

UNESP
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

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

Caracterização Funcional do Fator da Tradução eIF5A
por meio de Interações Genéticas

Fábio Carrilho Galvão

Tese de Doutorado

UNESP
2015

Fábio Carrilho Galvão

**Caracterização Funcional do Fator da Tradução eIF5A por meio
de Interações Genéticas**

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Farmacêuticas – UNESP,
Araraquara, como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Doutor em Biociências e
Biotecnologia Aplicadas à
Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini
Co-Orientadora: Profa. Dra. Brenda Jean Andrews
Co-Orientador: Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli

UNESP
2015

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

G182c Galvão, Fábio Carrilho
Caracterização funcional do fator da tradução eIF5A por meio de interações genéticas: estudo da função específica do fator da tradução eIF5A através de interações genéticas / Fábio Carrilho Galvão – Araraquara, 2015
132 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia

Orientador: Sandro Roberto Valentini

Co-orientador: Brenda J. Andrews; Cleslei Fernando Zanelli

1. Análise genética. 2. *Saccharomyces cerevisiae*. 3. Biologia molecular. 4. Genética. I. Valentini, Sandro Roberto, orient. II. Andrews, Brenda J.; Zanelli, Cleslei Fernando, co-orient. III. Título.

CAPES: 40300005

Agradecimentos

Aos meus pais, Carlos Henrique e Maria José, pelo apoio incondicional, amizade, compreensão, paciência e incentivo durante a realização deste trabalho.

A minha amiga e namorada Bruna que sempre me apoiou, entendeu e me acompanhou nas dificuldades e conquistas obtidas desde o início.

A minha família que também sempre esteve ao meu lado, me apoiando e incentivando, na qual incluo meus sogros e cunhada.

Aos amigos pelos momentos essenciais e companheirismo que em vários momentos foram essenciais para minha formação.

Aos Professores Sandro e Cleslei pelas oportunidades, discussões e orientação que contribuíram para minha formação e realização deste trabalho.

A Professora Brenda J. Andrews por me receber em seu laboratório, pela oportunidade e contribuição.

Aos demais Professores que de alguma forma contribuíram com minha formação, desde a formação inicial até a este momento.

As todas as pessoas que pude conhecer e conviver durante todo o tempo nos laboratórios, em especial, Veridiana Cano, Danuza Rossi, Paulo Boldrin, Christoph Kurat, Sara Sharifpoor e Helena Friesen que em diferentes etapas foram essenciais.

A FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Processo 2011/50801-4), CAPES, CNPq, PADC, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP e Donnelly Centre (CCBR), University of Toronto pelo apoio financeiro e institucional para a realização deste trabalho.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, em especial a Seção de Pós-graduação, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O fator da tradução 5A (eIF5A) é altamente conservado em arqueas e eucariotos e essencial para a viabilidade celular. eIF5A é a única proteína conhecida que contém o aminoácido essencial hipusina, gerado através de uma modificação pós-traducional conhecida como hipusinação e que ocorre em duas etapas enzimáticas catalisadas pelas enzimas desoxi-hipusina sintase (Dys1) e desoxi-hipusina hidroxilase (Lia1). Apesar de eIF5A ter sido relacionada recentemente com a etapa da elongação da tradução, a função específica de eIF5A nesse processo, bem como o papel do resíduo de hipusina ainda não estão descritos. Com esse intuito, este trabalho aprofundou inicialmente a caracterização do mutante *dys1-1*, mutante condicional da enzima desoxi-hipusina sintase. Os resultados revelaram que o mutante *dys1-1* apresenta defeito no perfil polissomal característico de fatores que atuam na etapa da elongação da tradução, diminuição da ligação de eIF5A nos polissomos e redução dos níveis de síntese proteica total. Além disso, foram realizadas análises de interação genética envolvendo eIF5A e dirigidas por hipóteses, à partir de dados já publicados ou resultados obtidos previamente pelo laboratório. Nestas análises foi identificada letalidade sintética entre mutantes de *ASC1* e o mutante *dys1-1*, assim como interações genéticas negativas (*synthetic sick*) entre o mutante *tif51A-1* e mutantes de genes relacionados com secreção, mais especificamente com a translocação de proteínas para o retículo endoplasmático pela via co-traducional. Finalmente, foram realizados rastreamentos de interações genéticas em larga escala por *Synthetic Genetic Array* (SGA), utilizando diferentes mutantes de eIF5A e duas coleções de linhagens mutantes de *S. cerevisiae* (linhagens nocautes e mutantes sensíveis a temperatura). Os resultados revelaram, respectivamente, 338 e 239 genes das coleções de linhagens nocautes e mutantes sensíveis a temperatura que interagiram com os mutantes de eIF5A. Estas interações se apresentaram na forma de interações sintéticas positivas e negativas, as quais totalizaram 577 interações genéticas sintéticas. Além disso, as análises de ontologia genética revelaram genes envolvidos com ciclo celular (53%), reparo de DNA (18%), tradução (16%) e tráfego vesicular/secreção (13%).

ABSTRACT

The translation factor 5A (eIF5A) is highly conserved in archaeas and eukaryotes and essential for cell viability. eIF5A is the only protein known to contain the essential amino acid hypusine, generated by a post-translational modification known as hypusination which occurs in two enzymatic steps catalyzed by the enzymes deoxyhypusine synthase (*DYS1*) and deoxyhypusine hydroxylase (Lia1) enzymes. Although eIF5A has been implicated with the elongation step of translation, its specific function and the role of the hypusine residue is still unknown. For this purpose, this work further characterized the *dys1-1* mutant, a conditional mutant of the deoxyhypusine synthase. The results revealed that the *dys1-1* mutant shows a polysome profile defect characteristic of translation elongation factors, decrease of eIF5A binding to the polysome fractions and reduction of the total protein synthesis rate. Furthermore, genetic interaction analyses of eIF5A driven by hypotheses, from published and previous data obtained in our laboratory, were performed and revealed synthetic lethality between *ASC1* mutants and the *dys1-1* mutant and negative genetic interactions (synthetic sick) between the *tif51A-1* mutant and mutants of genes related with secretion, specifically those involved with the co-translational translocation of proteins into the endoplasmic reticulum. Finally, high throughput genetic interaction analyses by Synthetic Genetic Array (SGA) were carried out using different eIF5A mutants and two *S. cerevisiae* mutant strain collections (deletion strains and temperature-sensitive mutants). The results showed, respectively, 338 and 239 genes of the deletion mutant and the temperature-sensitive mutant collections interacting with eIF5A mutants. A total of 577 positive and negative genetic interactions were observed. Moreover, the gene ontology analysis revealed genes involved with cell cycle (53%), DNA repair (18%), translation (16%) and vesicular trafficking/secretion (13%).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura tridimensional de eIF5A e EF-P.	16
Figura 2	Via da biossíntese do resíduo de aminoácido hipusina no precursor de eIF5A.	17
Figura 3	Esquema ilustrativo das etapas do ciclo celular.	25
Figura 4	Esquema simplificado da atuação das ciclinas durante o ciclo celular de <i>S. cerevisiae</i> .	26
Figura 5	Esquema representativo da construção e confirmação da linhagem <i>query</i> .	40
Figura 6	Esquema ilustrativo da metodologia <i>Synthetic Genetic Array</i> (SGA).	41
Figura 7	Esquema representativo das análises dos dados obtidos pelo SGA.	42
Figura 8	Caracterização do perfil polissomal do mutante <i>dys1-1</i> e análise da ligação de eIF5A nos polissomos.	45
Figura 9	Determinação dos níveis de síntese proteica total do mutante <i>dys1-1</i> .	46
Figura 10	Esquema representativo da <i>overlap</i> PCR utilizada para clonagem dos genes <i>ASC1</i> e <i>SNR24</i> , contido no íntron de <i>ASC1</i> , separadamente.	50
Figura 11	Amplificação e clonagem por <i>overlap</i> PCR dos genes <i>ASC1</i> e seu íntron <i>SNR24</i> .	51
Figura 12	Avaliação da interação genética sintética entre <i>DYS1</i> e <i>ASC1</i> .	52
Figura 13	Caracterização do perfil polissomal do nocaute do gene <i>ASC1</i> ($\Delta asc1$) e análise da ligação de eIF5A nos polissomos.	53
Figura 14	Avaliação da interação genética sintética entre <i>DYS1</i> e mutantes de <i>ASC1</i> com defeito na ligação ao ribossomo.	54
Figura 15	Esquema simplificado da translocação de proteínas para o retículo endoplasmático.	57
Figura 16	Avaliação da interação genética sintética entre <i>tif51A-1</i> e os mutantes <i>sec65-1</i> , <i>sec61-2</i> e <i>sec62-ts</i> , relacionados à via secretória.	58
Figura 17	Amplificação por PCR dos genes <i>DYS1</i> e <i>TIF51A</i> (selvagem e mutantes) e do cassete de nourseotricina para a construção das linhagens <i>query</i> .	69

Figura 18	Avaliação do fenótipo de sensibilidade a temperatura e a complementação pelo alelo selvagem dos mutantes de eIF5A.	70
Figura 19	Confirmação da correta inserção de <i>TIF51A</i> (selvagem ou mutantes), fusionados ao cassete <i>natMX4</i> , na linhagem <i>query</i> .	71
Figura 20	Frequência das ontologias genéticas identificadas nos rastreamentos por SGA.	73
Figura 21	Caracterização da interação genética envolvendo eIF5A e Rox1.	74
Figura 22	<i>Heat map</i> das interações identificadas nos rastreamentos realizados e relacionadas ao processo da tradução.	75
Figura 23	Análise do perfil polissomal de mutantes identificados nos rastreamentos e que atuam no processo da tradução.	76
Figura 24	<i>Heat map</i> das interações identificadas nos rastreamentos realizados e relacionadas ao processo de tráfego vesicular/secreção.	77
Figura 25	<i>Heat map</i> das interações identificadas nos rastreamentos realizados e relacionadas ao processo de reparo de DNA.	78
Figura 26	<i>Heat map</i> das interações identificadas nos rastreamentos realizados e relacionadas ao ciclo celular.	79
Figura 27	Avaliação da sensibilidade à hidroxipuréia do mutante <i>tif51A^{K56A}</i> .	83
Figura 28	Avaliação da sensibilidade a temperatura dos mutantes <i>cdc28-1</i> e <i>cdc28-td</i> quando combinados com o mutante <i>tif51A^{K56A}</i> .	84

Obs: As figuras estão apresentadas no final dos itens nos quais foram citadas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Linhagens de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas neste trabalho.	28
Tabela 2	Plasmídeos utilizados neste trabalho.	29
Tabela 3	Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.	30
Tabela 4	Número de interações genéticas identificadas nos rastreamentos de SGA com os mutantes de <i>TIF51A</i> (<i>tif51A-1</i>, <i>tif51A-3</i>, <i>tif51A</i>^{K56A} e <i>tif51A</i>^{Q22H/L93F}) e as coleções de linhagens nocautes e mutantes condicionais sensíveis a temperatura (ts).	72

ABREVIATURAS

%	porcentagem
λ	comprimento de onda
μg	micrograma
μL	microlitro
μCi	microCurie
$^{\circ}\text{C}$	graus Celcius
μM	milimolar
5-FOA	ácido 5-flúor-orótico
C-terminal	carboxi-terminal
D.O.	densidade ótica
DNA	ácido desoxirribonucléico
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
g	grama
kb	quilobase
kDa	quilodalton
L	litro
LB	meio Luria-Bertani
M	molar
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	milimolar
mRNA	RNA mensageiro
ng	nanograma
nm	nanômetro
N-terminal	amino-terminal
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
pb	pares de bases
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PBST	PBS com Tween 20
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (reação de polimerase em cadeia)
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEG	polietilenoglicol
pH	potencial hidrogeniônico
qsp	quantidade suficiente para
SGD	<i>Saccharomyces genome databank</i>
RNA	ácido ribonucléico
SC	meio sintético completo para levedura
SDS	dodecil sulfato de sódio
S-SPO	<i>super-sporulation</i> (meio para esporulação de levedura)

TE	Tris-EDTA
Tris	tris-hidroximetilaminometano
Tween 20	monolaurato de polioxietilenosorbitana
U	unidade enzimática
V	volt
xg	aceleração gravitacional
YPD	<i>yeast extract, peptone, dextrose</i> (meio rico para levedura contendo extrato de levedura, peptona e glicose)
TCA	ácido tricloroacético
NaOH	hidróxido de sódio
[³ H]	trício
m/v	relação massa/volume
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonilo
MgSO ₄	sulfato de magnésio
NaCl	cloreto de sódio
DMSO	dimetilsufóxido
ssDNA	DNA de esperma de salmão
PEG	Polietilenoglicol
LiAC	Acetato de lítio
SGA	<i>Synthetic Genetic Array</i>
RE	Retículo endoplasmático
GO	<i>Gene Ontology</i> (Ontologia Genética)
CDK	<i>cyclin-dependente kinases</i> (quinases dependentes de ciclina)
GC7	N1-guanil-1,7-diamino-heptano
GTP	guanosina trifosfato
GDP	guanosina difosfato

