhum estudo genético até o momento, utilizando tais mutantes, foram capazes de identificar fatores celulares que interagem fisicamente com eIF5A e que, assim, contribuam de maneira mais direta para o entendimento da

função desta proteína. Um fator importante que pode dificultar a descoberta de interações funcionais mais diretas nos estudos genéticos se dá ao fato de todos os mutantes publicados de eIF5A até o momento darem origem a uma proteína instável na temperatura não permissiva. Assim, torna-se difícil, por exemplo, a procura de supressores, uma vez que a perda total de função, com a perda da proteína na temperatura não-permissiva, é muito mais difícil de se corrigir que a perda de interações específicas. Recentemente em nosso laboratório, foi isolado um mutante de eIF5A sensível a temperatura, porém que mantém os níveis da proteína na temperatura restritiva (Rangel, S.M., dados não publicados). Espera-se, com este mutante, ser possível a realização de novos rastreamentos genéticos e experimentos de funcionalidade que identifiquem defeitos mais específicos ocasionados por uma perda de função de eIF5A.

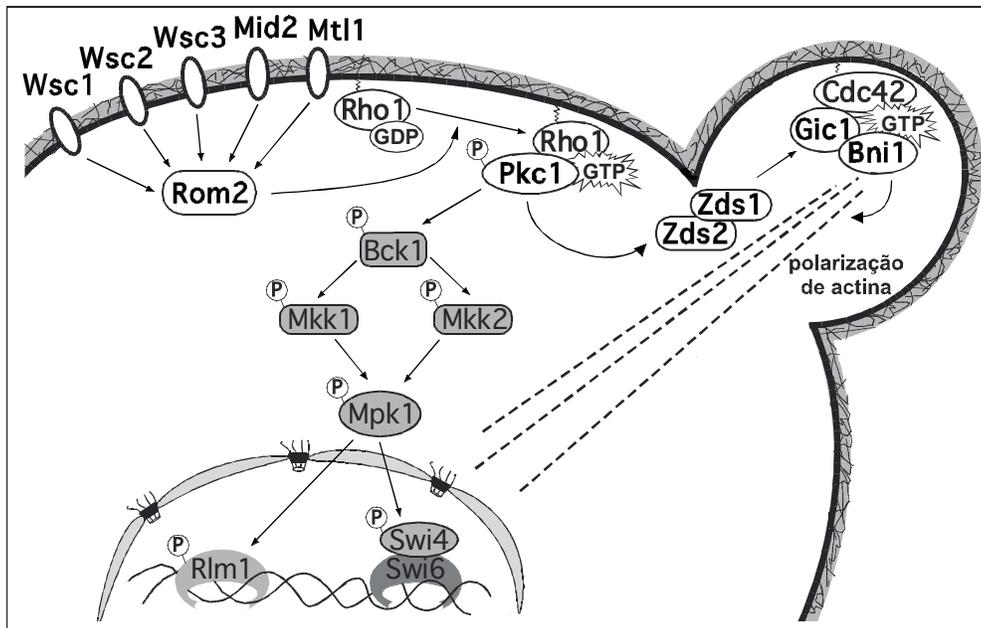


Figura 18. Modelo esquemático das vias que agem abaixo de Pkc1. Além da cascata bem conhecida de MAP quinases, é proposta aqui uma ligação entre Pkc1 e Gic1 através de Zds1 e Zds2. Esta nova via de sinalização conecta Pkc1 diretamente aos fatores de polaridade celular e parece ser responsável pela supressão em alto número de cópias do mutante *tif51A-1* de eIF5A.

5.4. Envolvimento de eIF5A com tradução e expressão gênica diferencial num mutante deste fator

Desde de sua identificação inicial, foi atribuído a eIF5A um papel no início da tradução (Benne e cols., 1978). No entanto, a não confirmação desta proteína como um fator importante de maneira geral para a tradução levou à proposta de que eIF5A poderia estar envolvido com o processo de tradução de um grupo específico de mRNAs (Benne e Hershey, 1978; Kang e Hershey, 1994).

Foi possível verificar neste trabalho que eIF5A associa-se fisicamente a partículas ribossomais 80S (monossomos) envolvidos com o processo de tradução. Além desta associação se mostrar específica, uma vez que ela é dependente da tradução, os mutantes *tif51A-1* e *tif51A-3* de eIF5A mostraram defeitos na distribuição polissomal, quando comparados ao alelo selvagem na temperatura não permissiva. Curiosamente, o defeito mostrado pelos mutantes de eIF5A não se assemelha aos defeitos mostrados por outros mutantes de início de tradução, mas sim a um mutante envolvido com o processo de alongação da tradução (Greenberg e cols., 1998; Peltz e cols., 1992). De maneira bastante interessante, foi descrito em nosso laboratório recentemente a interação física de eIF5A com proteínas da subunidade maior do ribossomo e o fator de alongação da tradução eEF2 (Greggio, A.P.; Lustri, W.R.; Maragno, A.L.; Mestriner, C.A.; Pandolfi, J.R., dados não publicados). Além disso, dados de interação de eIF5A com subunidade 80S e associação com perfil polissomal também foram mostrados recentemente (Jao e Chen, 2006). Entretanto, a adição de eIF5A não levou a nenhum aumento da polimerização *in vitro* de poli-fenilalanina, utilizando-se um sistema de síntese protéica purificado (Benne e Hershey, 1978). Desta maneira, novos estudos deverão

ser conduzidos para se entender o papel da associação de eIF5A com a maquinaria de tradução.

Na intuito de descobrir quais mRNAs se mostravam diferencialmente associados com as frações polissomais no mutante *tif51A-1* na temperatura restritiva com relação ao selvagem, foi realizada a caracterização do perfil traducional desse mutante. Os resultados mostraram que existe uma série de genes diferencialmente associados à maquinaria de tradução no mutante *tif51A-1* na temperatura restritiva tanto de maneira reduzida, como aumentada. Estes resultados mostram a redução de transcritos envolvidos com o processo de transporte nucleocitoplasmático e metabolismo de ácido carboxílicos. Um fato bastante interessante é que genes envolvidos com o metabolismo de ácidos carboxílicos aparecem aumentados na análise do conteúdo total de mRNAs do mutante *tif51A-1* na temperatura restritiva (Anexo IV), reforçando o dado de que estes genes são diferencialmente traduzidos nestas condições. O aparecimento de genes envolvidos com transporte nucleocitoplasmático (*NMD5*, *KAP95*, *SXM1*, *SRP1* e *PSE1*) pode vir a compor um novo mecanismo de controle deste transporte. Além desses genes selecionados com esta função de trânsito nuclear, outros três genes, que não entraram nessa categoria de “protein carrier activity”, mas que também estão envolvidos com transporte nucleocitoplasmático, *KAP104*, *NUP120* e *GSP1*, também apresentaram menor associação com as frações polissomais do mutante *tif51A-1* na temperatura restritiva.

Com relação aos transcritos cuja associação com os polissomos foi aumentada no mutante *tif51A-1* com relação ao selvagem na temperatura restritiva, foram identificados genes envolvidos com o transporte de vesículas (Tabela 10). Além disso, um dos componentes celulares cujos genes se mostraram reduzidos na

análise do conteúdo total de mRNAs foi o retículo endoplasmático (Anexo III). Esses dados são interessantes, pois o mutante *tif51A-1* é suprimido em alto número de cópias pelos genes *MSB3* e *MSB4*, envolvidos na etapa final de fusão de vesículas com a membrana celular, e um mutante do gene *YPT1*, envolvido com transporte do retículo endoplasmático para Golgi, foi isolado como letal sintético do alelo *tif51A-1* (Frigieri, M.C. e Zanelli, C.F., dados não publicados).

Por fim, é também importante ressaltar que uma série de genes envolvidos com brotamento e polarização do citoesqueleto de actina foram identificados como aumentados no mutante *tif51A-1* (Anexo IV). Curiosamente, genes envolvidos com estes mesmos processos são capazes de suprimir o defeito de sensibilidade a temperatura deste mutante quando presentes em alto número de cópias (Tabela 4 e Figura 18), e mutantes de eIF5A apresentam defeitos da polarização do citoesqueleto de actina (Figura 13). O fato de estes transcritos estarem aumentados no mutante *tif51A-1* pode indicar a resposta celular a um defeito de ciclo celular ou pode indicar uma estabilização dos mesmos devido à inibição do processo de alongação da tradução, o que estaria de acordo com os dados observados para um papel de eIF5A na tradução.

Apesar dos resultados interessantes e das diferentes possibilidades a serem analisadas obtidos a partir do perfil traducional, a hipótese de regulação da tradução de mRNAs diretamente relacionados à transição G1/S do ciclo celular não se confirmou com esta análise. Entretanto, mesmo que não significativamente selecionados pela análise de ontologia genética, uma série de genes relacionados a ciclo celular (*REC102*, *ADY2*, *KAP104*, *UBC9*, *TUB2*, *ACT1*, *TAF11*, *ZPR1*, *TOP3*, *CYR1*, *DMA1*, *KCC4*, *FUS3*, *SGS1*), brotamento (*SLA2*, *ACT1*, *CDC11*, *BUD2*, *KCC4* e *SEC3*) e estabelecimento de polaridade celular (*YOR300W*, *PWP2*, *MSB2*,

SLA2, *ACT1*, *CDC11*, *BUD2*, *KCC4* e *SEC3*) apareceram significativamente reduzidos no perfil traducional e a relevância do seu aparecimento deverá ser estudada futuramente.

6. CONCLUSÕES

- 6.1. A supressão em alto número de cópias do mutante *tif51A-1* de eIF5A por *PKC1* é independente da via de MAP quinases.
- 6.2. *ZDS1* e *GIC1* são supressores do mutante *tif51A-1*, juntamente com outros genes envolvidos com transição G1/S do ciclo celular em *S. cerevisiae*.
- 6.3. Mutantes de eIF5A possuem defeito na polarização de actina, o que sugere uma função de eIF5A na transição G1/S do ciclo celular em *S. cerevisiae*.
- 6.4. A supressão do mutante de eIF5A por *PKC1* é dependente de uma nova via de sinalização abaixo de Pkc1, que envolve Zds1/Zds2 e Gic1.
- 6.5. eIF5A associa-se a partículas ribossomais de maneira dependente à tradução.
- 6.6. Mutantes de eIF5A apresentam alterações de perfil polissomal, sugerindo defeitos no processo de elongação da tradução.
- 6.7. O mutante *tif51A-1*, na temperatura restritiva, com relação ao selvagem, apresenta na fração polissomal uma diminuição de transcritos envolvidos com transporte nucleocitoplasmático e ácidos carboxílicos e um aumento de transcritos envolvidos com transporte vesicular.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMBERG, D. C. Three-dimensional imaging of the yeast actin cytoskeleton through the budding cell cycle. **Mol. Biol. Cell**, v. 9, p. 3259-62, 1998.