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO

1.1. A proteína eIF5A	13
1.2. eIF5A e suas correlações funcionais	18
1.3. Interações genéticas e a caracterização funcional de eIF5A	20
1.4. A progressão do ciclo celular em eucariotos	23

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral	27
2.2. Objetivos Específicos	27

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material	28
3.2. Métodos	31
3.2.1. Síntese proteica total <i>in vivo</i>	31
3.2.2. Perfil polissomal utilizando formaldeído	31
3.2.3. Western blot	32
3.2.4. Interação genética sintética entre dois mutantes isolados de <i>S. cerevisiae</i>	33
3.2.4.1. Cruzamento	33
3.2.4.2. Esporulação	33
3.2.4.3. Dissecção	33
3.2.4.4. Caracterização de tétrades	34
3.2.5. Clonagem empregando Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)	34
3.2.5.1. Reações de PCR	34
3.2.5.2. <i>Overlap</i> PCR	34
3.2.5.3. Digestão do inserto e vetor	35
3.2.5.4. Reação de ligação	35
3.2.6. Transformação de bactéria	35
3.2.6.1. Competência	35
3.2.6.2. Transformação	36
3.2.7. Isolamento de DNA plasmidial a partir de bactéria	36
3.2.8. Transformação de leveduras	36
3.2.9. Teste de crescimento por meio de diluição seriada	37
3.2.10. Rastreamento de interação genética sintética utilizando <i>Synthetic Genetic Array</i> (SGA)	37

3.2.10.1	Construção das linhagens para o rastreamento (linhagem <i>query</i>)	38
3.2.10.1.1.	Reação de PCR	38
3.2.10.1.2.	Transformação da linhagem	38
3.2.10.1.3.	Confirmação da obtenção da linhagem <i>query</i>	38
3.2.10.2.	Rastreamento genético utilizando SGA	39
3.2.10.3.	Análise dos dados	39
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	
4.1.	Caracterização do mutante da enzima desoxi-hipusina sintase	43
	<i>dys1-1</i>	
4.1.1.	Avaliação do perfil polissomal do mutante <i>dys1-1</i>	43
4.1.2.	Análise da síntese proteica total	44
4.2.	Identificação de interações genéticas envolvendo eIF5A e	47
	dirigidas por hipóteses	
4.2.1.	Análise de interação genética sintética do mutante <i>dys1-1</i> com mutantes do gene <i>ASCI</i>	47
4.2.2.	Análise da interação genética do mutante <i>tif51A-1</i> com mutantes de genes relacionados à via secretória (<i>SEC65</i> , <i>SEC61</i> e <i>SEC62</i>)	55
4.3.	Rastreamento de novas interações genéticas envolvendo eIF5A	59
4.3.1.	Construção e confirmação das linhagens <i>query</i>	60
4.3.2.	Análise de interação genética sintética em larga escala por meio do <i>Synthetic Genetic Array</i> (SGA)	62
5.	CONCLUSÕES	85
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

1. INTRODUÇÃO

1.1. A proteína eIF5A

O provável fator de início da tradução de eucariotos 5A (eIF5A) é uma proteína altamente conservada em arqueas e eucariotos, sendo que as proteínas eIF5A de *Saccharomyces cerevisiae* e de mamíferos são 63% idênticas (Schnier *et al.* 1991; Chen e Liu 1997). Ainda, a proteína humana substitui completamente a proteína de levedura, mostrando que eIF5A humana e de levedura não são apenas conservadas em sua sequência, mas também funcionalmente (Schwelberger *et al.* 1993). Por outro lado, eIF5A não é encontrado em eubactérias, as quais possuem um homólogo estrutural denominado fator de alongação da tradução P, EF-P (Hanawa-Suetsugu *et al.* 2004).

Em *Saccharomyces cerevisiae*, eIF5A possui 17 kDA e é codificada por dois genes, *TIF51A* (*HYP2*) e *TIF51B* (*ANB1*). Em condições aeróbicas, somente *TIF51A* é expresso, enquanto em condições anaeróbicas *TIF51B* é expresso (Schnier *et al.* 1991; Kang *et al.* 1993; Tome e Gerner 1997). *TIF51A* é essencial para o crescimento em condições aeróbicas (Schnier *et al.* 1991; Wohl *et al.* 1993; Valentini *et al.* 2002). As proteínas codificadas pelos dois genes de *S. cerevisiae* são altamente similares, compartilhando 90% de identidade, sendo que a expressão apenas de *TIF51A* ou *TIF51B* promove o crescimento tanto em condições aeróbicas, quanto em condições anaeróbicas, sendo, portanto, funcionalmente intercambiáveis (Schwelberger *et al.* 1993).

As estruturas tridimensionais de homólogos de eIF5A de espécies de arqueas, de protozoários e, mais recentemente, de humanos e de levedura foram determinadas e revelaram várias características comuns (Kim *et al.* 1998; Peat *et al.* 1998; Yao *et al.* 2003; Tong *et al.* 2009). Segundo esses estudos, eIF5A trata-se de uma proteína dividida em dois domínios predominantemente compostos por folhas beta (Figura 1A). A comparação destes domínios com outras proteínas de estruturas tridimensionais conhecidas mostra que o domínio N-terminal possui um dobramento classificado como *Translation Protein SH3-like motif*. Esse dobramento também está presente em várias proteínas ribossomais e fatores de alongação da tradução (Gough *et al.* 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 (Gough *et al.* 2001). De fato, dois estudos tentaram correlacionar a função de eIF5A com a ligação a mRNAs, porém tais estudos ainda necessitam ser ampliados para se estabelecer um papel biológico de eIF5A na interação física direta com mRNAs (Xu e Chen 2001; Xu *et al.* 2004).

Além de ser uma proteína altamente conservada ao longo da evolução, eIF5A sofre uma modificação pós-traducional totalmente específica, a qual também é conservada, chamada de hipusinação. Como mostrado na Figura 2, a hipusinação é uma modificação pós-traducional incomum e ocorre em duas etapas. Inicialmente, a enzima desoxi-hipusina sintase (Dys1 em *S. cerevisiae* ou *DHPS* em mamíferos) transfere a parte aminobutil da poliamina espermidina para o aminogruppo de um resíduo específico de lisina de eIF5A (K51 em *S. cerevisiae*; K50 em eIF5A1 de *Homo sapiens*), para formar o resíduo de desoxi-hipusina. A seguir, outra enzima, chamada desoxi-hipusina hidroxilase (Lia1 em levedura ou *DOHH* em mamíferos), termina a formação do aminoácido hipusina (Schnier *et al.* 1991; Kang *et al.* 1993; Klier *et al.* 1993; Park *et al.* 1993a; Abid *et al.* 1997; Chen e Liu 1997). O termo “hipusina” é derivado de hidroxiputrescina-lisina (Park *et al.* 1993a). O resíduo de lisina específico de eIF5A é modificado logo após a proteína eIF5A ser sintetizada, e o resíduo de hipusina não é alterado ou removido até que a proteína seja degradada, revelando a irreversibilidade dessa reação (Park *et al.* 1993b).

Como mencionado anteriormente, apesar de eIF5A não estar presente em eubactérias, estas apresentam o homólogo estrutural EF-P, sendo os seus dois primeiros domínios sobreponíveis à estrutura de eIF5A de arquea (Figura 1B) (Hanawa-Suetsugu *et al.* 2004). Curiosamente, foi observado que EF-P de um subgrupo de bactérias sofre uma modificação pós-traducional em um resíduo específico de lisina (K34), correspondente ao sítio de hipusinação de eIF5A. Esta modificação, denominada lisilação, é análoga à hipusinação e envolve a incorporação de uma lisina através da carbonila do grupamento amino da lisina 34 de EF-P pelas enzimas YjeA e YjeK (Bailly e de Crécy-Lagard 2010; Navarre *et al.* 2010; Yanagisawa *et al.* 2010). Apesar de EF-P ser essencial e o sítio alvo da modificação pós-traducional ser altamente conservado, esta modificação parece não ser essencial para a função de EF-P em todas as bactérias, uma vez que esta modificação foi

observada apenas em um subgrupo de bactérias (Brochier *et al.* 2004; Bailly e de Crécy-Lagard 2010).

Enquanto ortólogos de eIF5A, assim como da enzima desoxi-hipusina sintase, são encontrados em arqueas e mamíferos, arqueas parecem não possuir ortólogos para a enzima desoxi-hipusina hidroxilase. Além disso, o gene para desoxi-hipusina hidroxilase não é essencial em *S. cerevisiae* para crescimento em nenhuma condição testada até o momento (Thompson *et al.* 2003), enquanto o ortólogo de *Schizosaccharomyces pombe* é necessário para o crescimento em temperaturas acima de 37°C (Weir e Yaffe 2004). Por outro lado, o gene para desoxi-hipusina hidroxilase é essencial para o desenvolvimento tanto em *Drosophila melanogaster* como em *Caenorhabditis elegans* (Park *et al.* 2010). Portanto, a primeira etapa da hipusinação é essencial em todas as espécies que possuem eIF5A, mas a segunda etapa parece se tornar mais importante funcionalmente apenas ao longo da progressão evolutiva. Dessa forma, a substituição do resíduo de lisina específico de eIF5A, em *S. cerevisiae*, por arginina (K51R) leva à produção de eIF5A não hipusinado, sendo este incapaz de permitir o crescimento celular quando é a única fonte de eIF5A na célula (Schnier *et al.* 1991). Além disso, eIF5A recombinante, não hipusinado, não é funcional no ensaio de síntese de metionil-puromicina, sendo que, após modificação *in vitro* pela desoxi-hipusina sintase, a eIF5A recombinante passa a ser funcional neste ensaio (Park 1989; Smit-McBride *et al.* 1989). Por fim, a região flanqueadora do sítio de hipusinação é extremamente conservada ao longo da evolução, sendo formada por uma sequência de doze aminoácidos: STSKTG-HIPUSINA-HGHAK (Park *et al.* 1993b; Magdolen *et al.* 1994; Chen e Liu 1997). Portanto, todos 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.

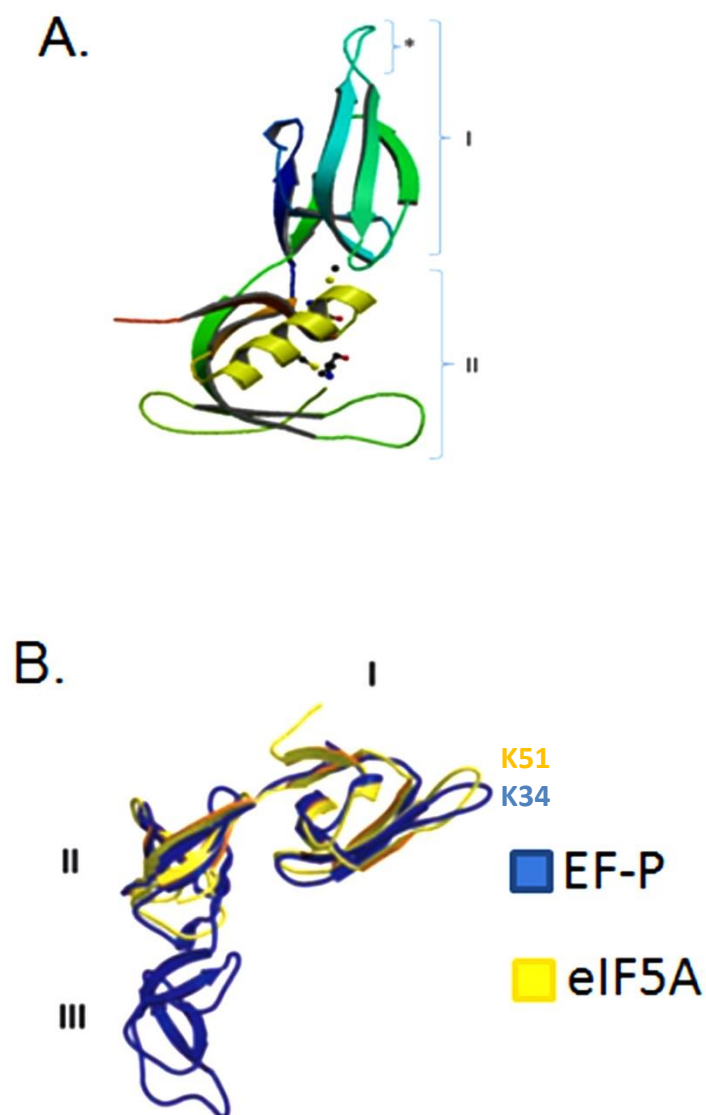


Figura 1. Estrutura tridimensional de eIF5A e EF-P. (A) Estrutura cristalográfica de eIF5A de *Leishmania mexicana* (Protein Data Bank: 1XTD). I: Domínio N-terminal (*Translation protein SH3-like motif*); *: alça de hipusinação e II: Domínio C-terminal (*Single-stranded oligonucleotide binding fold*).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

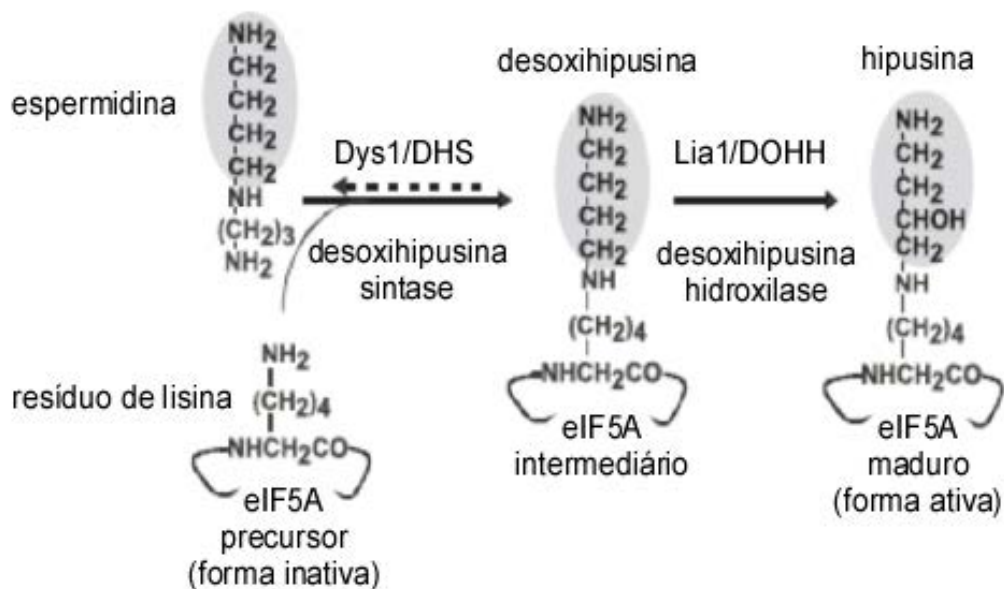


Figura 2. Via da biossíntese do resíduo de aminoácido hipusina no precursor de eIF5A. Esquema simplificado da modificação pós-traducional de eIF5A. A porção 4-aminobutil proveniente da poliamina espermidina está sombreada e é transferida ao resíduo de lisina do precursor inativo de eIF5A, por meio da ação da enzima desoxihipusina sintase (Dys1 em levedura, DHS em humanos). O intermediário resultante, agora contendo desoxihipusina, é posteriormente hidroxilado pela enzima desoxihipusina hidroxilase (Lia1 em levedura, DOHH em humanos), o que resulta na ativação de eIF5A. As cadeias laterais da lisina, desoxihipusina e hipusina estão sendo mostradas (Park 2006).

1.2. eIF5A e suas correlações funcionais

Originalmente, a proteína eIF5A foi purificada a partir de ribossomos de lisados de reticulócitos de coelho, e devido a sua capacidade de estimular a síntese de metionil-puromicina *in vitro* foi considerada como um fator de início da tradução (Benne e Hershey 1978). No entanto, estudos em *S. cerevisiae* mostraram que a depleção deste fator causa uma redução de apenas 30% nos níveis de síntese protéica, sugerindo não ser um fator essencial na síntese protéica de forma geral (Kang e Hershey 1994; Zuk e Jacobson 1998). Alternativamente, foi proposto que eIF5A seja um fator envolvido na tradução de um grupo específico de mensageiros, por exemplo, fatores envolvidos na transição G1/S do ciclo celular, uma vez que a depleção de eIF5A em *S. cerevisiae* leva a um aumento no número de células paradas na fase G1 do ciclo celular (Park *et al.* 1993a; Park *et al.* 1997). Ainda, eIF5A quando em alto número de cópias suprimiu mutantes que apresentam defeitos na etapa de *mating*, como no caso de *Afus3* (Kang e Hershey 1994). Além disso, outros estudos que descreveram a correlação funcional entre eIF5A e o ciclo celular, em mamíferos, fizeram uso de inibidores das etapas da modificação pós-traducional de eIF5A, como por exemplo GC7 (N1-guanil-1,7-diamino-heptano), demonstrando que a inibição da hipusinação acarreta na inibição da proliferação, crescimento e diferenciação celular, devido à inibição da transição G1/S do ciclo celular (Cooper *et al.* 1982; Park 2006; Park *et al.* 1997). Apesar das evidências que descrevem a correlação entre eIF5A e a progressão do ciclo celular, não está claro o mecanismo pelo qual isto ocorre ou se é um efeito secundário à tradução ou devido à utilização de compostos inespecíficos para a inibição da função de eIF5A, como no caso do GC7 (Landau *et al.* 2010).

eIF5A já foi relacionado também ao decaimento de mRNA, uma vez que mutantes de eIF5A, em *S. cerevisiae*, apresentam defeitos na degradação de mRNA quando na condição restritiva de crescimento (Zuk e Jacobson 1998; Valentini *et al.* 2002). eIF5A também já foi correlacionado como cofator da proteína Rev de HIV-1, atuando no transporte nucleocitoplasmático de mRNA deste vírus (Ruhl *et al.* 1993; Bevec *et al.* 1996; Bevec e Hauber 1997; Rosorius *et al.* 1999). Entretanto, estas funções biológicas não estão claramente demonstradas, uma vez que sua função no decaimento de mRNA possivelmente seja um papel secundário a sua atuação na elongação da tradução, pois uma parada nesta etapa leva ao bloqueio da degradação de mRNA (Beelman e Parker 1994). Além disso, sua atuação no transporte

nucleocitoplasmático não foi evidenciada por outros estudos (Henderson e Percipalle 1997; Shi *et al.* 1997; Jao e Yu Chen 2002; Valentini *et al.* 2002).

Embora a função de eIF5A como fator de início da tradução nunca ter sido claramente demonstrada, a comprovação de que eIF5A associa-se com ribossomos ativamente engajados na tradução, a sua capacidade de copurificar outras proteínas ribossomais e componentes da maquinaria da tradução e o fato de mutantes condicionais de eIF5A apresentarem defeitos claros na síntese de proteínas trouxeram eIF5A de volta ao cenário da tradução (Jao e Chen 2006; Zanelli *et al.* 2006; Dias *et al.* 2008). Mais recentemente, mutantes condicionais de eIF5A quando na temperatura restritiva de crescimento apresentaram defeitos característicos de fatores que atuam na elongação da tradução, como por exemplo, aumento das frações polissomais em relação ao monossomo 80S, diminuição nos níveis de síntese protéica total e atraso no tempo de trânsito ribossomal (Gregio *et al.* 2009; Saini *et al.* 2009).

Recentemente, foi observado que eIF5A e EF-P apresentam um importante papel na atenuação de um tipo de *stalling* dos ribossomos, ou seja, eIF5A facilitaria a tradução de uma sequência de aminoácidos que por algum motivo atrasa o processo da tradução. Embora várias sequências já foram descritas para EF-P, apenas a sequência de prolinas consecutivas (poliprolinas) foi descrita para eIF5A. Além disso, foi observado para EF-P que as regiões flanqueadoras dos sítios contendo as sequências de prolinas também são importantes para a atenuação do *stalling* dos ribossomos mediada por este fator (Woolstenhulme *et al.* 2015). Uma vez que os dados relacionando EF-P à tradução específica obtidos até o momento foram relevantes para a caracterização de eIF5A, as regiões flanqueadoras das poliprolinas em eucariotos também devem sinalizar para a atuação de eIF5A na tradução específica. Dessa forma, esses resultados sugerem uma função específica para estes fatores no processo da tradução (Doerfel *et al.* 2013; Gutierrez *et al.* 2013; Ude *et al.* 2013; Woolstenhulme *et al.* 2015).

Por fim, o mecanismo crucial pelo qual eIF5A afeta a tradução, o papel da hipusinação para o funcionamento de eIF5A e se este fator atua na tradução global ou de um grupo específico de mRNAs são questões ainda em aberto.

1.3. Interações genéticas e a caracterização funcional de eIF5A

Interação genética por definição é um fenômeno onde a função desempenhada por um determinado gene é modificada de acordo com a presença ou ausência de um ou mais genes. Dessa forma, a interação genética se caracteriza pela alteração não esperada de um determinado fenótipo, sendo observado apenas quando da combinação dos efeitos obtidos por dois ou mais genes mutados. Com isso, o entendimento de como os genes interagem uns com os outros e o que isso reflete fenotipicamente para um organismo contribui significativamente para o entendimento da função do gene em estudo, desde que esteja bem caracterizada a função dos parceiros genéticos. Portanto, as análises destas interações genéticas têm sido utilizadas como uma importante ferramenta na caracterização de genes e/ou vias metabólicas, identificando as correlações funcionais entre vários genes e seus produtos, de acordo com o tipo de interação genética observada (Boone *et al.* 2007, Mani *et al.* 2008, Dixon *et al.* 2009). Neste contexto, a observação de uma interação genética se dá através da identificação/comparação de um fenótipo, o qual é diferente do esperado quando da combinação de dois ou mais genes em um mesmo organismo (Boone *et al.* 2007, Mani *et al.* 2008).

Dessa forma, as interações genéticas podem ser divididas em duas classes de interações, onde podem ser descritas como interações positivas ou negativas. As interações negativas resultam em uma piora do crescimento celular (*fitness* celular), ou seja, o *fitness* do duplo mutante é mais severo do que dos mutantes isolados. Estas interações também são conhecidas como interações sintéticas doentes (*synthetic sick*) e a sua forma mais severa resulta em letalidade sintética com morte celular (*synthetic lethal*). Estas por sua vez, são resultados de genes cuja função está relacionada a vias metabólicas paralelas ou a uma mesma via metabólica/complexo essencial (Guarente, 1993, Boone *et al.* 2007, Dixon *et al.* 2009).

Por outro lado, as interações genéticas positivas refletem em um fenótipo menos severo do que daqueles dos mutantes isolados, ou seja, resultam em melhora do *fitness* celular, a qual pode refletir genes de um mesmo complexo protéico não essencial (Boone *et al.* 2007).

Além das interações genéticas observadas pela combinação de duas ou mais mutações em um mesmo organismo, como descritas acima, podem ser identificadas também interações genéticas pelo aumento no número de cópias de um determinado

gene e, consequentemente, aumento nos níveis protéicos do produto gênico. Estas por sua vez, podem resultar em toxicidade ou supressão gênica, ou seja, a superexpressão de determinado gene poderá piorar ou suprimir os fenótipos observados para um dado mutante (Dixon *et al.* 2009). Assim, a busca de genes supressores pelo aumento na expressão gênica também é um caminho amplamente utilizado na caracterização funcional envolvendo interações genéticas. Neste caminho, são utilizados vetores plasmidiais contendo origem de replicação de alto número de cópias (2μ) ou promotores induzíveis, como por exemplo, por galactose (Forsburg 2001; Rine 1991).

Portanto, a caracterização das correlações genéticas de um determinado fator proporciona o entendimento de sua atuação nas vias metabólicas e, consequentemente, da sua função celular.

Vários são os fatores que permitiram a utilização das análises genéticas como ferramenta de caracterização funcional de genes, entre eles, se destacam o sequenciamento de genomas, a geração de linhagens nocautes/mutantes e a utilização de organismos modelos (Goffeau *et al.* 1996; Rothstein 1983; Forsburg 2001; Davierwala *et al.* 2005). Ainda, a possibilidade de combinação de duas mutações em um mesmo organismo haplóide e a observação e/ou quantificação da interação genética através do *fitness* da célula, ou seja, da sua taxa de crescimento, permite a identificação de interações genéticas de maneira confiável (Mani *et al.* 2008; Forsburg 2001).