ANDREWS, P. D.; STARK, M. J. Type 1 protein phosphatase is required for maintenance of cell wall integrity, morphogenesis and cell cycle progression in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Cell Sci.**, v. 113, p. 507-20, 2000.

AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A., STRUHL, K. (Ed.) **Current Protocols in Molecular Biology**. New York: Wiley, 2004.

BARTIG, D.; SCHUMANN, H.; KLINK, F. The unique posttranslational modification leading to deoxyhypusine or hypusine is a general feature of the archaebacterial kingdom. **System. Appl. Microbiol.**, v. 13, p. 112–116, 1990.

BEILHARZ, TH.; PREISS, T. Translational profiling: the genome-wide measure of the nascent proteome. **Brief. Funct. Genomic Proteomic.**, v. 3, n. 2, p. 103-11, 2004.

BENNE, R.; BROWN-LUEDDI, M.L.; HERSHEY, J.W. Purification and characterization of protein synthesis initiation factors eIF-1, eIF-4C, eIF-4D, and eIF-5 from rabbit reticulocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 253, n. 9, p. 3070-7, 1978.

BENNE, R.; HERSHEY, J. W. The mechanism of action of protein synthesis initiation factors from rabbit reticulocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 253, p. 3078-87, 1978.

de BETTIGNIES, G.; THORAVAL, D.; MOREL, C.; PEYPOUQUET, M.F.; CROUZET, M. Overactivation of the protein kinase C-signaling pathway suppresses the defects of cells lacking the Rho3/Rho4-GAP Rgd1p in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 159, p. 1435-48, 2001.

BEVEC, D.; KLIER, H.; HOLTER, W.; TSCHACHLER, E.; VALENT, P.; LOTTSPREICH, F.; BAUMRUKER, T.; HAUBER, J. Induced gene expression of the hypusine-containing protein eukaryotic initiation factor 5A in activated human T lymphocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 91, p. 10829-33, 1994.

BEVEC, D.; JAKSCHE, H.; OFT, M.; WOHL, T.; HIMMELSPACH, M.; PACHER, A.; SCHEBESTA, M.; KOETTINITZ, K.; DOBROVNIK, M.; CSONGA, R.; LOTTSPREICH, F.; HAUBER, J. Inhibition of HIV-1 replication in lymphocytes by mutants of the Rev cofactor eIF-5A. **Science**, v. 271, p. 1858-60, 1996.

BEVEC, D.; HAUBER, J. Eukaryotic initiation factor 5A activity and HIV-1 Rev function. **Biol. Signals**, v. 6, p. 124-33, 1997.

BI, E.; PRINGLE, J.R. ZDS1 and ZDS2, genes whose products may regulate Cdc42 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.**, v. 16, p. 5264-75, 1996.

BOURBONNAIS, Y.; FAUCHER, N.; PALLOTTA, D.; LAROUCHE, C. Multiple cellular processes affected by the absence of the Rpb4 subunit of RNA polymerase II contribute to the deficiency in the stress response of the yeast rpb4delta mutant. **Mol. Gen. Genet.**, v. 264, p. 763-72, 2001.

BROWN, J. L.; JAQUENOUD, M.; GULLI, M.P.; CHANT, J.; PETER, M. Novel Cdc42-binding proteins Gic1 and Gic2 control cell polarity in yeast. **Genes Dev.**, v. 11, p. 2972-82, 1997.

CHAI, B.; HSU, J. M.; DU, J.; LAURENT, B.C. Yeast RSC function is required for organization of the cellular cytoskeleton via an alternative PKC1 pathway. **Genetics**, v. 161, p. 575-84, 2002.

CHEN, Z. P.; YAN, Y.P.; DING, Q.J.; KNAPP, S.; POTENZA, J.A.; SCHUGAR, H.J.; CHEN, K.Y. Effects of inhibitors of deoxyhypusine synthase on the differentiation of mouse neuroblastoma and erythroleukemia cells. **Cancer Lett.**, v. 105, p. 233-9, 1996.

CHEN, G.C.; KIM, Y.J.; CHAN, C.S. The Cdc42 GTPase-associated proteins Gic1 and Gic2 are required for polarized cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genes Dev.**, v. 11, p. 2958-71, 1997.

CHEN, K. Y.; LIU, A.Y. Biochemistry and function of hypusine formation on eukaryotic initiation factor 5A. **Biol. Signals**, v. 6, p. 105-9, 1997.

CHRISTIANSON, T. W.; SIKORSKI, R.S.; DANTE, M.; SHERO, J.H.; HIETER, P. Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. **Gene**, v. 110, p. 119-22, 1992.

COLLER, J.M.; GRAY, N.K.; WICKENS, M.P. mRNA stabilization by poly(A) binding protein is independent of poly(A) and requires translation. **Genes Dev.**, v. 12, p. 3226-35, 1998.

DELLEY, P.A.; HALL, M.N. Cell wall stress depolarizes cell growth via hyperactivation of RHO1. **J. Cell. Biol.**, v. 147, p. 163-74, 1999.

DREES, B.L.; SUNDIN, B.; BRAZEAU, E.; CAVISTON, J.P.; CHEN, G.C. A protein interaction map for cell polarity development. **J. Cell Biol.**, v. 154, p. 549-71, 2001.

DUNCAN, R.F.; HERSHEY, J.W. Changes in eIF-4D hypusine modification or abundance are not correlated with translational repression in HeLa cells. **J. Biol. Chem.**, v. 261, n. 27, p. 12903-6, 1986.

EZAKI, B.; GARDNER, R.C.; EZAKI, Y.; KONDO, H.; MATSUMOTO, H. Protective roles of two aluminum (Al)-induced genes, HSP150 and SED1 of *Saccharomyces cerevisiae*, in Al and oxidative stresses. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 159, n. 1, p. 99-105, 1998.

ELFGANG, C.; ROSORIUS, O.; HOFER, L.; JAKSCHE, H.; HAUBER, J.; BEVEC, D. Evidence for specific nucleocytoplasmic transport pathways used by leucine-rich nuclear export signals. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 6229-34, 1999.

GLADFELTER, A.S.; BOSE, I.; ZYLA, T.R.; BARDES, E.S.; LEW, D.J. Septin ring assembly involves cycles of GTP loading and hydrolysis by Cdc42p. **J. Cell Biol.**, v. 156, p. 315-26, 2002.

GOUGH, J.; KARPLUS, K.; HUGHEY, R.; CHOTHIA, C. Assignment of homology to genome sequences using a library of hidden Markov models that represent all proteins of known structure. **J. Mol. Biol.**, v. 313, n. 4, p. 903-919, 2001.

GREENBERG, J.R.; PHAN, L.; GU, Z.; DESILVA, A.; APOLITO, C.; SHERMAN, F.; HINNEBUSCH, A.G.; GOLDFARB, D.S. Nip1p associates with 40 S ribosomes and the Prt1p subunit of eukaryotic initiation factor 3 and is required for efficient translation initiation. **J. Biol. Chem.**, v. 273 n. 36, p. 23485-94, 1998.

GRIFFIOEN, G.; SWINNEN, S.; THEVELEIN, J.M. Feedback inhibition on cell wall integrity signaling by Zds1 involves Gsk3 phosphorylation of a cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 23460-71, 2003.

GUSTIN, M.C.; ALBERTYN, J.; ALEXANDER, M.; DAVENPORT, K. MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 62, p. 1264-300, 1998.

GUTHRIE, C.; FINK, G.R. (Ed.) **Guide to Yeast Genetics**. New York: Academic Press, 1991. 194 p.

HANAUSKE-ABEL, H.M.; PARK, M.H.; HANAUSKE, A.R.; POPOWICZ, A.M.; LALANDE, M.; FOLK, J.E. Inhibition of the G1-S transition of the cell cycle by inhibitors of deoxyhypusine hydroxylation. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1221, n. 2, p. 115-24, 1994.

HANAWA-SUETSUGU, K.; SEKINE, S.; SAKAI, H.; HORI-TAKEMOTO, C.; TERADA, T.; UNZAI, S.; TAME, J.R.; KURAMITSU, S.; SHIROUZU, M.; YOKOYAMA, S. Crystal structure of elongation factor P from *Thermus thermophilus* HB8. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 101, n. 26, p. 9595-600, 2004.

HE, F.; LI, X.; SPATRICK, P.; CASILLO, R.; DONG, S.; JACOBSON, A. Genome-wide analysis of mRNAs regulated by the nonsense-mediated and 5' to 3' mRNA decay pathways in yeast. **Mol Cell.**, v. 12, n. 6, p. 1439-52, 2003.

HEINISCH, J.J.; LORBERG, A.; SCHMITZ, H.P.; JACOBY, J.J. The protein kinase C-mediated MAP kinase pathway involved in the maintenance of cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Microbiol.**, v. 32, p. 671-80, 1999.

HELLIWELL, S.B.; SCHMIDT, A.; OHYA, Y.; HALL, M.N.; The Rho1 effector Pkc1, but not Bni1, mediates signalling from Tor2 to the actin cytoskeleton. **Curr. Biol.**, v. 8, p. 1211-4, 1998.

HENDERSON, B.R.; PERCIPALLE, P. Interactions between HIV Rev and nuclear import and export factors: the Rev nuclear localisation signal mediates specific binding to human importin-beta. **J. Mol. Biol.**, v. 274, p. 693-707, 1997.

HÖFKEN, T.; SCHIEBEL, E. Novel regulation of mitotic exit by the Cdc42 effectors Gic1 and Gic2. **J. Cell Biol.**, v. 164, p. 219-31, 2004.

HOHMANN, S. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 66, p. 300-72, 2002.

JAO, D.L.; CHEN, K.Y. Subcellular localization of the hypusine-containing eukaryotic initiation factor 5A by immunofluorescent staining and green fluorescent protein tagging. **J. Cell Biochem.**, v. 86, p. 590-600, 2002.

JAO, D.L.; CHEN, K.Y. Tandem affinity purification revealed the hypusine-dependent binding of eukaryotic initiation factor 5A to the translating 80S ribosomal complex. **J.**

Cell Biochem., v. 97, n. 3, p. 583-98, 2006.