Neste contexto, foi realizado em nosso laboratório, um rastreamento de letalidade sintética envolvendo o mutante *tif51A-3*. Neste rastreamento, foi identificado o gene *YPT1*, cujo produto é essencial na fusão das vesículas do retículo endoplasmático (RE) ao Complexo de Golgi (Segev 2001), como letal sintético do gene codificador de eIF5A (Frigieri *et al.* 2007; Frigieri *et al.* 2008). Dessa forma, ficou evidenciada uma conexão entre tradução e tráfego vesicular/secreção e o, consequente, crescimento polarizado (Frigieri *et al.* 2007; Frigieri *et al.* 2008), fundamental para a transição G1/S do ciclo celular em *S. cerevisiae*. Ainda, neste mesmo estudo foi observado que a superexpressão de eIF5A suprimiu o defeito de crescimento apresentado por mutantes de *YPT1*, entretanto, a superexpressão de *YPT1* não suprimiu os defeitos de crescimento dos mutantes de eIF5A testados, sugerindo que a atuação de eIF5A seja anterior a Ypt1.

Uma vez que a identificação de genes supressores contribui para a caracterização funcional de um fator, foram realizados em nosso laboratório dois rastreamentos genéticos para a busca de supressores para um mutante de eIF5A (*tif51A-1*). Em um destes estudos, foram identificados genes relacionados à sinalização e integridade de parede celular, como por exemplo *PKC1*, e seus reguladores *WSC1*, *WSC2* e *WSC3* (Valentini *et al.* 2002). No outro rastreamento, foram identificados novos fatores relacionados ao crescimento polarizado em *S. cerevisiae*, como *GIC1*, *ZDS1*, *BEM1* e *BNH1* (Zanelli e Valentini 2005), fortalecendo o envolvimento de eIF5A na progressão do ciclo celular.

Recentemente, *EFT2*, gene que codifica o fator de elongação da tradução 2, foi identificado como supressor dos defeitos relacionados a tradução do mutante *tif51A^{K56A}*. Neste trabalho, a superexpressão de *EFT2*, além de suprimir o defeito de termosensibilidade do mutante, suprimiu também os defeitos apresentados no perfil polissomal, assim como na síntese protéica total, corroborando com o papel de eIF5A na elongação da tradução (Dias *et al.* 2012).

Devido à importância das interações genéticas no estudo funcional de diversos fatores (Phillips *et al.* 2000; Hartman *et al.* 2001; Boone *et al.* 2007), várias foram as coleções gênicas desenvolvidas, como por exemplo, coleção de linhagens nocautes (para genes não essenciais), coleção de mutantes sensíveis a temperatura (para genes essenciais), além de coleções para superexpressão de genes por galactose (Giaever *et al.* 2002; Winzeler *et al.* 1999; Zhu *et al.* 2001; Li *et al.* 2011). Ainda, mais recentemente foi desenvolvida a técnica para análise de interações genéticas em larga escala, conhecida como SGA (*Synthetic Genetic Array*) (Tong e Boone 2006). Esta técnica permite a realização de rastreamento e identificação das interações genéticas sintéticas em larga escala. Essa metodologia torna possível analisar, por exemplo, as interações genéticas sintéticas do gene de interesse com os aproximadamente 5.000 genes não essenciais de *S. cerevisiae* (coleção de linhagens nocautes), de maneira reprodutiva e simultânea e, assim, identificar as interações genéticas de um determinado fator de maneira global, uma vez que possibilita o rastreamento de todos os genes das diversas coleções de maneira quantitativa (Baryshnikova *et al.* 2010b; Costanzo *et al.* 2010).

Como mencionado anteriormente, várias correlações funcionais de eIF5A foram reveladas por meio da análise de suas interações genéticas. Desta forma, a

identificação e caracterização de novas interações genéticas para eIF5A contribuirá para a compreensão do seu papel específico e/ou das relações genéticas essenciais para que eIF5A exerça sua função na célula.

1.4. A progressão do ciclo celular de eucariotos

Em eucariotos, o ciclo celular é altamente conservado, regulado e necessário para a viabilidade celular (Murray 1993; Ouzounis e Kypides 1996; Olsen e Woese 1997).

Resumidamente, este processo consiste de quatro fases, denominadas G1, S, G2 e M. Estas fases são altamente controladas por diversos fatores e ocorrem uma única vez por ciclo celular. Quando em condições ideais de crescimento, na fase G1, de *Gap*, ocorre a síntese de proteínas e demais fatores necessários para o início do ciclo celular. Em seguida, na fase S, de *Síntese*, ocorre a síntese do DNA pela replicação cromossômica. Após a replicação, ocorre novamente uma fase de *Gap*, G2, necessária para síntese de outros fatores essenciais para o crescimento celular. Por fim, ocorre a fase M, de *Mitose*, onde os cromossomos juntamente com outros componentes celulares são separados e a célula se divide em duas células filhas com o mesmo conteúdo genético (Figura 3). Além disso, diversos mecanismos de controle (*checkpoints*) ocorrem para assegurar a correta progressão para a fase seguinte. Estes *checkpoints* sinalizam, por exemplo, para a presença de nutrientes ou dano no DNA, correta morfologia celular e posicionamento dos fusos mitóticos (*mitotic spindle*) (Murray 1995; Yasutis e Kozminski 2013; Hartwell e Weinert 1989).

Este complexo controle do ciclo celular se dá de maneira auto-regulável e consiste na regulação periódica da transcrição de mais de 800 genes, ou seja, mais de 10% do genoma de *S. cerevisiae* é auto-regulável durante as etapas do ciclo celular (Spellman *et al.* 1998). Isto sugere que uma expressão gênica coordenada seja necessária para a correta progressão no ciclo celular e, para que isso ocorra, alguns genes ativadores são necessários. Apesar de poucos, esses genes codificam um conjunto de proteínas denominadas ciclinas e quinases dependentes das ciclinas (CDKs - *cyclin-dependent kinases*), que se associam para formar diversos complexos regulatórios do ciclo celular (Li *et al.* 2004).

Em *S. cerevisiae*, apesar da existência de outras, Cdc28 é a única quinase essencial para este complexo, e, consequentemente, para a progressão do ciclo celular

(Yasutis e Kozminski 2013). Além das quinases, as ciclinas são fatores chaves neste processo, as quais são específicas para cada uma das etapas. Em *S. cerevisiae*, as ciclinas são divididas em duas classes: Clns e Clbs. Cln1, Cln2 e Cln3 atuam na fase G1 e Clb1, Clb2, Clb3, Clb4, Clb5 e Clb6, conhecidas como ciclinas B, atuam nas fases S, G2 e M (Figura 4) (Hocheegger *et al.* 2008; Yasutis e Kozminski 2013). Esta variedade de Clns ou Clbs torna possível, mesmo que de maneira tardia, a complementação/substituição de função quando na ausência de outra do mesmo subtipo (Bloom e Cross 2007).

Portanto, as CDKs, quando na presença das ciclinas específicas, bem como a auto-regulação deste complexo representam a via de controle para a progressão do ciclo celular, atuando como os fatores organizadores das diversas etapas do ciclo celular (Figura 4) (Bloom e Cross 2007; Coudreuse e Nurse 2010). Além da auto-regulação desempenhada pelas CDKs e suas ciclinas, outros mecanismo também são importantes para a progressão do ciclo celular em *S. cerevisiae*. Dentre estes, se destaca o controle desempenhado por fatores de transcrição específicos, como por exemplo Whi5 e Mcm1, e pelos complexos SBF (*Swi4-Swi6 Binding Factor*) e MBF (*Mlu1-box Binding Factor*). Além do controle transcricional, outros fatores relacionados à degradação das ciclinas, como por exemplo Sic1 e os complexos APC (*Anaphase Promoting Complex*) e SCF (*Skp Cullin E-box*), os quais são responsáveis pela sinalização, ubiquitinação e, conseqüentemente, degradação e reciclagem das CDKs, também são importantes para a progressão do ciclo celular (Spellman *et al.* 1998; Bloom e Cross 2007; Yasutis e Kozminski 2013).

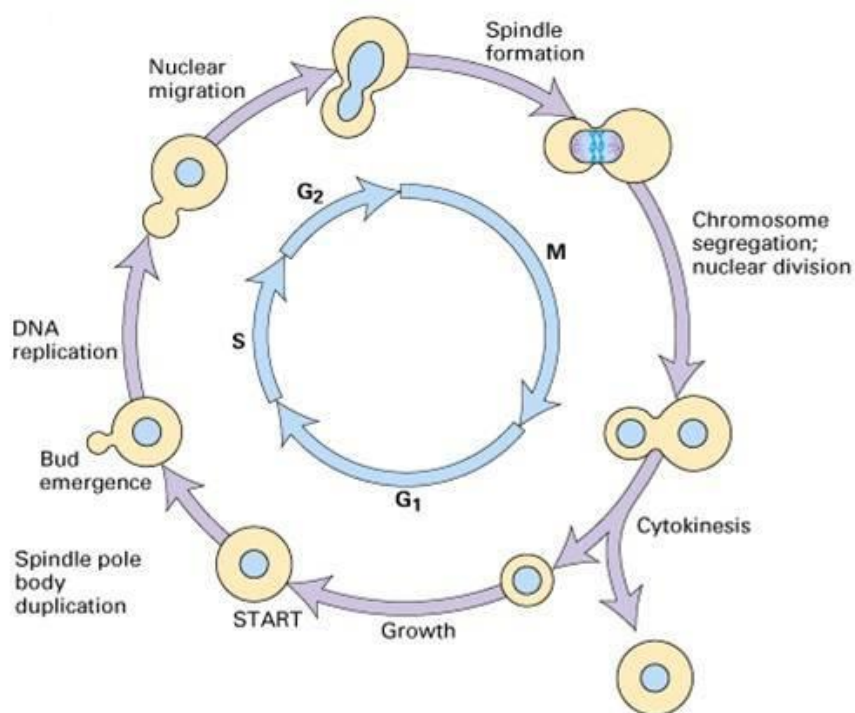


Figura 3. Esquema ilustrativo das etapas do ciclo celular. O esquema simplificado representa as quatro etapas do ciclo celular em *S. cerevisiae*, com as sinalizações e alterações que ocorrem durante cada etapa (Adaptada de Nguyen 2015).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Ampliar os estudos de caracterização funcional do fator da tradução de eucariotos 5A (eIF5A), por meio da busca de interações genéticas sintéticas com diferentes mutantes de eIF5A e Dys1, incluindo rastreamentos genéticos em larga escala

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Caracterização do mutante da enzima desoxi-hipusina sintase *dys1-1*

- Avaliação do perfil polissomal do mutante *dys1-1*
- Análise da síntese protéica total do mutante *dys1-1*

2.2.2. Identificação de interações genéticas envolvendo eIF5A e dirigidas por hipóteses

- Análise de interação genética do mutante *dys1-1* com mutantes do gene *ASCI*
- Análise da interações genética do mutante *tif51A-1* com mutantes de genes relacionados à via secretória (*SEC65*, *SEC61* e *SEC62*)

2.2.3. Rastreamento de novas interações genéticas envolvendo eIF5A

- Caracterização de interações genéticas sintéticas com diferentes mutantes condicionais de eIF5A e Dys1, por meio do rastreamento em larga escala pela metodologia *Synthetic Genetic Array* (SGA) e utilizando diversas coleções de linhagens de *S. cerevisiae*

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

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

Linhagem	Genótipo	Origem
SVL453	<i>MATα leu2 trp1 ura3 his3 dys1::HIS3 [DYS1/URA3/CEN - pSV526]</i>	Coleção do laboratório
SVL613	<i>MATα leu2 trp1 ura3 his3 dys1::HIS3 [DYS1/TRP1/CEN - pSV520]</i>	Coleção do laboratório
SVL 614	<i>MATα leu2 trp1 ura3 his3 dys1::HIS3 [dys1^{W75R,T118A,A147T}/TRP1/CEN - pSV730]</i>	Coleção do laboratório
VZL1133	<i>MATα ura3 his3 leu2 met15 asc1::kanMX4</i>	Coleção do laboratório
VZL1134	<i>MATα ura3 his3 leu2 met15 asc1::kanMX4 dys1::HIS3 [DYS1/URA3/CEN]</i>	Este trabalho
BY 7092	<i>MAT α can1delta::STE2pr-Sp_his5* lyp1delta his3delta1 leu2delta0 ura3delta0 met15delta0</i>	Andrews lab
VZL1256	<i>MAT α can1delta::STE2pr-Sp_his5* lyp1delta his3delta1 leu2delta0 ura3delta0 met15delta0 TIF51A::natMX4</i>	Este trabalho
VZL1257	<i>MAT α can1delta::STE2pr-Sp_his5* lyp1delta his3delta1 leu2delta0 ura3delta0 met15delta0 tif51A-1::natMX4</i>	Este trabalho
VZL1258	<i>MAT α can1delta::STE2pr-Sp_his5* lyp1delta his3delta1 leu2delta0 ura3delta0 met15delta0 tif51A-3::natMX4</i>	Este trabalho
VZL1259	<i>MAT α can1delta::STE2pr-Sp_his5* lyp1delta his3delta1 leu2delta0 ura3delta0 met15delta0 tif51A^{K56A}::natMX4</i>	Este trabalho
VZL1260	<i>MAT α can1delta::STE2pr-Sp_his5 lyp1delta his3delta1 leu2delta0 ura3delta0 met15delta0 tif51A^{Q22H/L93F}::natMX4</i>	Este trabalho
Y07842	<i>MATα his3 leu2 ura3 sec61-2::kanMX4</i>	Andrews lab
Y07900	<i>MATα his3 leu2 ura3 sec62-ts::kanMX4</i>	Andrews lab
Y11000	<i>MATα his3 leu2 ura3 sec65-1::kanMX4</i>	Andrews lab
Δ hur1	<i>MATα ura3 his3 leu2 met15 hur1::kanMX4</i>	Coleção de nocautes
Δ bem1	<i>MATα ura3 his3 leu2 met15 bem1::kanMX4</i>	Coleção de nocautes

* *STE2pr-Sp_his5* corresponde ao gene selvagem *his5* de *S. pombe*, controlado pelo promotor do gene *STE2* de *S. cerevisiae*.

Tabela 2. Plasmídeos utilizados neste trabalho.

Plasmídeo	Características	Origem
pSV59	<i>CEN, LEU2</i>	Coleção do laboratório
pSV64	<i>2μ, LEU2</i>	Coleção do laboratório
pSV108	<i>TIF51A, 2μ, LEU2</i>	Coleção do laboratório
pSV139	<i>tif51A-1, CEN, LEU2</i>	Coleção do laboratório
pSV140	<i>tif51A-3, CEN, LEU2</i>	Coleção do laboratório
pSV146	<i>TIF51A, CEN, LEU2</i>	Coleção do laboratório
pSV501	<i>TIF51A, CEN, TRP1</i>	Coleção do laboratório
pSV520	<i>DYS1, CEN, TRP1</i>	Coleção do laboratório
pSV526	<i>DYS1, CEN, URA3</i>	Coleção do laboratório
pSV708	<i>tif51A^{Q22H/L93F}, CEN, TRP1</i>	Coleção do Laboratório
pSV730	<i>dys1-1, CEN, TRP1</i>	Coleção do laboratório
pVZ1040	<i>tif51A^{K56A}, CEN, TRP1</i>	Coleção do Laboratório
p4339	pCRII-TOPO, <i>natMX4</i>	Andrews lab
pSV1345	<i>ASC1, CEN, LEU2</i>	Este trabalho
pSV1346	<i>SNR24, CEN, LEU2</i>	Este trabalho

Tabela 3 - Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.

Oligonucleotídeo	Descrição
<i>TIF51A</i> _F	AAAAATTTTTTCGTCGTCGTCGTCGTCGATCG
<i>TIF51A</i> _R (R2)	GACCCGGCGGGGACGAGGCAAGCTAAACAGATCTTTACACTGC CTGCAATAAGGAAAAAGAAAAG
<i>TIF51A</i> _nat_R4	ATGTGATGGAAGGGGCGTCGGAGTTTTTTTTTCTTTTTTCATTT AGAATTCGAGCTCGTTTTTCGACACTG
<i>natMX4</i> _R (F3)	AGATCTGTTTAGCTTGCCTCGTCC
<i>DYS1</i> _F	CACGAACGAGATTACCATAATATCTCGCCA
<i>DYS1</i> _R (R2)	GACCCGGCGGGGACGAGGCAAGCTAAACAGATCTCTCCAACG CAATTTATGTGTATAAACTTAC
<i>DYS1</i> _nat_R4	ATAGTACAGTTCATTTTTTTTTTTTTTCATCTCAAATTCTCTCAG GAATTCGAGCTCGTTTTTCGACACTG
<i>TIF51A</i> _conf F	CAAGGCCGGTAAAATTCTGC
<i>DYS1</i> _conf F	CAACCAATCAGACAGTTGCG
<i>natMX4</i> _conf R	CCCGGTGGCGGTGACGCG
<i>ASCI</i> <i>prom</i> _F1 (SVO1218)	CGGGATCCAGCCTTATGACTATGTACGG
<i>ASCI</i> _R1 (SVO1223)	TTTAAGTTCCAAGCCTTAACCATTTTGTCGTTACCG
<i>ASCI</i> _F2 (SVO1224)	ACAAAATGGTTAAGGCTTGGAAGTTAAACCAATTCC
<i>ASCI</i> _R2 (SVO1222)	GGAATTCAATGAACTTTATACATATTC
<i>SNR24</i> _R1 (SVO1219)	AATATATCACATACTTTTCACTTTATTTACTTTAG
<i>SNR24</i> _F2 (SVO1220)	AAATAAAGTGAAAAGTATGTGATATATTTTCTTTCC
<i>SNR24</i> _R2 (SVO1221)	GGAATTCCTGTCATTATATCATTTTTG

3.2. Métodos

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

3.2.1. Síntese proteica total *in vivo*

As linhagens de levedura contendo alelos selvagem e mutante do gene *DYSI* foram cultivadas em 10 mL de meio YPD, adicionado de sorbitol 1 M e 2 $\mu\text{Ci/mL}$ de [^3H] leucina (PerkinElmer), até $\text{D.O.}_{600\text{nm}} = 0,5$ a 25°C. Aliquotas das culturas foram recolhidas de hora em hora até 3 horas, as células coletadas por centrifugação a 1.500 xg por 5 minutos e congeladas a - 80°C. Os precipitados celulares foram ressuspensos em uma solução de ácido tricloroacético (TCA) 15% e incubados em gelo durante 15 minutos. As amostras foram aquecidas a 72°C durante 30 minutos, seguido de incubação em gelo por 15 minutos. O precipitado proteico foi obtido por centrifugação a 15.000 xg, a 4°C, por 10 minutos, seguido de quatro lavagens com TCA 10% para remoção da [^3H] leucina livre. Os precipitados finais foram ressuspensos em 100 μL de 0,2 M de NaOH e alíquotas de 50 μL foram utilizadas para determinar a radioatividade incorporada durante a síntese de proteínas, em cintilador Beckman Scintillation Counter (Beckman Coulter). A quantificação de proteínas totais, após precipitação proteica, foi obtida usando o kit BCA Protein Assay (Thermo Scientific), seguindo as recomendações do fabricante. A relação entre os valores obtidos no cintilador e o conteúdo total de proteínas foi calculado para cada amostra separadamente, e os dados apresentados em gráficos obtidos no programa Microsoft Excel.

3.2.2. Perfil polissomal utilizando formaldeído

As linhagens de interesse foram incubadas em 100 mL de YPD e cultivadas na temperatura permissiva até $\text{D.O.}_{600\text{nm}} = 0,6$. As células foram fixadas pela adição de 1% de formaldeído, durante 1 hora, em banho de gelo. O formaldeído foi, então, neutralizado com a adição de 125 mM de glicina, e as células coletadas por centrifugação. A lise celular foi realizada conforme o protocolo de western blot (item 3.2.3) em tampão SALTS (Tris HCl 20mM pH7,5; KCl 50mM; MgCl₂ 10mM; DTT

1mM; coquetel de inibidor de protease) e a quantificação de RNA total do extrato foi realizada por D.O._{260nm}. Cerca de 15 D.Os. foram aplicadas em gradiente de sacarose 10-50%, preparado em tampão de lise no equipamento Gradient Master (Biocomp), seguindo instruções do fabricante. Os gradientes foram centrifugados durante 3 horas, a 39.000 rpm, a 4°C, em rotor Beckman SW41-Ti. Os gradientes foram subsequentemente fracionados através de deslocamento para cima com uma solução de 60% de sacarose (m/v), utilizando um fracionador de gradiente ligado a uma unidade de controle de UV (Amersham), para a determinação contínua da absorbância a 254 nm. As áreas das frações dos perfis polissomais gerados foram quantificadas com o auxílio do software Image J (NIH), utilizando o vale inferior como *baseline*, e mostradas nos gráficos pela relação entre os Polissomos pelos Monossomos (P/M). Por fim, as frações de perfil polissomal foram coletadas e tratadas para purificação das proteínas por TCA, como descrito no item 3.2.1, e analisadas por western blot (item 3.2.3). As autorradiografias obtidas foram escaneadas utilizando ImageScanner III (GE Healthcare). A quantificação das bandas de interesse foram realizadas através do programa ImageQuantTL (GE Healthcare), e os níveis da proteína de interesse foram normalizados pelos níveis da proteína ribossomal Rpl5 (L5). Os valores relativos da proteína de interesse, em cada fração, foram comparados entre as diferentes linhagens analisadas. O gráfico gerado representa o valor médio obtido da triplicata experimental.

3.2.3. Western blot

As linhagens de interesse foram crescidas em meio líquido e temperatura apropriados por 12-16 horas. Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em 250 µL de tampão (Tris HCl pH 7,5 20 mM; DTT 2 mM; PMSF 2 mM; coquetel de inibidor de protease; EDTA 2 mM) e lisadas sob agitação após adição de aproximadamente 5 mg de *glass beads*. O extrato foi clarificado por centrifugação a 15.000 xg, a 4°C, por 15 minutos e a concentração de proteína total foi determinada pelo método de Bradford.

As amostras proteicas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) e transferidas para membrana de nitrocelulose. A membrana foi bloqueada à temperatura ambiente por 60 minutos em

tampão PBST (PBS 1X, 0.25% Tween-20) contendo 5% de leite desnatado, sob agitação. A membrana foi então incubada por 2 horas à temperatura ambiente com uma diluição adequada de anticorpo primário (anti-eIF5A, anti-Rpl5 ou anti-eEF2; anticorpos produzidos no laboratório) em PBST contendo 5% de leite desnatado. Posteriormente, a membrana foi lavada 3 vezes por cinco minutos com PBST. A seguir, a membrana foi incubada por 45 minutos com anti-IgG (anticorpo secundário) de coelho conjugado com peroxidase (Sigma - A 9169), em PBST contendo 5% de leite desnatado. Após três novas lavagens de cinco minutos com PBST, a membrana foi tratada com reagentes quimioluminescentes (ECL-Amersham Biosciences) e exposta a filme autorradiográfico.

3.2.4. Interação genética sintética entre dois mutantes isolados de *S. cerevisiae*

3.2.4.1. Cruzamento

As linhagens haplóides de interesse foram cruzadas em meio YPD e incubadas por uma noite a 25°C. Em seguida, para a seleção dos diplóides foi feita o repasse do crescimento obtido na placa de YPD para a placa de meio seletivo duplo, de acordo com as marcas auxotróficas de cada linhagem. As placas foram incubadas a 25°C até o aparecimento de colônias, as quais foram isoladas e confirmadas através do repasse em meio seletivo.

3.2.4.2. Esporulação

Após seleção adequada dos diplóides, as células foram inoculadas em meio S-SPO líquido (2,5 g de extrato de levedura; 15 g acetato de potássio; 40 mg de adenina, uracila e tirosina; 20 mg de histidina, leucina, lisina, triptofano, metionina e arginina; 100 mg de fenilalanina e 350 mg de treonina em 1 litro de água destilada) e incubadas a 25°C, sob agitação, até a formação de ascos (cerca de 5 a 10 dias).

3.2.4.3. Dissecção

200 µL da cultura submetida à esporulação foram centrifugados, o sobrenadante removido e as células ressuspensas em 100 µL de sorbitol 20%. Em seguida, foram adicionados 1,5 µL de zimoliase (10 µg/µL), e as células incubadas a 37°C por 10 minutos para a quebra de parede do asco. Então, foi adicionado 1 mL de

sorbitol 20% para diluir e consequentemente interromper reação de digestão, e as células ficaram em gelo até o momento da dissecação. A dissecação dos ascos foi realizada utilizando microscópio de dissecação (MSM 400 Singer Instruments), em placa de meio YPD, que posteriormente foi incubada a 25°C até o crescimento dos haplóides, separadamente.

3.2.4.4. Caracterização de tétrades

As marcas de auxotrofia para os haplóides obtidos foram determinadas utilizando diferentes meios de cultura seletivos. O *mating type* foi determinado através do cruzamento com cepa de *mating type* conhecido e seleção dos diplóides em meio seletivo apropriado.