JAQUENOUD, M.; PETER, M. Gic2p may link activated Cdc42p to components involved in actin polarization, including Bni1p and Bud6p (Aip3p). **Mol. Cell. Biol.**, v. 20, p. 6244-58, 2000.

KAEBERLEIN, M.; GUARENTE, L. *Saccharomyces cerevisiae* MPT5 and SSD1 function in parallel pathways to promote cell wall integrity. **Genetics**, v. 60, p. 83-95, 2002.

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

KANG, H.A.; HERSHEY, J.W. Effect of initiation factor eIF-5A depletion on protein synthesis and proliferation of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 3934-40, 1994.

KAPTEYN, J.C.; VAN EGMOND, P.; SIEVI, E.; VAN DEN ENDE, H.; MAKAROW, M.; KLIS, F.M. The contribution of the O-glycosylated protein Pir2p/Hsp150 to the construction of the yeast cell wall in wild-type cells and beta 1,6-glucan-deficient mutants. **Mol. Microbiol.**, v. 31, n. 6, p. 1835-44, 1999.

KAWASAKI, R.; FUJIMURA-KAMADA, K.; TOI, H.; KATO, H.; TANAKA, K. The upstream regulator, Rsr1p, and downstream effectors, Gic1p and Gic2p, of the Cdc42p small GTPase coordinately regulate initiation of budding in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genes Cells**, v. 8, p. 235-50, 2003.

KETELA, T.; GREEN, R.; BUSSEY, H. *Saccharomyces cerevisiae* Mid2p is a potential cell wall stress sensor and upstream activator of the PKC1-MPK1 cell integrity pathway. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 3330-40, 1999.

KIM, K.K.; HUNG, L.W.; YOKOTA, H.; KIM, R.; KIM, S.H. Crystal structures of

eukaryotic translation initiation factor 5A from *Methanococcus jannaschii* at 1.8 Å resolution. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, n. 18, p. 10419-24, 1998.

KLIER, H.; WOHL, T.; ECKERSKORN, C.; MAGDOLEN, V.; LOTTSPREICH, F. Determination and mutational analysis of the phosphorylation site in the hypusine-containing protein Hyp2p. **FEBS Lett.**, v. 334, n. 3, p. 360-4, 1993.

KLINKENBERG, L.G.; MENNELLA, T.A.; LUETKENHAUS, K.; ZITOMER, R.S. Combinatorial repression of the hypoxic genes of *Saccharomyces cerevisiae* by DNA binding proteins Rox1 and Mot3. **Eukaryot. Cell**, v. 4, n. 4, p. 649-60, 2005.

LEE, K.S.; LEVIN, D.E. Dominant mutations in a gene encoding a putative protein kinase (BCK1) bypass the requirement for a *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C homolog. **Mol. Cell. Biol.**, v. 12, p. 172-82, p. 1992.

LEE, L.A.; ELFRING, L.K.; BOSCO, G.; ORR-WEAVER, T.L. A genetic screen for suppressors and enhancers of the *Drosophila* PAN GU cell cycle kinase identifies cyclin B as a target. **Genetics**, v. 158, p. 1545-56, 2001.

LENBURG, M.E.; O'SHEA, E.K. Genetic evidence for a morphogenetic function of the *Saccharomyces cerevisiae* Pho85 cyclin-dependent kinase. **Genetics**, v. 157, p. 39-51, 2001.

LI, Y.; MOIR, R.D.; SETHY-CORACI, I. K.; WARNER, J. R.; WILLIS, I. M. Repression of ribosome and tRNA synthesis in secretion-defective cells is signaled by a novel branch of the cell integrity pathway. **Mol. Cell Biol.**, v. 20, p. 3843-51, 2000.

LOWRY, C.V.; ZITOMER, R.S. Oxygen regulation of anaerobic and aerobic genes mediated by a common factor in yeast. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 81, n. 19, p. 6129-33, 1984.

MA, X.J.; LU, Q.; GRUNSTEIN, M. A search for proteins that interact genetically with histone H3 and H4 amino termini uncovers novel regulators of the Swe1 kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genes Dev.**, v. 10, p. 1327-40, 1996.

MAGDOLEN, V.; KLIER, H.; WOHL, T.; KLINK, F.; HIRT, H.; HAUBER, J.; LOTTSPREICH, F. The function of the hypusine-containing proteins of yeast and other eukaryotes is well conserved. **Mol. Gen. Genet.**, v. 244, n. 6, p. 646-52, 1994.

MRSA, V.; TANNER, W. Role of NaOH-extractable cell wall proteins Ccw5p, Ccw6p, Ccw7p and Ccw8p (members of the Pir protein family) in stability of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. **Yeast**, v. 15, n. 10A, p. 813-20, 1999.

NANDURI, J.; TARTAKOFF, A.M. Perturbation of the nucleus: a novel Hog1p-independent, Pkc1p-dependent consequence of hypertonic shock in yeast. **Mol. Biol. Cell.**, v. 12, p. 1835-41, 2001.

NAZAR, R.N.; YAGUCHI, M.; WILLICK, G.E.; ROLLIN, C.F.; ROY, C. The 5-S RNA binding protein from yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) ribosomes. Evolution of the eukaryotic 5-S RNA binding protein. **Eur. J. Biochem.**, v. 102, n. 2, p. 573-82, 1979.

NELSON, D.L.; COX, M.M. (Ed.) Protein metabolism. In: **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4th ed. New York: W.H. Freeman & Company, 2004, cap. 28, p. 1066.

PARK, M.H.; WOLFF, E.C.; LEE, Y.B.; FOLK, J.E. Antiproliferative effects of inhibitors of deoxyhypusine synthase. Inhibition of growth of Chinese hamster ovary cells by guanyl diamines. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 45, p. 27827-32, 1994.

PARK, M.H.; LEE, Y. B.; JOE, Y.A. Hypusine is essential for eukaryotic cell proliferation. **Biol. Signals.**, v. 6, p. 15-23, 1997.

PARK, M.H. The post-translational synthesis of a polyamine-derived amino acid, hypusine, in the eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A). **J. Biochem.**, v. 139, n. 2, p. 161-9, 2006.

PARK, J.H.; ARAVIND, L.; WOLFF, E.C.; KAEVEL, J.; KIM, Y.S.; PARK, M.H. Molecular cloning, expression, and structural prediction of deoxyhypusine hydroxylase: A HEAT-repeat-containing metalloenzyme. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 103, n. 1, p. 51-6, 2006.

PEAT, T.S.; NEWMAN, J.; WALDO, G.S.; BERENDZEN, J.; TERWILLIGER, T.C. Structure of translation initiation factor 5A from *Pyrobaculum aerophilum* at 1.75 Å resolution. **Structure**, v. 6, n. 9, p. 1207-14, 1998.

PELTZ, S.W.; DONAHUE J.L.; JACOBSON A. A mutation in the tRNA nucleotidyltransferase gene promotes stabilization of mRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.**, v. 12, n. 12, p. 5778-84, 1992.

PESTOVA, T.V.; KOLUPAEVA, V.G.; LOMAKIN, I.B.; PILIPENKO, E.V.; SHATSKY, I.N.; AGOL, V.I.; HELLEN, C.U. Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 98, n. 13, p. 7029-36, 2001.

PREISS, T.W.; HENTZE, M. Starting the protein synthesis machine: eukaryotic translation initiation. **Bioessays**, v. 25, n. 12, p. 1201-11, 2003.

PRUYNE, D.; BRETSCHER, A. Polarization of cell growth in yeast. **J. Cell Sci.**, v. 113, p. 571-85, 2000.

PRUYNE, D.; LEGESSE-MILLER, A.; GAO, L.; DONG, Y.; BRETSCHER, A. Mechanisms of polarized growth and organelle segregation in yeast. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 20, p. 559-91, 2004.

PTUSHKINA, M.; VON DER HAAR, T.; VASILESCU, S.; FRANK, R.; BIRKENHAGER, R.; MCCARTHY, J.E. Cooperative modulation by eIF4G of eIF4E-binding to the mRNA 5' cap in yeast involves a site partially shared by p20. **EMBO J.**, v. 17, n. 16, p. 4798-808, 1998.

RICHMAN, T.J.; SAWYER, M.M.; JOHNSON, D.I. The Cdc42p GTPase is involved in a G2/M morphogenetic checkpoint regulating the apical-isotropic switch and nuclear division in yeast. **J. Biol. Chem.**, v. 274, 16861-70, 1999.

ROSORIUS, O.; REICHART, B.; KRATZER, F.; HEGER, P.; DABAUVALLE, M.C.; HAUBER, J. Nuclear pore localization and nucleocytoplasmic transport of eIF-5A: evidence for direct interaction with the export receptor CRM1. **J. Cell Sci.**, v. 112, p. 2369-80, 1999.

RUHL, M.; HIMMELSPACH, M.; BAHR, G.M.; HAMMERSCHMID, F.; JAKSCHE, H.; WOLFF, B.; ASCHAUER, H.; FARRINGTON, G.K.; PROBST, H.; BEVEC, D., et al. Eukaryotic initiation factor 5A is a cellular target of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain mediating trans-activation. **J. Cell Biol.**, v. 123, p. 1309-20, 1993.

SASAKI, K.; ABID, M.R.; MIYAZAKI, M. Deoxyhypusine synthase gene is essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Lett.**, v. 384, p. 151-4, 1996.

SCHNIER, J.; SCHWELBERGER, H.G.; SMIT-MCBRIDE, Z.; KANG, H.A.; HERSHEY, J.W. Translation initiation factor 5A and its hypusine modification are essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell Biol.**, v. 11, p. 3105-14, 1991.

SCHWER, B.; SHUMAN, S.; Multicopy suppressors of temperature-sensitive mutations of yeast mRNA capping enzyme. **Gene Expr.**, v. 5, p. 331-44, 1996.

SEKIYA-KAWASAKI, M.; ABE, M.; SAKA, A.; WATANABE, D.; KONO, K.; MINEMURA-ASAKAWA, M.; ISHIHARA, S.; WATANABE, T.; OHYA, Y. Dissection of upstream regulatory components of the Rho1p effector, 1,3-beta-glucan synthase, in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 162, p. 663-76, 2002.

SHI, X.P.; YIN, K.C.; AHERN, J.; DAVIS, L.J.; STERN, A.M.; WAXMAN, L. Effects of

N1-guanyl-1,7-diaminoheptane, an inhibitor of deoxyhypusine synthase, on the growth of tumorigenic cell lines in culture. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1310, n. 1, p. 119-26, 1996.