3.2.5. Clonagem empregando Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)

3.2.5.1. Reações de PCR

As reações de PCR foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,5 mL contendo 1 µM de cada oligonucleotídeo (de acordo com o descrito nos Resultados), 40 ng de DNA plasmidial, 1 U da enzima PlatinumPfx (Invitrogen), 1x tampão, 1 mM MgSO₄ e 1 µL de uma mistura de desoxiribonucleotídeos (10 mM cada), num volume final de reação de 50 µL. As condições das reações foram estabelecidas de acordo com a temperatura de hibridização dos oligonucleotídeos utilizados. Após o último ciclo, a reação foi mantida a 72°C por 10 minutos e, a seguir, a 4°C até o momento da próxima etapa. Então, os produtos da reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% em TAE (Tris 40 mM, ácido acético glacial 0,11% e EDTA 1 mM), contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio. Ao DNA foi adicionado tampão de amostra (azul de bromofenol 0,125%, xileno cianol 0,125% e glicerol 50%) e a solução foi aplicada no gel. O gel foi submetido a voltagem de 100 V. O DNA foi visualizado utilizando luz ultravioleta e a imagem documentada utilizando o aparelho AlphaImager 2200 (Alpha Innotech Corporation).

3.2.5.2. Overlap PCR

Fragmentos de PCR, amplificados de acordo com o descrito no item anterior e contendo regiões homólogas, foram submetidos a uma nova reação adicionando 50 ng de cada fragmento, 0,5 U da enzima PlatinumPfx (Invitrogen) 1x tampão, 1 mM

MgSO₄ e 0,5 µL de uma mistura de desoxiribonucleotídeos (10 mM cada), num volume final de 25 µL. Essa reação foi incubada a 94°C por 5 minutos, seguida de 4 ciclos de 94°C por 1 minuto, 53°C por 1 minuto e 72°C por 3 minutos. Ao final dos ciclos, foi adicionado 0,5 U da enzima PlatinumPfx (Invitrogen) 1x tampão, 1 mM MgSO₄, 1 µL de uma mistura de desoxiribonucleotídeos (10 mM cada) e 1 µM dos oligonucleotídeos que hibridizam separadamente nos dois fragmentos com regiões homólogas. A seguir, os tubos foram incubados por 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 50°C por 30 segundos e 72°C por 1,5 minutos. Após o último ciclo, a reação foi mantida a 72°C por 10 minutos e, a seguir, a 4°C até o momento da próxima etapa. Dessa forma, ocorreu a hibridização dos fragmentos amplificados separadamente e, em seguida, o produto gerado foi utilizado como DNA molde para a realização de uma nova reação de PCR.

3.2.5.3. Digestão do inserto e vetor

O produto amplificado foi purificado utilizando o kit QIAquick PCR Purification (QIAGEN) e submetido a digestão com as enzimas necessárias, seguindo as condições recomendadas pelo fabricante (New England Biolabs), por 16 horas a 37°C. O vetor foi também digerido com as mesmas enzimas e os produtos das digestões foram purificados após eletroforese em gel de agarose 0,8%, utilizando o kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN).

3.2.5.4. Reação de ligação

Por fim, foi preparada a reação de ligação num volume de 20 µL final, utilizando tampão apropriado, com um excesso de 10 vezes de inserto em relação ao vetor, e 200 U de T4 DNA ligase. A reação foi então incubada a 16°C por 16 horas e utilizada para transformação bacteriana e obtenção dos clones.

3.2.6. Transformação de bactéria

3.2.6.1. Competência

Uma colônia de *E. coli* foi inoculada em 10 mL de meio LB (extrato de levedura 5 g/L; NaCl 10 g/L; triptona 10 g/L) e incubada a 37°C sob agitação por uma noite. A cultura foi então diluída em 250 mL de meio SOB (triptona 20 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂.4H₂O 10 mM e MgSO₄.7H₂O

10 mM) até atingir D.O._{600nm} 0,6. A cultura foi incubada em banho de gelo por 10 minutos e centrifugada a 2.500xg a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram suspensas em 80 mL de solução TB (Pipes pH 7,0 10 mM, MnCl₂.4H₂O 55 mM, CaCl₂.2H₂O 15 mM e KCl 250 mM) gelada e incubadas no gelo por 10 minutos. As células foram centrifugadas e suspensas em 20 mL de TB gelado adicionado de 1,5 mL de DMSO. As células foram novamente incubadas em gelo por 10 minutos. Para armazenamento, 200 µL de células foram alíquotadas e congeladas a - 80°C.

3.2.6.2. Transformação

As células de *E. coli* competentes estocadas foram descongeladas em banho de gelo. Em um tubo de microcentrífuga foram adicionados 100 µL das células competentes e 50-250 ng de DNA plasmidial ou a reação de ligação. Os tubos foram mantidos em banho de gelo por 30 minutos e submetidos ao choque térmico em banho-maria a 42°C por 2 minutos. A seguir, 1 mL de meio LB líquido foi adicionado ao tubo, o qual foi incubado por 1 hora a 37°C, sob agitação. Finalmente, as células foram plaqueadas em meio seletivo (meio LB contendo ampicilina 50 µg/mL) e incubadas a 37°C até crescimento das colônias.

3.2.7. Isolamento de DNA plasmidial a partir de bactéria

Bactérias contendo os plasmídeos de interesse foram inoculadas em 3 mL de meio seletivo (meio LB contendo ampicilina 50 µg/mL), e incubadas a 37°C por aproximadamente 16 horas, sob agitação constante. A cultura foi centrifugada por 1 minuto a 12.000xg e os plasmídeos foram extraídos e purificados por lise alcalina, utilizando o kit *QIAfilter Plasmid Midi* da QIAGEN, seguindo as orientações do fabricante.

3.2.8. Transformação de leveduras

Uma colônia da levedura desejada foi inoculada em 5 mL de meio adequado e incubada a 25°C sob agitação por toda a noite. 1,5 mL da cultura foram centrifugados na velocidade máxima por 5 segundos. Após descarte do sobrenadante, as células foram lavadas com 1 mL de água estéril, suspensas em 1 mL de solução de acetato de lítio 100 mM e então incubadas por 5 minutos a 30°C. As células foram coletadas por

centrifugação e o sobrenadante foi removido. Foram adicionados, na seguinte ordem: 240 µL de PEG 50%, 36 µL de acetato de lítio 1 M, 25 µL de DNA de esperma de salmão (ssDNA) e 5 µL de DNA plasmidial, completando-se o volume de reação com 45 µL de água. O tubo foi então agitado vigorosamente (vortex) por 1 minuto e incubado a 42°C por 20 minutos. As células foram centrifugadas na velocidade máxima por 10 segundos. Após o sobrenadante ter sido removido, as células foram suspensas em 150 µL de água estéril e então plaqueadas em meio seletivo apropriado. As placas foram incubadas a 25°C até o aparecimento de colônias.

3.2.9. Teste de crescimento por meio de diluição seriada

As leveduras a serem analisadas, foram crescidas a 25°C em 10 mL de meio seletivo até aproximadamente $1-2 \times 10^7$ células/mL. Após centrifugação a 3.000 xg por 10 minutos e remoção do meio de cultura, as células foram ressuspensas na concentração de $2,5 \times 10^8$ células/mL. 200 µL das suspensões foram transferidos para um poço de microplaca e diluídas seriadamente (1:10) em meio líquido apropriado. Utilizando um pipetador multicanal, 4 µL da suspensão original e das diluições foram aplicados nos meios de cultura de interesse. A seguir, as placas foram incubadas nas condições desejadas até a observação de crescimento.

3.2.10. Rastreamento de interação genética sintética utilizando *Synthetic Genetic Array* (SGA)

Para a realização do rastreamento através do SGA é necessário uma linhagem com *background* específico para as análises. Esta linhagem deve conter o gene de interesse, conhecido como gene *query*, fusionado a uma marca de seleção. Ainda, a linhagem deve apresentar nocautes dos genes *CAN1* e *LYPI*, além do repórter *STE2pr-Sp_his5*. Os nocautes são utilizados para seleção de linhagens haplóides, por se tratarem de genes recessivos que irão conferir resistência a canavanina e tialisina, respectivamente. Por fim, o repórter *STE2pr-Sp_his5* permitirá o crescimento da linhagem de *mating type* A em meio de cultura sintético sem histidina.

3.2.10.1 Construção das linhagens para o rastreamento (linhagem *query*)

3.2.10.1.1. Reação de PCR

O gene de interesse (gene *query*) juntamente com o cassete de resistência a nourseotricina (*natMX4*) foram amplificados por PCR de acordo com o descrito no item 3.2.5.1. Um esquema do procedimento de obtenção da linhagem *query* está apresentado na Figura 5. Os fragmentos foram então purificados e utilizados para transformação da linhagem com *background* específico para gerar a linhagem *query*.

3.2.10.1.2. Transformação da linhagem

A linhagem BY7092, a qual apresenta as marcas necessárias para a realização do rastreamento, foi crescida em meio líquido até atingir a D.O. $_{600\text{nm}} = 1.5$. Em seguida, 1 mL da cultura foi coletada e lavada, por duas vezes, com 100 mM de acetato de lítio (LiAC). Após centrifugação, as células foram ressuspensas em 500 μL de LiAC 100 mM adicionado de 1 mg/mL de ssDNA. A seguir, a cada alíquota de 100 μL da suspensão de células foram adicionados 5 μL do produto de PCR de cada mutante ou do selvagem, separadamente, e do cassete de nourseotricina (*natMX4*) e incubados a 30°C por 15 minutos. A cada alíquota, 500 μL da solução de LiAC e Polietilenoglicol (LiAC 100 mM + PEG 50%) foram adicionados e os tubos incubados a 30°C por 1,5 horas. Então, 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionado e as reações de transformação foram aquecidas a 42°C por 15 minutos. Por fim, após centrifugação, as células foram ressuspensas em meio líquido (YPD) e incubadas a 30°C por 4 horas e então plaqueadas em meio YPD contendo nourseotricina (100 $\mu\text{g/mL}$) para selecionar apenas as células de interesse, isto é, contendo o gene selvagem ou mutante fusionado ao cassete de resistência à nourseotricina.

3.2.10.1.3. Confirmação da obtenção da linhagem *query*

As linhagens selecionadas no item anterior foram crescidas e testadas quanto a sensibilidade a temperatura, de acordo com o descrito no item 3.2.9. Ainda, o DNA genômico da linhagem *query* foi isolado (Master Pure Kit, Epicentre) e reação de PCR realizada para confirmação da inserção do gene *query* e do *natMX4* no correto *locus* do gene de interesse.

3.2.10.2. Rastreamento genético utilizando SGA

Os rastreamentos genéticos por meio do SGA foram realizados conforme descrito anteriormente (Baryshnikova *et al.* 2010a). Resumidamente, cada linhagem *query* foi individualmente cruzada, em meio YPD, com todas as linhagens das seguintes coleções: 1- coleção de linhagens nocautes ou 2- coleção de linhagens de mutantes condicionais sensíveis a temperatura (ts). Os diplóides foram selecionados e incubados para induzir a esporulação. Após esporulação, os haplóides contendo o gene *query* e cada gene, individualmente, das coleções (gene *array*) foram selecionados (Figura 6). Em seguida, imagens das placas com o crescimento dos haplóides duplo mutantes (gene *query* + gene *array*) foram adquiridas. Por fim, as imagens foram analisadas por meio do Software SGA Tools e as interações genéticas identificadas (Figura 7).

3.2.10.3. Análise dos dados

As análises dos dados obtidos nos rastreamentos por SGA foram realizados conforme descrito anteriormente (Wagih *et al.* 2013). Resumidamente, as imagens das placas foram geradas utilizando o S&P Imager e inicialmente analisadas através do software SGA Tools. Nesta análise, o *fitness* dos duplos mutantes (gene *query* + gene *array*) foi normalizado com o *fitness* da linhagem controle, a qual contém apenas o gene *array*. Após normalização, foi gerado um valor de crescimento baseado no tamanho e nos pixels de cada colônia, o qual foi chamado de SGA *score*. Esta análise foi realizada utilizando quadruplicatas biológicas em cada rastreamento realizado. Então, os valores acima de 0,2 ou abaixo de - 0,2 foram utilizados para identificar interações genéticas positiva (melhora no crescimento) ou interações genéticas negativas (piora no crescimento), respectivamente (Figura 7). Por fim, as interações identificadas, conhecidas como *hits*, foram confirmadas por um novo rastreamento. Após confirmação, foi realizada análise da ontologia genética das interações (GO), as quais utilizam as classificações do banco de dados de *S. cerevisiae* (*Saccharomyces Genome Database*, SGD). Em seguida, foram gerados *heat maps*, utilizando os softwares Gene Cluster 3.0 e Java TreeView, com os genes pertencentes a uma mesma ontologia genética, os quais apresentam as interações genéticas sintéticas negativas em escala de vermelho, de acordo com a intensidade da interação, e em escala de verde para as interações genéticas sintéticas positivas.

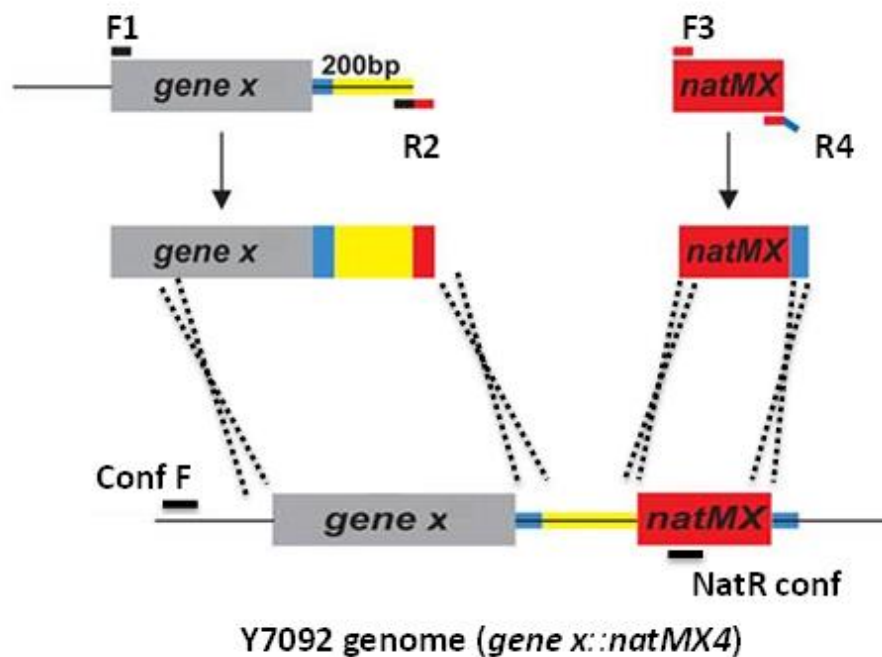


Figura 5. Esquema representativo da construção e confirmação da linhagem *query*. A amplificação dos genes por PCR, através de duas etapas, foi utilizada para a construção da linhagem por recombinação homóloga. Os oligonucleotídeos indicados foram utilizados para amplificação dos genes mutantes ou selvagem (F1 e R2) e do cassette de nourseotricina (F3 e R4). A linhagem BY7092 foi cotransformada e, através da recombinação homóloga, o gene mutado ou selvagem foi fusionado ao cassette de nourseotricina (*natMX*) e inserido no *locus* gênico correspondente. A correta inserção foi confirmada por PCR através da utilização dos oligonucleotídeos Conf F e NatR conf. Neste trabalho, o gene x representa o gene que codifica para eIF5A ou Dys1, mutantes e selvagens (Adaptado de (Tong e Boone 2006)).

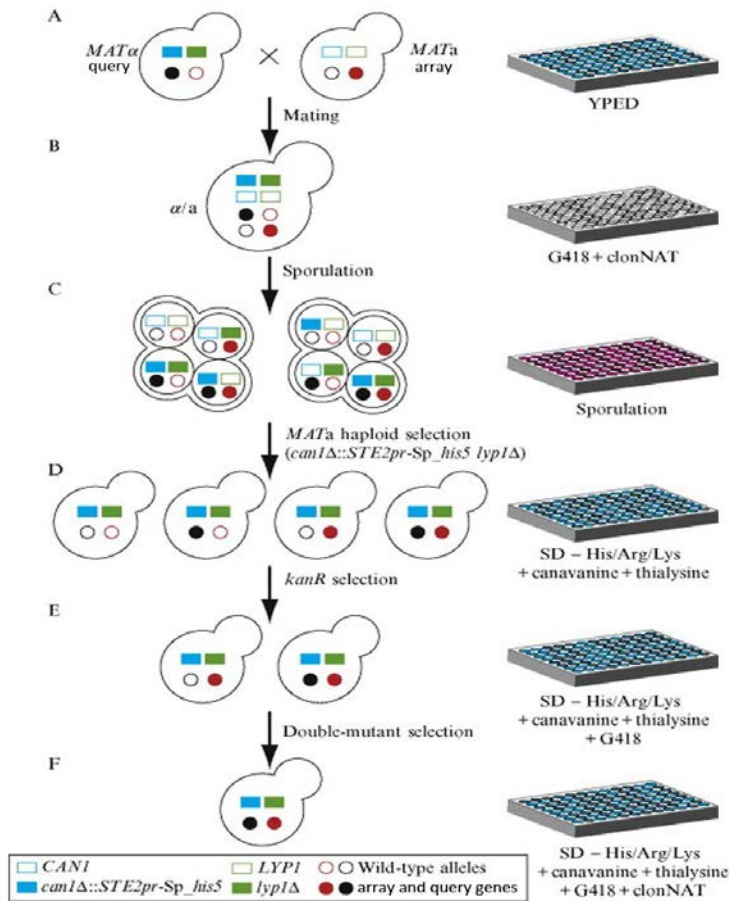


Figura 6. Esquema ilustrativo da metodologia *Synthetic Genetic Array* (SGA). (A) A linhagem contendo o gene *query* (círculo preto cheio) fusionado a marca de resistência a nourseotricina, *natMX4*, e os repórteres para o SGA *Δcan1*, *Δlyp1* e *STE2pr-Sp_his5*, conferindo, respectivamente, resistência à canavanina, tialisina e permitindo o crescimento na ausência de histidina foi cruzada com uma coleção (gene *array*). Nesta coleção, cada gene individualmente (círculo vermelho cheio) apresenta a marca de resistência à geneticina (G418). (B) O diplóide heterozigoto resultante foi replicado para um meio com baixa concentração de fontes de carbono e nitrogênio para induzir a formação dos esporos. (C) Os esporos foram transferidos para um meio sintético sem histidina, com canavanina e tialisina permitindo, desta forma, a seleção dos haplóides de *mating type* A. (D e E) Os esporos selecionados anteriormente foram transferidos para um meio contendo nourseotricina (clonNAT) e geneticina (G418) selecionando assim as linhagens haplóides duplo mutantes, contendo os genes *query* e *array* (Baryshnikova *et al.* 2010b).

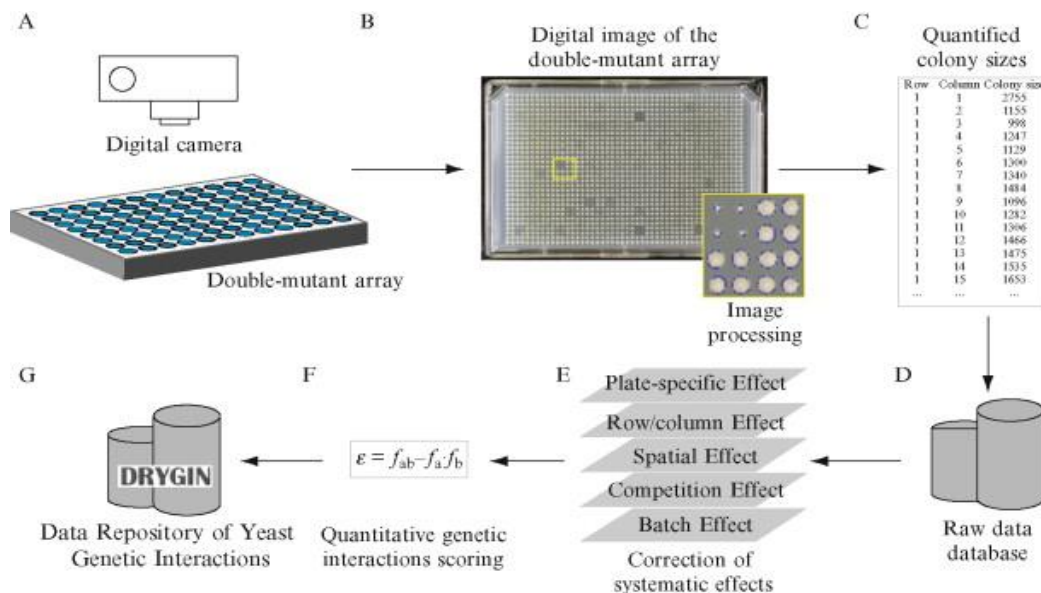


Figura 7. Esquema representativo das análises dos dados obtidos pelo SGA. (A) As placas contendo os haplóides duplo mutantes ou o gene *query* selvagem foram fotografadas com uma câmera de alta resolução. (B e C) As imagens digitalizadas foram analisadas por um software gerando os valores de crescimento para cada uma das colônias das placas (*SGA score*). (D, E e F) As imagens foram armazenadas, analisadas e normalizadas em comparação ao selvagem e então foi gerado o *SGA score* final das interações genéticas para cada um dos haplóides duplo mutantes. (G) As interações identificadas foram armazenadas e os dados visualizados através de *heat maps* (Baryshnikova *et al.* 2010b).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização do mutante da enzima desoxi-hipusina sintase *dys1-1*

Uma vez que eIF5A e as enzimas modificadoras de levedura e de mamífero são altamente conservadas e que em levedura a primeira etapa da modificação pós-traducional de eIF5A é a única essencial, foi gerado em nosso laboratório, o mutante condicional da enzima responsável pela primeira etapa desta modificação, Dys1 em *S. cerevisiae*, conhecido como *dys1-1*. Esse mutante foi inicialmente caracterizado durante o meu Mestrado, o qual revelou possuir diminuição dos níveis de eIF5A hipusinada e, conseqüentemente, na função da proteína na célula.

O presente estudo teve como objetivo inicial o aprofundamento da caracterização fenotípica desse mutante e da caracterização funcional de eIF5A por meio da sua utilização em análise genética sintética.

4.1.1. Avaliação do perfil polissomal do mutante *dys1-1*

Uma vez demonstrado que diferentes mutantes condicionais de eIF5A apresentam alterações no perfil polissomal quando na temperatura não permissiva de crescimento e que a atuação deste fator está relacionada a etapa da elongação da tradução (Gregio *et al.* 2009; Saini *et al.* 2009), ao invés da etapa do início da tradução, como anteriormente descrito (Benne e Hershey 1978), decidiu-se analisar o perfil polissomal do mutante *dys1-1* na condição permissiva de crescimento.

Para isso, as linhagens de interesse foram incubadas nas condições ideais de crescimento e tratadas conforme descrito no item 3.2.2. Como mostrado na Figura 8A, o mutante *dys1-1* apresentou um aumento na quantidade de polissomos em relação aos monossomos, fenótipo relacionado a defeitos na etapa da elongação da tradução. Este defeito apresentado pelo mutante *dys1-1* corrobora com o que está descrito para os mutantes condicionais de eIF5A (Gregio *et al.* 2009; Saini *et al.* 2009), uma vez que a função de eIF5A esta intimamente relacionada à hipusinação da proteína (Schnier *et al.* 1991). Ainda, as análises das frações polissomais do mutante *dys1-1* revelaram uma diminuição da ligação de eIF5A com os polissomos (Figura 8B e C).

4.1.2. Análise da síntese proteica total

Da mesma forma como as alterações no perfil polissomal, mutantes condicionais de eIF5A também apresentam defeitos nos níveis de síntese proteica total quando na condição restritiva de crescimento (Gregio *et al.* 2009; Saini *et al.* 2009). Para analisar se o mesmo acontece com o mutante *dys1-1*, as linhagens de interesse foram crescidas na condição permissiva e, então, o aminoácido marcado radioativamente [³H] leucina foi adicionado ao meio de cultura para ser incorporado nas proteínas sintetizadas a partir do momento da adição do radioisótopo (3.2.1.). Conforme observado na Figura 9, o mutante *dys1-1* apresenta uma drástica redução, em torno de 50%, nos níveis totais de síntese proteica na célula, provavelmente devido a redução de 60% nos níveis de hipusinação de eIF5A apresentada pelo mutante. Estes resultados demonstram que defeitos relacionados à hipusinação de eIF5A acarretam em danos na síntese proteica total, mais especificamente na etapa da elongação da tradução, corroborando com os resultados anteriormente descritos para mutantes condicionais de eIF5A (Gregio *et al.* 2009; Saini *et al.* 2009).