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

STETTLER, S.; CHIANNILKULCHAI, N.; HERMANN-LE DENMAT, S.; LALO, D.; LACROUTE, F.; SENTENAC, A.; THURIAUX, P. A general suppressor of RNA polymerase I, II and III mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 239, p. 169-76, 1993.

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

TOH-E, A.; YASUNAGA, S.; NISOGI, H.; TANAKA, K.; OGUCHI, T.; MATSUI, Y. Three yeast genes, PIR1, PIR2 and PIR3, containing internal tandem repeats, are related to each other, and PIR1 and PIR2 are required for tolerance to heat shock. **Yeast**, v. 9, n. 5, p. 481-94, 1993.

TSUCHIYA, E.; MATSUZAKI, G.; KURANO, K.; FUKUCHI, T.; TSUKAO, A.; MIYAKAWA, T. The *Saccharomyces cerevisiae* SSD1 gene is involved in the tolerance to high concentration of Ca²⁺ with the participation of HST1/NRC1/BFR1. **Gene**, v. 176, p. 35-8, 1996.

UESONO, Y.; FUJITA, A.; TOH-E, A.; KIKUCHI, Y. The MCS1/SSD1/SRK1/SSL1 gene is involved in stable maintenance of the chromosome in yeast. **Gene**, v. 143, p. 135-8, 1994.

VALDIVIA, R.H.; SCHEKMAN, R. The yeasts Rho1p and Pkc1p regulate the transport of chitin synthase III (Chs3p) from internal stores to the plasma membrane. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 100, p. 10287-92, 2003.

VALENTINI, S.R.; CASOLARI, J.M.; OLIVEIRA, C.C.; SILVER, P.A.; MCBRIDE, A. Genetic interactions of yeast eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) reveal connections to poly(A)-binding protein and protein kinase C signaling. **Genetics**, v. 160, p. 393-405, 2002.

VILELLA, F.; HERRERO, E.; TORRES, J.; DE LA TORRE-RUIZ, M.A. Pkc1 and the upstream elements of the cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, Rom2 and Mtl1, are required for cellular responses to oxidative stress. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 10, p. 9149-59, 2005.

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

WOHL, T.; KLIER, H.; AMMER, H.; LOTTSPREICH, F.; MAGDOLEN, V. The HYP2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is essential for aerobic growth: characterization of different isoforms of the hypusine-containing protein Hyp2p and analysis of gene disruption mutants. **Mol. Gen. Genet.**, v. 241, n. 3-4, p. 305-11, 1993.

XU, A.; CHEN, K.Y. Hypusine is required for a sequence-specific interaction of eukaryotic initiation factor 5A with postsystematic evolution of ligands by exponential enrichment RNA. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 4, p. 2555-61, 2001.

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

YAO, M.; OHSAWA, A.; KIKUKAWA, S.; TANAKA, I.; KIMURA, M. Crystal structure of hyperthermophilic archaeal initiation factor 5A: a homologue of eukaryotic initiation

factor 5A (eIF-5A). **J. Biochem.**, v. 133, n. 1, p. 75-81, 2003.

YOSHIDA, S.; OHYA, Y.; NAKANO, A.; ANRAKU, Y. Genetic interactions among genes involved in the STT4-PKC1 pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 242, p. 631-40, 1994.

YU, Y.; JIANG, Y.W.; WELLINGER, R.J.; CARLSON, K.; ROBERTS, J.M.; STILLMAN, D.J.; Mutations in the homologous ZDS1 and ZDS2 genes affect cell cycle progression. **Mol. Cell Biol.**, v. 16, p. 5254-63, 1996.

ZUK, D.; JACOBSON, A.; A single amino acid substitution in yeast eIF-5A results in mRNA stabilization. **EMBO J.**, v. 17, p. 2914-25, 1998.

ANEXO I

ANEXO II

ANEXO III

ANEXO III(A)

Classificação utilizando ontologia genética para os transcritos de níveis significativamente ($P < 0.05$) diminuídos ($R < 1$) no mutante *tif51A-1* na temperatura restritiva no ensaio de perfil transcricional.

GO ID	GO_term	Probability	Genes
0005554	molecular function unknown	1.64e-74	NSG2 ZSP1 YLR050C YBR096W YET3 YGL231C YLL023C YLR064W YOR044W PGA3 YET1 PKR1 YIL039W YEL001C YOR285W YCL045C YHL044W COS4 YGR026W YLR030W PHM7 YGR110W YML083C YNR004W COS1 YBR063C YLR225C YHL017W YOR389W YNL305C YPL278C YCL049C YLL053C YOR006C YIR043C COS9 COS5 YHR078W PNS1 TVP38 ATG29 YIL014C-A/YIL015C-A YLR241W YPL277C YGR168C YIR007W YOL047C YNL196C YLL056C TMA19 YNR014W SGT2 ICS3 YDL010W YLR031W YCL056C YBL029W YOR289W YIL089W YOR019W YLR137W YNL155W YLR164W YHR140W EEB1 SPG4 YMR074C YPL245W SET6 YMR085W YOL153C YPR158W YML100W-A YIR044C YNL300W YPR045C ABZ2 TMA10 COS6 YJL132W YNL193W YDR210W YGR045C YLR445W YGR149W YEL048C YEL073C SPG3 RBD2 YNR061C YSC83 PGA1 YDL144C YOR365C YMR002W TMA46 YOR238W YDL199C YIR035C YDR266C FMP33 YOL073C YBR187W YLR173W DSF1 YLR297W YCL002C PET130 YOR164C YIL067C PTM1 YKR051W YNL254C CUE3 YAR068W YJL043W YBR025C YDR319C YDL129W YLR168C PHM8 YOL007C YGR226C YPL041C YMR181C LDB18 YKL133C YDL237W YER079W LEE1 UBX3 HMRA2 YPR071W BSC1 YGR127W TRE2 YJL171C YOL131W YBR014C YLR040C YMR155W IGO1 RCR2 YGR283C YMR279C SNA4 YKL207W YLL025W PAU1 YDL089W YPL162C YLR001C YOR062C YLR290C YJR119C SHE10 YMR134W NPL4 MSC7 NCE102 GET1 PHO86 VMA21 COS10 PRM9 SUE1 SYM1 YBP1 PET18 MMF1 COS8 SCM4 BTN2 HSP12 ECM2 REC114 VPS29 KRR1 SEC26 SHU2 RUD3 ERV29 ECM11 ECM8 SFT2 ATG2 DFG10 PCH2 SPO77 ESC8 HBT1 YPR078C PRM1 HIM1 NMD4 VID24 FYV10 COG1 NCA3 ECM7 NST1 SSP120 YHR087W PRM7 HSP30 HUR1 ATS1 ERD1 JIP5 VPS70 MTL1 VPS75 YJL144W YIH1 PET10 SWC5 BUD31 ECM37 YAF9 MON1 ZIP2 KRE11 SIA1 BRE4 ISF1 AXL2 ERP2 PRM4 YBR016W

Biological Process			
0006814	sodium ion transport	6.96e-11	ENA2 ENA5 ENA1
0016125	sterol metabolism	6.37e-11	ERG7 ERG2 ERG5 HMG1 CYB5 ERG11 ARE2 ERG28 ERG3
0008202	steroid metabolism	3.06e-27	ERG7 ERG2 ERG5 HMG1 CYB5 ERG11 ARE2 ERG28 ERG3 YEH1 ERG8 NCP1
0016126	sterol biosynthesis	9.92e-25	ERG7 ERG2 ERG5 HMG1 CYB5 ERG11 ERG28 ERG3 ERG8 NCP1
0006696	ergosterol biosynthesis	6.53e-22	ERG7 ERG2 ERG5 HMG1 ERG11 ERG28 ERG3 ERG8 NCP1
0008204	ergosterol metabolism	6.53e-22	ERG7 ERG2 ERG5 HMG1 ERG11 ERG28 ERG3 ERG8 NCP1
Cellular Component			
0005783	endoplasmic reticulum	1.49e-75	ERG7 ERG2 ERG5 HMG1 CYB5 ERG11 ARE2 ERG28 ERG3 NSG2 YMR134W GTT1 NUS1 ZSP1 YLR050C PMT4 NPL4 MSC7 YBR096W SHR3 YPC1 NCE102 CWH41 YET3 YGL231C SEC11 CDC48 YBR159W HMX1 ADP1 CNE1 YLL023C STE24 KAR2 AQY2 GET1 YLR064W YOR044W LIP1 PGA3 STT3 PHO86 SSM4 ALG6 YET1 ALG8 HLJ1 VMA21 RFT1 SCJ1 PKR1 GET3 ASI3 STE14 YIL039W YEL001C YOR285W COS10 BST1 PRM9 YCL045C
0000323	lytic vacuole	3.60e-55	COS4 PHM7 COS1 YNL305C COS5 YDL010W COS6 YNR061C YBR187W YLR297W YIL067C YOL007C YBR014C RCR2 SNA4 YPL162C YLR001C MON1 CPR8 APE3 SSA2 SSA1 SGA1 COS3 DAP2 PSD2 SMF1 PEP3 YHC3 SLM4 MCH4 PEP4
0000322	storage vacuole	3.60e-55	COS4 PHM7 COS1 YNL305C COS5 YDL010W COS6 YNR061C YBR187W YLR297W YIL067C YOL007C YBR014C RCR2 SNA4 YPL162C YLR001C MON1 CPR8 APE3 SSA2 SSA1 SGA1 COS3 DAP2 PSD2 SMF1 PEP3 YHC3 SLM4 MCH4 PEP4
0000324	vacuole (sensu Fungi)	3.60e-55	COS4 PHM7 COS1 YNL305C COS5 YDL010W COS6 YNR061C YBR187W YLR297W YIL067C YOL007C YBR014C RCR2 SNA4 YPL162C YLR001C MON1 CPR8 APE3 SSA2 SSA1 SGA1 COS3 DAP2 PSD2 SMF1 PEP3 YHC3 SLM4 MCH4 PEP4

ANEXO III(B)

Descrição dos termos de ontologia genética usados na tabela do Anexo III(A).

GOID	GO_term	Ontology	Definition
0005554	molecular function unknown	F	Used for the annotation of gene products whose function is not known or cannot be inferred.
0006814	sodium ion transport	P	The directed movement of sodium ions (Na+) into, out of, within or between cells.
0016125	sterol metabolism	P	The chemical reactions involving sterols, steroids with one or more hydroxyl groups and a hydrocarbon side-chain in the molecule.
0008202	steroid metabolism	P	The chemical reactions involving steroids, compounds with a 1,2,cyclopentanoperhydrophenanthrene nucleus.
0016126	sterol biosynthesis	P	The formation from simpler components of sterols, steroids with one or more hydroxyl groups and a hydrocarbon side-chain in the molecule.
0006696	ergosterol biosynthesis	P	The formation from simpler components of ergosterol, (22E)-ergosta-5,7,22-trien-3-beta-ol, a sterol found in ergot, yeast and moulds.
0008204	ergosterol metabolism	P	The chemical reactions involving ergosterol, (22E)-ergosta-5,7,22-trien-3-beta-ol, a sterol found in ergot, yeast and moulds. It is the most important of the D provitamins and is converted to vitamin D2 on irradiation with UV light.
0005783	endoplasmic reticulum	C	The irregular network of unit membranes, visible only by electron microscopy, that occurs in the cytoplasm of many eukaryotic cells. The membranes form a complex meshwork of tubular channels, which are often expanded into slitlike cavities called cisternae. The ER takes two forms, rough (or granular), with ribosomes adhering to the outer surface, and smooth (with no ribosomes attached).
0000323	lytic vacuole	C	A vacuole that is maintained at an acidic pH and which contains degradative enzymes, including a wide variety of acid hydrolases.
000322	storage vacuole	C	A vacuole that functions primarily in the storage of materials, including nutrients, pigments, waste products, and small molecules.

000324	vacuole (sensu Fungi)	C	<p>The vacuole is a large, membrane-bound organelle that functions as a reservoir for the storage of small molecules (including polyphosphate, amino acids, several divalent cations (e.g. calcium), other ions, and other small molecules) as well as being the primary compartment for degradation. It is an acidic compartment, containing an ensemble of acid hydrolases. At least in <i>S. cerevisiae</i>, there are indications that the morphology of the vacuole is variable and correlated with the cell cycle, with logarithmically growing cells having a multilobed, reticulated vacuole, while stationary phase cells contain a single large structure. As in, but not restricted to, the fungi (Fungi, ncbi_taxonomy_id:4751).</p>
--------	-----------------------	---	--

ANEXO IV

ANEXO IV(A)

Classificação utilizando ontologia genética para os transcritos de níveis significativamente ($P < 0.05$) aumentados ($R > 1$) no mutante *tif51A-1* na temperatura restritiva no ensaio de perfil transcricional.

GOID	GO_term	Probability	Genes
Molecular Function			
0005198	structural molecule activity	3.43e-87	NUP49 MRPL9 NSP1 NUP159 ACT1 NUP2 SEC13 ARC15 ARP2 TUB1 NUP57 SEH1 CDC11 ARC35 CDC3 CDC12 ARC40 ARC18 ARC19 RML2 CIS3 CWP1 PIR3 PIR1 HSP150 MRPL38 MRPL1 MRPL40 MRPL27 MRP4 MRPL32 MRP51 MRPL19 MRP21 YMR31 MRPL33 MRPL13 MRPL6 MRPL24 YDR115W MRPS16 MRPS9 NAM9 RSM26 MRPL16 MNP1 MRPL31 MRP8 RSM19 MRPL25 MRPS5 IMG2 RSM23 MRPL22 RSM10 MRPL50 RSM18 MRPS35 MRPL10 YNR036C ATP7 KAP120 MEX67 SEC31 RPS22B RPS3
0003824	catalytic activity	6.54e-134	CDC12 ELM1 TPD3 CDC55 CDC42 YCK2 SEC4 YCK1 CTS1 PIK1 DSE2 EGT2 SCW11 DSE4 ECM17 CYS4 MET17 MET14 MET6 SAH1 SAM1 CYS3 YHR112C SAM2 YFR055W AKL1 CDC5 HSL7 YML039W YML045W YCL019W YJR027W YJR029W YMR050C YMR045C YHR214C-B YBL005W-B YBR012W-B YBL100W-B/YBL101W-B IFM1 TRM11 BRR2 PRP28 MRPL9 MRPL16 ECM16 ILV5 OLE1 RRP40 SKI6 RPO41 MNN10 PNC1 PHO13 SUN4 PBS2 PAA1 CDC14 BAT1 LPD1 ILV2 GDH1 HTS1 GDH3 PRO2 TRP4 ILV3 BAT2 GCN2 LEU1 TRP1 CAR1 TRP3 ARG4 ARO8 ARG1 MES1 SER33 GLN4 FRS2 LEU2 ASN1 TRP2 PRS4 GUS1 FUM1 MCT1 ETR1 FAS1 LAT1 PDA1 ALD5 PYK2 DLD3 RSB1 PSA1 NPR1 NUC1 FUN12 CDC47 MAS1 CCA1 MTF1 MAS2 AAP1' DPP1 DPM1 CYT2 YPT1 ADK1 RPN10 SDH3 ERG27 BNA5 CDC34 SNF1 POP2 SAC1 RPN2 MNN1 RER2 GND1 UBP6 BNA3 DBP2 YHR113W SPS1 DOG2 RNR4 LIP2 PUP1 SCO1 DIN7 FUS3 YNL045W ALD4 GRX5 ADH3 MXR1 ALO1 HEM15 RIB3 GPD2 APE2 PPA2 ADH5 YDR196C COQ2 COQ3 COX6 YHB1 ATM1 VMA8 MSP1 CCC2 YPT52 PDE2 YDR061W PHO12 FRE6 GPD1 GRE2 ALT2 GLK1 VHS1 UGP1 GPH1 PPQ1 CMK2 FAA4 STE7 DPH5 GSY2 PGM2 BNA2 GND2 PFK2 TKL1 BNA1 UBP3 DCD1 PFK1 DAK1 PAN5 PPX1 IP
0003964	RNA-directed DNA polymerase activity	2.43e-24	YML039W YML045W YCL019W YJR027W YJR029W YMR050C YMR045C YHR214C-B YBL005W-B YBR012W-B YBL100W-B/YBL101W-B

0003887	DNA-directed DNA polymerase activity	3.95e-23	YML039W YML045W YCL019W YJR027W YJR029W YMR050C YMR045C YHR214C-B YBL005W-B YBR012W-B YBL100W-B/YBL101W- B
0003676	nucleic acid binding	2.97e-12	YML039W YML045W YCL019W YJR027W YJR029W YMR050C YMR045C YHR214C-B YBL005W-B YBR012W-B YBL100W-B/YBL101W- B
0003723	RNA binding	2.20e-63	MRP4 MEX67 NSR1 NMD3 WHI3 STO1 IFM1 TRM11 SCD6 VTS1 TMA22 NAN1 RLP7 UTP6 SOF1 LCP5 UTP9 DIP2 UTP5 UTP13 ESF1 UTP8 RRP5 BRX1 NOP12 LHP1 YML039W YML045W YCL019W YJR027W YJR029W YMR050C YMR045C YHR214C-B YBL005W-B YBR012W-B YBL100W-B/YBL101W-B YMR051C YBL005W-A YBL100W-A/YBL101W-A YMR046C YML040W YJR026W YCL020W YJR028W YBR012W-A BRR2 PRP6 SAD1 PRP28 MIP6

Cellular Process

0009987	cellular process	3.62e-94	PTR2 MET17 LEU1 BAT1 GLK1 MXR1 OAC1 YML039W CTR1 ALD4 CWP1 YGP1 OPT2 PCL9 AAP1' VHS1 TRP1 MET14 MAS1 ASH1 CPA2 YML045W SAM2 EGT2 MAM33 YMR051C YCL019W FKH1 ISU2 HXT4 TYE7 YJR027W ILV2 SWI5 DSE2 UGP1 MMR1 CDC55 DSE1 TNA1 PIR3 MRPL38 DPP1 YBL005W-A NIP7 FRE1 MET6 YBL100W-A/YBL101W-A YMR046C MUP1 EMI2 CIC1 DPM1 YJR029W YMR050C GDH1 YGR054W ARC15 STO1 CYT2 CAR1 YML040W PIR1 RAS2 MOB1 RPS22B MRPL1 AKL1 CDC42 YMR045C ALK1 SLX9 CLB1 LRS4 MET28 TRP3 YPT1 ARG4 PDX1 ECM22 NCL1 WHI3 ALO1 CDC11 YHR214C-B ALD5 TRM112 ECM17 DAK1 CDC5 SCW11 YJR026W YCL020W MRPL40 SAH1 TPD3 MRPL27 SEC4 RIF1 ERB1 ILV5 MRP4 FSH3 BAP3 MGE1 GPH1 DOM34 LAT1 MRPL32 RVB2 HTS1 CTS1 TWF1 ARO8 CLB2 ENT5 SAM1 PCF11 RRB1 ADK1 YFR055W RPA49 UBA2 RPN10 BAP2 YNL213C GGC1 TAO3 ARG1 RPS3 ZDS1 PHO84 OXA1 PDR16 CYS3 YCS4 PUF6 SDH3 MNN10 ABP1 DSE4 UBP10 CSE4 GDH3 SCS2 TRS23 ERG27 GPG1 ARC35 NAN1 ARX1 SSO2 MES1 SPS4 PNC1 PAN5 SRB7 PPQ1 HAP1 BNA5 CBF5 HEM15 GGA1 DBF4 PBI2 TUP1 TOM40 CDC3 RIB3 CDC34 YBL005W-B CSM1 CSN9 MRP51 MRPL19 PIG1 SFB3 SIP3 HXT2 YCK1 TOM20 Y
---------	------------------	----------	---

0044238	primary metabolism	1.23e-120	<p>YML039W YML045W YCL019W YJR027W YJR029W YMR050C YMR045C YHR214C-B YBL005W-B YBR012W-B YBL100W-B/YBL101W- B GCN2 BAT1 ILV5 LPD1 MET17 LEU1 TRP1 MET14 ILV2 MET6 GDH1 CAR1 MET28 TRP3 ARG4 ECM17 SAH1 HTS1 ARO8 SAM1 ARG1 CYS3 GDH3 MES1 SER33 GLN4 PRO2 TRP4 FRS2 LEU2 ASN1 TRP2 PRS4 ARG82 CYS4 ILV3 GUS1 BAT2 MET32 CPA2 SAM2 YHR020W NIP7 ERB1 NAN1 CBF5 NMD3 RLP7 POP8 UTP6 SOF1 FYV7 EBP2 TSR1 NOP58 LCP5 NOP15 ENP2 UTP9 DIP2 RCL1 UTP5 SPB1 UTP13 PWP1 ESF1 UTP8 RRP12 RRP5 MRT4 ECM16 NOP53 NSR1 CIC1 RVB2 RRP40 YGR272C SKI6 NUP49 YDR412W RRS1 FAP7 MRPL38 MRPL1 MRPL40 MRPL27 MRP4 MRPL32 MRP51 MRPL19 MRP21 YMR31 MRPL33 MRPL13 MRPL6 MRPL24 YDR115W MRPS16 MRPS9 NAM9 RSM26 MRPL16 MNP1 MRPL31 MRP8 RSM19 MRPL25 MRPS5 MRPL9 IMG2 RML2 RSM23 MRPL22 RSM10 MRPL50 RSM18 MRPS35 MRPL10 YNR036C YGR054W MOB1 RPS22B SLX9 LRS4 TRM112 CDC5 TPD3 RIF1 TWF1 RPA49 RPS3 PUF6 CSM1 SUI2 CDC14 AIP1 BRX1 RFC5 GCD1 SAS3 SMC1 FUN12 CDC47 ACT1 ZUO1 NOP12 CCT2 TCP1 EFT2 CCT3 RFA1 NSE4 LHP1 ELM1 ABF1 YMR051C YBL005W-A YBL100W-A/YBL101W-A YMR046C YML040W YJ</p>
0044249	cellular biosynthesis	1.81e-93	<p>TPD3 CDC55 ECM17 CYS4 MET17 MET6 IFM1 MRPL9 MRPL16 ILV5 MNN10 BAT1 LPD1 ILV2 GDH1 HTS1 GDH3 TRP4 ILV3 BAT2 GCN2 LEU1 TRP1 TRP3 ARG4 ARG1 MES1 SER33 GLN4 FRS2 LEU2 ASN1 TRP2 PRS4 GUS1 ETR1 FAS1 ALD5 PSA1 FUN12 DPM1 BNA5 MNN1 RER2 BNA3 HEM15 RIB3 YDR196C COQ3 UGP1 PPQ1 FAA4 BNA2 BNA1 PAN5 CPA2 YHR020W BET2 TPS3 FAA3 MET28 LRG1 MRP4 RML2 MRPL38 MRPL1 MRPL40 MRPL27 MRPL32 MRP51 MRPL19 MRP21 YMR31 MRPL33 MRPL13 MRPL6 MRPL24 YDR115W MRPS16 MRPS9 NAM9 RSM26 MNP1 MRPL31 MRP8 RSM19 MRPL25 MRPS5 IMG2 RSM23 MRPL22 RSM10 MRPL50 RSM18 MRPS35 MRPL10 YNR036C ATP7 RPS22B RPS3 ATP1 RRF1 MTO1 MEF1 CBP6 YGR054W SUI2 GCD1 EFT2 DOM34 SSZ1 TIF34 NIP1 PIG1</p>

0006996	organelle organization and biogenesis	3.79e-100	NIP7 ERB1 NAN1 CBF5 RLP7 POP8 UTP6 SOF1 FYV7 EBP2 TSR1 NOP58 LCP5 NOP15 ENP2 UTP9 DIP2 RCL1 UTP5 SPB1 UTP13 PWP1 ESF1 UTP8 RRP5 MRT4 ECM16 NOP53 NSR1 CIC1 BRX1 RRB1 YTM1 DHR2 LRS4 ILV5 HST3 OLE1 RRP12 RVB2 RRP40 YGR272C SKI6 NUP49 RRS1 FAP7 MRPL9 ARX1 CRM1 SRM1 NSP1 NUP159 NSA2 YRF1-4 TPD3 RIF1 AIP1 SAS3 ACT1 ABF1 RPO41 FKH1 CDC55 ZDS1 MNN10 UBP10 SCS2 PNC1 PBI2 TUP1 SWR1 NUP2 RSC2 KAR4 RSC6 ESC1 SEC13 PAF1 POB3 ARP7 VID21 SIF2 UBC9 CDC73 VAC14 STH1 PHO13 ARC15 YCS4 MYO4 ARP2 TUB1 MBA1 SUN4 MMR1 CLB1 YNL213C GGC1 OXA1 VTC4 PEX5 NUP57 SEH1 NUM1 LIA1 VTC3 VPS52 TOM7 MDM34 YNL313C VTC1 UGO1 MRS5 NMD3 YDR412W LTV1 TWF1 CCT2 TCP1 CCT3 PBS2 PAA1 ABP1 ARC35 ARC40 ENT4 PEA2 ENT1 END3 ENT2 ARC18 BBC1 ARC19 AKL1 SAC7 RHO3
0007028	cytoplasm organization and biogenesis	2.81e-75	NIP7 ERB1 NAN1 CBF5 NMD3 RLP7 POP8 UTP6 SOF1 FYV7 EBP2 TSR1 NOP58 LCP5 NOP15 ENP2 UTP9 DIP2 RCL1 UTP5 SPB1 UTP13 PWP1 ESF1 UTP8 RRP12 RRP5 MRT4 ECM16 NOP53 NSR1 CIC1 RVB2 RRP40 YGR272C SKI6 NUP49 YDR412W RRS1 FAP7 MRPL9 BRX1 RRB1 YTM1 DHR2 LTV1 ARX1 CRM1 SRM1 NSP1 NUP159 NSA2
0006082	organic acid metabolism	6.34e-81	ILV5 ECM17 HST3 OLE1 BAT1 LPD1 ILV2 GDH1 MET28 HTS1 GDH3 PRO2 TRP4 ARG82 CYS4 ILV3 BAT2 MET32 GCN2 MET17 LEU1 TRP1 MET14 MET6 CAR1 TRP3 ARG4 SAH1 ARO8 SAM1 ARG1 CYS3 MES1 SER33 GLN4 FRS2 LEU2 ASN1 TRP2 PRS4 GUS1 CPA2 SAM2 YHR020W RML2 FUM1 MCT1 ETR1 FAS1 MGA2 PDX1 LAT1 PDA1 ALD5 PYK2 DLD3 PDR12 FSH3
0019752	carboxylic acid metabolism	6.34e-81	ILV5 ECM17 HST3 OLE1 BAT1 LPD1 ILV2 GDH1 MET28 HTS1 GDH3 PRO2 TRP4 ARG82 CYS4 ILV3 BAT2 MET32 GCN2 MET17 LEU1 TRP1 MET14 MET6 CAR1 TRP3 ARG4 SAH1 ARO8 SAM1 ARG1 CYS3 MES1 SER33 GLN4 FRS2 LEU2 ASN1 TRP2 PRS4 GUS1 CPA2 SAM2 YHR020W RML2 FUM1 MCT1 ETR1 FAS1 MGA2 PDX1 LAT1 PDA1 ALD5 PYK2 DLD3 PDR12 FSH3
0006807	nitrogen compound metabolism	3.57e-69	BAT1 ILV5 LPD1 ILV2 GDH1 MET28 HTS1 GDH3 PRO2 TRP4 ARG82 CYS4 ILV3 BAT2 MET32 CTS1 GZF3 GCN2 MET17 LEU1 TRP1 MET14 MET6 CAR1 TRP3 ARG4 ECM17 SAH1 ARO8 SAM1 ARG1 CYS3 MES1 SER33 GLN4 FRS2 LEU2 ASN1 TRP2 PRS4 GUS1 CPA2 SAM2 YHR020W NPR1 URE2
0009308	amine metabolism	3.48e-66	GCN2 BAT1 ILV5 LPD1 MET17 LEU1 TRP1 MET14 ILV2 MET6 GDH1 CAR1 MET28 TRP3 ARG4 ECM17 SAH1 HTS1 ARO8 SAM1 ARG1 CYS3 GDH3 MES1 SER33 GLN4 PRO2 TRP4 FRS2 LEU2 ASN1 TRP2 PRS4 ARG82 CYS4 ILV3 GUS1 BAT2 MET32 CPA2 SAM2 YHR020W CTS1

0006520	amino acid metabolism	6.14e-68	GCN2 BAT1 ILV5 LPD1 MET17 LEU1 TRP1 MET14 ILV2 MET6 GDH1 CAR1 MET28 TRP3 ARG4 ECM17 SAH1 HTS1 ARO8 SAM1 ARG1 CYS3 GDH3 MES1 SER33 GLN4 PRO2 TRP4 FRS2 LEU2 ASN1 TRP2 PRS4 ARG82 CYS4 ILV3 GUS1 BAT2 MET32 CPA2 SAM2 YHR020W
0006519	amino acid and derivative metabolism	2.07e-66	GCN2 BAT1 ILV5 LPD1 MET17 LEU1 TRP1 MET14 ILV2 MET6 GDH1 CAR1 MET28 TRP3 ARG4 ECM17 SAH1 HTS1 ARO8 SAM1 ARG1 CYS3 GDH3 MES1 SER33 GLN4 PRO2 TRP4 FRS2 LEU2 ASN1 TRP2 PRS4 ARG82 CYS4 ILV3 GUS1 BAT2 MET32 CPA2 SAM2 YHR020W
0009309	amine biosynthesis	1.15e-35	BAT1 ILV5 LPD1 ILV2 GDH1 MET28 GDH3 TRP4 CYS4 ILV3 BAT2 GCN2 MET17 LEU1 TRP1 MET6 TRP3 ARG4 ECM17 ARG1 SER33 LEU2 ASN1 TRP2 PRS4 CPA2
0008652	amino acid biosynthesis	1.23e-36	BAT1 ILV5 LPD1 ILV2 GDH1 MET28 GDH3 TRP4 CYS4 ILV3 BAT2 GCN2 MET17 LEU1 TRP1 MET6 TRP3 ARG4 ECM17 ARG1 SER33 LEU2 ASN1 TRP2 PRS4 CPA2
0006790	sulfur metabolism	5.11e-28	ECM17 CYS4 MET17 MET14 MET6 SAH1 SAM1 CYS3 YHR112C MET28 MET32 SAM2 YFR055W
0006310	DNA recombination	4.71e-37	YML039W YML045W YCL019W YJR027W YJR029W YMR050C YMR045C YHR214C-B YBL005W-B YBR012W-B YBL100W-B/YBL101W-B RFA1 YMR051C YBL005W-A YBL100W-A/YBL101W-A YMR046C YML040W YJR026W YCL020W YJR028W YBR012W-A NUC1 YRF1-4
0006313	DNA transposition	2.59e-37	YML039W YML045W YMR051C YCL019W YJR027W YBL005W-A YBL100W-A/YBL101W-A YMR046C YJR029W YMR050C YML040W YMR045C YHR214C-B YJR026W YCL020W YBL005W-B YJR028W YBR012W-B YBL100W-B/YBL101W-B YBR012W-A
42254	ribosome biogenesis and assembly	2.81e-75	NIP7 ERB1 NAN1 CBF5 NMD3 RLP7 POP8 UTP6 SOF1 FYV7 EBP2 TSR1 NOP58 LCP5 NOP15 ENP2 UTP9 DIP2 RCL1 UTP5 SPB1 UTP13 PWP1 ESF1 UTP8 RRP12 RRP5 MRT4 ECM16 NOP53 NSR1 CIC1 RVB2 RRP40 YGR272C SKI6 NUP49 YDR412W RRS1 FAP7 MRPL9 BRX1 RRB1 YTM1 DHR2 LTV1 ARX1 CRM1 SRM1 NSP1 NUP159 NSA2
0007046	ribosome biogenesis	3.68e-76	NIP7 ERB1 NAN1 CBF5 NMD3 RLP7 POP8 UTP6 SOF1 FYV7 EBP2 TSR1 NOP58 LCP5 NOP15 ENP2 UTP9 DIP2 RCL1 UTP5 SPB1 UTP13 PWP1 ESF1 UTP8 RRP12 RRP5 MRT4 ECM16 NOP53 NSR1 CIC1 RRB1 YTM1 DHR2 RVB2 RRP40 YGR272C LTV1 SKI6 NUP49 YDR412W RRS1 FAP7 ARX1 CRM1 SRM1 NSP1 NUP159 NSA2
0016072	rRNA metabolism	2.34e-08	NIP7 ERB1 RVB2 NAN1 CBF5 RRP40 RLP7 POP8 YGR272C UTP6 SOF1 FYV7 EBP2 TSR1 NOP58 LCP5 ENP2 UTP9 DIP2 RCL1 UTP5 NOP12 SPB1 SKI6 UTP13 PWP1 YDR412W ESF1 UTP8 RRP12 RRP5 MRT4 RRS1 ECM16 NOP53 NSR1 FAP7
0030490	processing of 20S pre-rRNA	1.01e-29	NAN1 UTP6 SOF1 UTP9 DIP2 UTP5 UTP13 UTP8 RRP5 ECM16 RRP12 FYV7 NOP58 FAP7

0051301	cell division	6.96e-47	ACT1 CDC11 CDC3 CDC12 ELM1 BUD4 MYO1 PEA2 HOF1 TPD3 RAX2 CDC55 CDC42 BUD9 YCK2 TAO3 SEC4 TWF1 END3 MYO5 YCK1 CTS1 PIK1 NOP15 DSE2 EGT2 SCW11 DSE4
0000910	cytokinesis	1.73e-39	ACT1 CDC11 CDC3 CDC12 ELM1 BUD4 MYO1 PEA2 HOF1 RAX2 BUD9 YCK2 SEC4 TWF1 END3 MYO5 YCK1 CTS1 PIK1 NOP15 DSE2 EGT2 SCW11 DSE4

Cellular Component

0000943	retrotransposon nucleocapsid	1.61e-38	YML039W YML045W YMR051C YCL019W YJR027W YBL005W-A YBL100W-A/YBL101W-A YMR046C YJR029W YMR050C YML040W YMR045C YHR214C-B YJR026W YCL020W YBL005W-B YJR028W YBR012W-B YBL100W- B/YBL101W-B YBR012W-A
0043228	non- membrane- bound organelle	1.74e-123	MRPL38 MRPL1 MRPL40 MRPL27 MRP4 MRPL32 MRP51 MRPL19 MRP21 YMR31 MRPL33 MRPL13 MRPL6 MRPL24 YDR115W MRPS16 MRPS9 NAM9 RSM26 MRPL16 MNP1 MRPL31 MRP8 RSM19 MRPL25 MRPS5 MRPL9 IMG2 RML2 RSM23 MRPL22 RSM10 MRPL50 RSM18 MRPS35 MRPL10 YNR036C NIP7 YGR054W MOB1 RPS22B SLX9 LRS4 TRM112 CDC5 TPD3 RIF1 ERB1 TWF1 RPA49 RPS3 PUF6 NAN1 CBF5 CSM1 SUI2 CDC14 NMD3 AIP1 RLP7 POP8 GCN2 BRX1 UTP6 RFC5 GCD1 SOF1 FYV7 EBP2 SAS3 SMC1 FUN12 TSR1 CDC47 NOP58 LCP5 NOP15 ENP2 UTP9 ACT1 DIP2 ZUO1 RCL1 UTP5 NOP12 SPB1 UTP13 PWP1 ESF1 CCT2 TCP1 EFT2 UTP8 RRP12 RRP5 MRT4 ECM16 NOP53 CCT3 NSR1 RFA1 NSE4 LHP1 ELM1 ABF1 CIC1 ARC15 CDC11 SEC4 CLB2 RRB1 YCS4 ABP1 CSE4 ARC35 CDC3 CDC12 NDJ1 ARC40 BUD4 MYO1 YTM1 SPO12 HOF1 ENT4 YAP1801 PEA2 DHR2 ENT1 MYO4 END3 ENT2 ARC18 BBC1 ARC19 MTW1 ARP2 TUB1 MYO5 KRE33 FPR3 YCR016W

0043227	membrane-bound organelle	7.68e-117	BAT1 ILV5 LPD1 ILV2 GDH1 MET28 HTS1 GDH3 PRO2 TRP4 ARG82 CYS4 ILV3 BAT2 MET32 CTS1 NIP7 ERB1 NAN1 CBF5 RLP7 POP8 UTP6 SOF1 FYV7 EBP2 TSR1 NOP58 LCP5 NOP15 ENP2 UTP9 DIP2 RCL1 UTP5 SPB1 UTP13 PWP1 ESF1 UTP8 RRP12 RRP5 MRT4 ECM16 NOP53 NSR1 CIC1 RVB2 RRP40 YGR272C SKI6 NUP49 RRS1 FAP7 MRPL9 BRX1 RRB1 YTM1 DHR2 ARX1 CRM1 SRM1 NSP1 NUP159 NSA2 YML039W YML045W YCL019W YJR027W YJR029W YMR050C YMR045C YHR214C-B YBL005W-B YBR012W-B YBL100W-B/YBL101W-B RFA1 YMR051C YBL005W-A YBL100W-A/YBL101W-A YMR046C YML040W YJR026W YCL020W YJR028W YBR012W-A NUC1 YRF1-4 MRPL38 MRPL1 MRPL40 MRPL27 MRP4 MRPL32 MRP51 MRPL19 MRP21 YMR31 MRPL33 MRPL13 MRPL6 MRPL24 YDR115W MRPS16 MRPS9 NAM9 RSM26 MRPL16 MNP1 MRPL31 MRP8 RSM19 MRPL25 MRPS5 IMG2 RML2 RSM23 MRPL22 RSM10 MRPL50 RSM18 MRPS35 MRPL10 YNR036C SLX9 LRS4 TRM112 CDC5 TPD3 RIF1 RPA49 PUF6 CSM1 CDC14 AIP1 SAS3 SMC1 FUN12 CDC47 ACT1 ZUO1 NOP12 NSE4 LHP1 ABF1 MAS1 CCA1 SSQ1 MTF1 FUM1 MAS2 RPO41 ATP1 AAP1' ASH1 FKH1 TYE7 SWI5 CDC55 DPP1 DPM1 STO1 CYT2 YPT1 ECM22 NCL1 PCF11 ADK1 UBA2 ZDS1
0043226	organelle	1.08e-10	MRPL38 MRPL1 MRPL40 MRPL27 MRP4 MRPL32 MRP51 MRPL19 MRP21 YMR31 MRPL33 MRPL13 MRPL6 MRPL24 YDR115W MRPS16 MRPS9 NAM9 RSM26 MRPL16 MNP1 MRPL31 MRP8 RSM19 MRPL25 MRPS5 MRPL9 IMG2 RML2 RSM23 MRPL22 RSM10 MRPL50 RSM18 MRPS35 MRPL10 YNR036C
0005739	mitochondrion	3.84e-32	MRPL38 MRPL1 MRPL40 MRPL27 MRP4 MRPL32 MRP51 MRPL19 MRP21 YMR31 MRPL33 MRPL13 MRPL6 MRPL24 YDR115W MRPS16 MRPS9 NAM9 RSM26 MRPL16 MNP1 MRPL31 MRP8 RSM19 MRPL25 MRPS5 MRPL9 IMG2 RML2 RSM23 MRPL22 RSM10 MRPL50 RSM18 MRPS35 MRPL10 YNR036C
0005759	mitochondrial matrix	1.33e-99	BAT1 ALD4 MAS1 MAM33 ISU2 MRPL38 MRPL1 PDX1 MRPL40 MRPL27 ILV5 MRP4 MGE1 LAT1 MRPL32 MRP51 MRPL19 MRP21 YMR31 CCA1 MRPL33 MRPL13 MRPL6 MRPL24 LPD1 GRX5 YDR115W MRPS16 SSQ1 MRPS9 NAM9 MTF1 RSM26 MRPL16 MNP1 MRPL31 MRP8 RSM19 MRPL25 MRPS5 FUM1 MRPL9 SUN4 IMG2 RML2 ADH3 NFU1 MAS2 RPO41 RSM23 MRPL22 RSM10 MRPL50 RSM18 MRPS35 ATP1 PDA1 MRPL10 YNR036C YHB1
0000315	organellar large ribosomal subunit	5.93e-35	MRPL38 MRPL1 MRPL40 MRPL27 MRPL32 MRPL19 MRPL33 MRPL13 MRPL6 MRPL24 YDR115W MRPL16 MRPL31 MRPL25 MRPL9 IMG2 RML2 MRPL22 MRPL50 MRPL10

0005761	mitochondrial ribosome	1.21e-72	MRPL38 MRPL1 MRPL40 MRPL27 MRP4 MRPL32 MRP51 MRPL19 MRP21 YMR31 MRPL33 MRPL13 MRPL6 MRPL24 YDR115W MRPS16 MRPS9 NAM9 RSM26 MRPL16 MNP1 MRPL31 MRP8 RSM19 MRPL25 MRPS5 MRPL9 IMG2 RML2 RSM23 MRPL22 RSM10 MRPL50 RSM18 MRPS35 MRPL10 YNR036C
0005762	mitochondrial large ribosomal subunit	5.93e-35	MRPL38 MRPL1 MRPL40 MRPL27 MRPL32 MRPL19 MRPL33 MRPL13 MRPL6 MRPL24 YDR115W MRPL16 MRPL31 MRPL25 MRPL9 IMG2 RML2 MRPL22 MRPL50 MRPL10
0005763	mitochondrial small ribosomal subunit	1.40e-25	MRP4 MRP51 MRP21 YMR31 MRPS16 MRPS9 NAM9 RSM26 RSM19 MRPS5 RSM23 RSM10 RSM18 MRPS35 YNR036C
0005730	nucleolus	2.53e-64	NIP7 ERB1 NAN1 CBF5 RLP7 POP8 UTP6 SOF1 FYV7 EBP2 TSR1 NOP58 LCP5 NOP15 ENP2 UTP9 DIP2 RCL1 UTP5 SPB1 UTP13 PWP1 ESF1 UTP8 RRP5 MRT4 ECM16 NOP53 NSR1 CIC1 BRX1 RRB1 YTM1 DHR2 LRS4 SLX9 TRM112 RPA49 PUF6 CSM1 CDC14 NOP12 LHP1 SPO12 KRE33 FPR3 YCR016W
0015629	actin cytoskeleton	1.44e-49	ACT1 ARC15 ARP2 CDC11 ARC35 CDC3 CDC12 AIP1 SEC4 MYO4 TWF1 ELM1 BUD4 MYO1 ENT4 PEA2 ENT1 END3 ENT2 BBC1 MYO5 HOF1 YAP1801 ARC40 ARC18 ARC19
0005933	bud	1.25e-56	ACT1 CDC11 CDC3 CDC12 ELM1 BUD4 MYO1 HOF1 CIS3 TPD3 ZDS1 MMR1 RAX2 NUM1 AKL1 LRG1 TAO3 SOG2 KEL1 CLB2 AMN1 YRO2 MOB1 CDC55 CDC42 BUD9 YCK2 DSE1 CDC5 NIS1 HSL7 DSE3 SKG6 TCB2
0005935	bud neck	9.68e-48	ACT1 CDC11 CDC3 CDC12 ELM1 BUD4 MYO1 HOF1 TPD3 ZDS1 MMR1 RAX2 AKL1 LRG1 KEL1 CLB2 MOB1 CDC55 CDC42 BUD9 YCK2 DSE1 CDC5 NIS1 HSL7 DSE3 SKG6
0030427	site of polarized growth	6.54e-47	ACT1 CDC11 CDC3 CDC12 ELM1 BUD4 MYO1 PEA2 HOF1 TPD3 ZDS1 MMR1 RAX2 AKL1 LRG1 KEL1 CLB2 MOB1 CDC55 CDC42 BUD9 YCK2 DSE1 CDC5 NIS1 HSL7 DSE3 SKG6

ANEXO IV(B)

Descrição dos termos de ontologia genética usados na tabela do Anexo IV(A).

GOID	GO_term	Ontology	Definition
0005198	structural molecule activity	F	The action of a molecule that contributes to the structural integrity of a complex or assembly within or outside a cell.
0003824	catalytic activity	F	Catalysis of a biochemical reaction at physiological temperatures. In biologically catalyzed reactions, the reactants are known as substrates, and the catalysts are naturally occurring macromolecular substances known as enzymes. Enzymes possess specific binding sites for substrates, and are usually composed wholly or largely of protein, but RNA that has catalytic activity (ribozyme) is often also regarded as enzymatic.
0003964	RNA-directed DNA polymerase activity	F	Catalysis of the reaction: deoxynucleoside triphosphate + DNA(n) = diphosphate + DNA(n+1). Catalyzes RNA-template-directed extension of the 3'- end of a DNA strand by one deoxynucleotide at a time.
0003887	DNA-directed DNA polymerase activity	F	Catalysis of the reaction: deoxynucleoside triphosphate + DNA(n) = diphosphate + DNA(n+1); the synthesis of DNA from deoxyribonucleotide triphosphates in the presence of a DNA template or primer.
0003676	nucleic acid binding	F	Interacting selectively with any nucleic acid.
0003723	RNA binding	F	Interacting selectively with an RNA molecule or a portion thereof.
0009987	cellular process	P	Processes that are carried out at the cellular level, but are not necessarily restricted to a single cell. For example, cell communication occurs among more than one cell, but occurs at the cellular level.
0044238	primary metabolism	P	Reactions involving those compounds which are formed as a part of the normal anabolic and catabolic processes. These processes take place in most, if not all, cells of the organism.
0044249	cellular biosynthesis	P	The transformation of simpler substances into more complex ones, carried out by individual cells.
0006996	organelle organization and biogenesis	P	The assembly and arrangement of any organelle within a cell.
0007028	cytoplasm organization and biogenesis	P	The assembly and arrangement of the cytoplasm and its components.

0006082	organic acid metabolism	P	The chemical reactions involving organic acids, any acidic compound containing carbon in covalent linkage.
0019752	carboxylic acid metabolism	P	The chemical reactions involving carboxylic acids, any organic acid containing one or more carboxyl (COOH) groups or anions (COO ⁻).
0006807	nitrogen compound metabolism	P	The chemical reactions involving various organic and inorganic nitrogenous compounds; includes nitrogen fixation, nitrification, denitrification, assimilatory/dissimilatory nitrate reduction and the interconversion of nitrogenous organic matter and ammonium.
0009308	amine metabolism	P	The chemical reactions involving any organic compound that is weakly basic in character and contains an amino or a substituted amino group. Amines are called primary, secondary, or tertiary according to whether one, two, or three carbon atoms are attached to the nitrogen atom.
0006520	amino acid metabolism	P	The chemical reactions involving amino acids, organic acids containing one or more amino substituents.
0006519	amino acid and derivative metabolism	P	The chemical reactions involving amino acids, organic acids containing one or more amino substituents, and compounds derived from amino acids.
0009309	amine biosynthesis	P	The formation from simpler components of any organic compound that is weakly basic in character and contains an amino or a substituted amino group. Amines are called primary, secondary, or tertiary according to whether one, two, or three carbon atoms are attached to the nitrogen atom.
0008652	amino acid biosynthesis	P	The formation from simpler components of amino acids, organic acids containing one or more amino substituents.
0006790	sulfur metabolism	P	The chemical reactions involving the nonmetallic element sulfur or compounds that contain sulfur, such as the amino acids methionine and cysteine or the tripeptide glutathione.
0006310	DNA recombination	P	The processes by which a new genotype is formed by reassortment of genes resulting in gene combinations different from those that were present in the parents. In eukaryotes genetic recombination can occur by chromosome assortment, intrachromosomal recombination, or nonreciprocal interchromosomal recombination. Intrachromosomal recombination occurs by crossing over. In bacteria it may occur by genetic transformation, conjugation, transduction, or F-duction.

0006313	DNA transposition	P	The process of transposing (moving to a different location) a segment of a chromosome or a piece of a DNA molecule.
0042254	ribosome biogenesis and assembly	P	The processes of biogenesis and assembly of the ribosome and its subunits.
0007046	ribosome biogenesis	P	The process of the formation of the constituents of ribosomal subunits and their export to the sites of protein synthesis.
0016072	rRNA metabolism	P	The chemical reactions involving rRNA, ribosomal RNA, a structural constituent of ribosomes.
0030489	processing of 27S pre-rRNA	P	(sem definição explicativa)
0051301	cell division	P	The processes resulting in the physical partitioning and separation of a cell into daughter cells.
0000910	cytokinesis	P	The processes resulting in the division of the cytoplasm of a cell and its separation into two daughter cells. Cytokinesis usually occurs after growth, replication, and segregation of cellular components.
0000943	retrotransposon nucleocapsid	C	A complex of the retrotransposon RNA genome, reverse transcriptase, integrase, and associated molecules required for reproduction and integration of the retrotransposon into the host genome; the main structural molecule of the nucleocapsid is often a gag protein homolog.
0043228	non-membrane-bound organelle	C	Organized structure of distinctive morphology and function, not bounded by a lipid bilayer membrane. Includes ribosomes, the cytoskeleton and chromosomes.
0043227	membrane-bound organelle	C	Organized structure of distinctive morphology and function, bounded by a single or double lipid bilayer membrane. Includes the nucleus, mitochondria, plastids, vacuoles, and vesicles. Excludes the plasma membrane.
0043226	organelle	C	Organized structure of distinctive morphology and function. Includes the nucleus, mitochondria, plastids, vacuoles, vesicles, ribosomes and the cytoskeleton. Excludes the plasma membrane.
0005739	mitochondrion	C	A semiautonomous, self replicating organelle that occurs in varying numbers, shapes, and sizes in the cytoplasm of virtually all eukaryotic cells. It is notably the site of tissue respiration.

0005759	mitochondrial matrix	C	The gel-like material, with considerable fine structure, that lies in the matrix space, or lumen, of a mitochondrion. It contains the enzymes concerned with fatty-acid oxidation and enzymes of the tricarboxylic acid cycle.
0000315	organellar large ribosomal subunit	C	The larger of the two subunits of an organellar ribosome. Two sites on the ribosomal large subunit are involved in translation: the aminoacyl site (A site) and peptidyl site (P site).
0005761	mitochondrial ribosome	C	A ribosome found in the mitochondrion of a eukaryotic cell; contains a characteristic set of proteins distinct from those of cytosolic ribosomes.
0005762	mitochondrial large ribosomal subunit	C	The larger of the two subunits of a mitochondrial ribosome. Two sites on the ribosomal large subunit are involved in translation: the aminoacyl site (A site) and peptidyl site (P site).
0005763	mitochondrial small ribosomal subunit	C	The smaller of the two subunits of a mitochondrial ribosome.
0005730	nucleolus	C	A small, dense body one or more of which are present in the nucleus of eukaryotic cells. It is rich in RNA and protein, is not bounded by a limiting membrane, and is not seen during mitosis. Its prime function is the transcription of the nucleolar DNA into 45S ribosomal-precursor RNA, the processing of this RNA into 5.8S, 18S, and 28S components of ribosomal RNA, and the association of these components with 5S RNA and proteins synthesized outside the nucleolus. This association results in the formation of ribonucleoprotein precursors; these pass into the cytoplasm and mature into the 40S and 60S subunits of the ribosome.
0015629	actin cytoskeleton	C	The part of the cytoskeleton (the internal framework of a cell) composed of actin and associated proteins. Includes actin cytoskeleton-associated complexes.
0005933	bud	C	A daughter cell of an organism that reproduces by budding; formed by pinching off part of the parent cell.
0005935	bud neck	C	The constriction between the mother cell and daughter cell (bud) in an organism that reproduces by budding.
0030427	site of polarized growth	C	Any part of a cell where non-isotropic growth takes place.