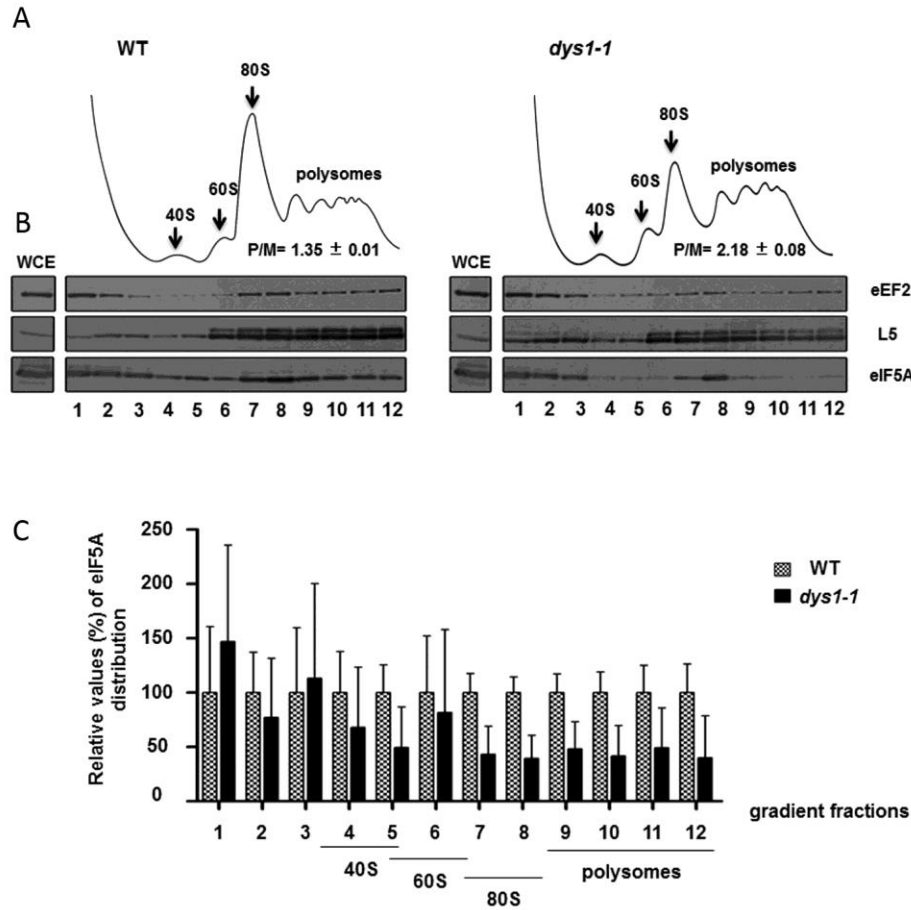


Figura 8. Caracterização do perfil polissomal do mutante *dys1-1* e análise da ligação de eIF5A nos polissomos. (A) Extratos totais das linhagens indicadas foram fracionados por centrifugação em gradiente de sacarose. Os gráficos representam a leitura de absorbância a 254nm dos gradientes. (B) As frações do perfil polissomal foram coletadas e precipitadas por TCA para ensaio de western blot. As proteínas eEF2 e L5 foram utilizadas como controle do ensaio. (C) Quantificação dos níveis de eIF5A nas frações do perfil polissomal normalizados por L5.

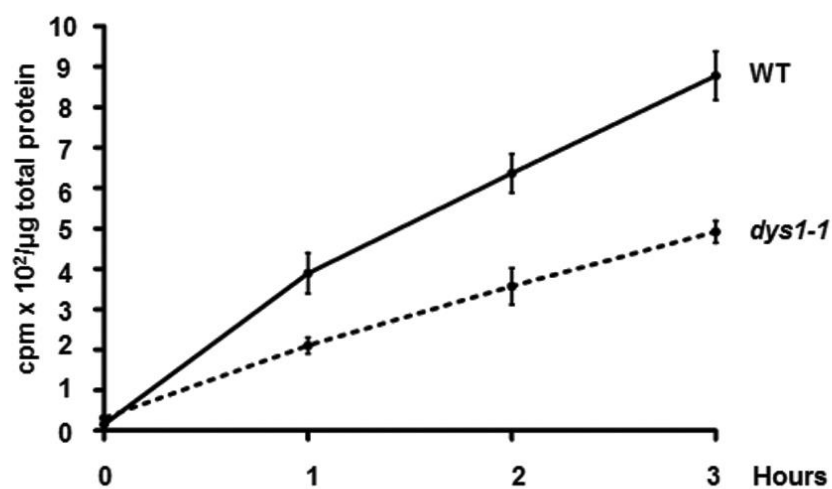


Figura 9. Determinação dos níveis de síntese proteica total do mutante *dys1-1*. As linhagens descritas acima foram crescidas na presença de [³H] leucina, de acordo com o descrito em Materiais e Métodos. A incorporação do aminoácido radioativo foi determinada e os resultados estão apresentados como cpm/μg de proteína total.

4.2. Identificação de interações genéticas envolvendo eIF5A e dirigidas por hipóteses

4.2.1. Análise de interação genética sintética do mutante *dys1-1* com mutantes do gene *ASC1*

Em uma análise da expressão gênica diferencial em nível traducional, realizada por meio de análise bidimensional (2D-DIGE) em nosso laboratório, utilizando o mutante *dys1-1*, foi observado aumento da expressão da proteína Asc1 no mutante em comparação com a linhagem selvagem (Dra. Danuza Rossi, dados não publicados). Asc1 é um componente da subunidade 40S do ribossomo (Gerbasi *et al.* 2004) e por ser, da mesma forma que eIF5A, uma proteína amplamente relacionada com o controle traducional e apresentar interação genética com Pkc1 (Valentini *et al.* 2002; Melamed *et al.* 2010), decidiu-se analisar a possibilidade de interação genética entre Asc1 e Dys1.

Curiosamente, *ASC1*, o qual é homólogo estrutural de *RACK1* de mamífero, apresenta um íntron, *SNR24*, que codifica um pequeno RNA nucleolar denominado U24, o qual já foi relacionado com a maturação do 60S e, consequentemente, com o controle da tradução (Kiss-László *et al.* 1996; Chantrel *et al.* 1998; Gerbasi *et al.* 2004). Apesar de *ASC1* e *SNR24* serem relacionados a diversos processos celulares, não são genes essenciais em levedura, o que torna possível suas deleções. Assim, diferentemente do que era descrito anteriormente, foi possível mostrar que os defeitos observados no perfil polissomal do nocaute de *ASC1* na verdade é devido ao nocaute conjunto com o seu íntron *SNR24* (Kouba *et al.* 2012).

Para analisarmos a possibilidade de interação genética sintética entre o mutante *dys1-1* e mutantes de *ASC1*, excluindo a interferência de *SNR24*, fez-se necessário a clonagem dos genes que codificam para Asc1 e para U24 separadamente. Esta clonagem foi realizada em duas etapas, sendo necessária a realização da *overlap* PCR. Como mostra a Figura 10, foram realizadas reações de PCR, inicialmente, para obtenção dos dois éxons do *ASC1* (região promotora e éxon 1 de *ASC1*, e éxon 2 de *ASC1*) e para a obtenção da região promotora do gene *ASC1* e o éxon do gene *SNR24* (íntron de *ASC1*), separadamente. Para isso, reações de PCR, independentes, foram realizadas utilizando os seguintes oligonucleotídeos: 1- SVO1218 + SVO 1223 para amplificação da região promotora de *ASC1* juntamente com o primeiro éxon, 2- SVO1224 + SVO 1222 para o segundo éxon de *ASC1*, 3- SVO1218 + SVO 1219 para a

amplificação da região promotora de *ASCI* e 4- SVO1220 + SVO 1221 para o gene *SNR24* (íntron de *ASCI*). Uma vez que os oligonucleotídeos SVO1223/SVO1224 e SVO1219/SVO1220 apresentam regiões complementares, uma nova etapa foi realizada para hibridização destas regiões, gerando, dessa forma, o molde completo para amplificação dos fragmentos desejados, o que possibilitou a clonagem de *ASCI* e de *SNR24* separadamente. Como podemos observar na Figura 11A, é possível observarmos a amplificação dos fragmentos separados com o tamanho esperado e após a *overlap* PCR podemos observar a amplificação dos fragmentos de interesse unidos (Figura 11B). Por fim, a correta clonagem dos fragmentos foi confirmada por diagnóstico de restrição (Figura 11C).

Ainda, para as análises genéticas, foi necessária a geração da linhagem contendo o mutante *dys1-1* e o nocaute de *ASCI*. Por fim, devido à severidade e alta taxa de surgimento de revertentes observados para o mutante *dys1-1* (resultados não mostrados), foi necessário realizar a substituição plasmidial do alelo selvagem pelo alelo mutante, por *plasmid shuffle*, após geração dos haplóides de interesse. O *plasmid shuffle* consiste na utilização do mecanismo natural de perda plasmidial, através da utilização da toxicidade do ácido 5 fluororótico (5-FOA) nas linhagens contendo o gene *URA3*, o qual converte o 5-FOA em um produto altamente tóxico, selecionando desta forma linhagens que não contem plasmídeos com a marca auxotrófica *URA3*. Para tanto, o haplóide contendo o duplo nocaute nos genes *ASCI* e *DYS1* (coberto com o plasmídeo *DYS1, URA3*) foi gerado utilizando as linhagens SVL453 *dys1::HIS3* [*DYS,CEN,URA3*] e VZL1133 *asc1::kanMX4*, conforme descrito no item 3.2.4. Os esporos de interesse foram selecionados na presença de geneticina (G418) e na ausência de histidina e uracila. O haplóide foi então transformado com os plasmídeos de interesse e, após seleção dos transformantes, foi realizada a troca plasmidial (*plasmid shuffle*) do alelo coberto com o plasmídeo *DYS1, URA3* para o plasmídeo transformado (pSV730-*dys1-1, TRP1* ou pSV520- *DYS1, TRP1*), gerando desta forma a linhagem de interesse para ser analisada. Para distinguirmos se a interação observada seria pela ausência somente de *ASCI* ou do seu íntron (gene *SNR24*), a linhagem foi complementada com os plasmídeos contendo apenas *ASCI* (pSV1345) ou *SNR24* (pSV1346). Conforme observado na Figura 12, quando na ausência de *ASCI* o mutante *dys1-1* não é viável, ou seja, apresenta letalidade sintética. Além disso, não foi possível observar nenhum defeito de crescimento

quando na ausência de *SNR24*, demonstrando, dessa forma, letalidade sintética apenas com *ASC1*. Com isso, é possível sugerir que os níveis normais da hipusinação de eIF5A na célula é necessário para seu crescimento quando na ausência de *ASC1* e que devido a isso, ambas proteínas podem atuar de maneira conjunta na etapa da tradução.

Conforme mostrado no item 4.1, o mutante *dys1-1* apresenta defeito característico da etapa da elongação da tradução no perfil polissomal, e pelo nocaute de *ASC1* apresentar letalidade sintética quando eIF5A não está hipusinada por completo, decidiu-se analisar se a ausência de *ASC1* também interfere nesta ligação de eIF5A com os polissomos. Para isso, foi realizado o perfil polissomal da linhagem contendo ou não *ASC1* e analisado, da mesma forma como descrito para item 4.1.1, a ligação de eIF5A nos polissomos. Como mostra a Figura 13, diferentemente do que foi observado para o mutante *dys1-1*, na ausência de *ASC1* ocorre um aumento da ligação de eIF5A nos polissomos, o que, juntamente com os demais resultados, levou a conclusão de que seja necessário um equilíbrio entre eIF5A hipusinada e Asc1 na célula durante o processo da tradução e que este aumento da ligação de eIF5A quando na ausência de Asc1 pode ser um mecanismo compensatório para a manutenção da tradução de alguns mRNA dos quais Asc1 atuaria durante o processo da tradução. Para confirmar estes resultados, foi analisado se a interação genética observada entre *DYS1* e *ASC1* se dá de maneira dependente da ligação de Asc1 no ribossomo. Para isso, foram gerados por mutação sítio-dirigida, dois mutantes de Asc1 (*asc1*^{R38D,K40E} e *asc1*^{D109Y}) que apresentarem defeito apenas na ligação de Asc1 com os ribossomos (Coyle *et al.* 2009; Kuroha *et al.* 2010). De acordo com o que podemos observar na Figura 14, o mutante *dys1-1* também apresenta letalidade sintética com os mutantes de Asc1 com defeito na ligação com o ribossomo, corroborando com a idéia de que a função eIF5A hipusinada e Asc1 são essenciais para o mecanismo da tradução. Estes resultados, além dos descritos no item anterior deram origem ao artigo publicado na revista Plos One intitulado “The deoxyhypusine synthase mutant *dys1-1* reveals the association of eIF5A and Asc1 with cell wall integrity” (Galvão *et al.* 2013, Anexo I).

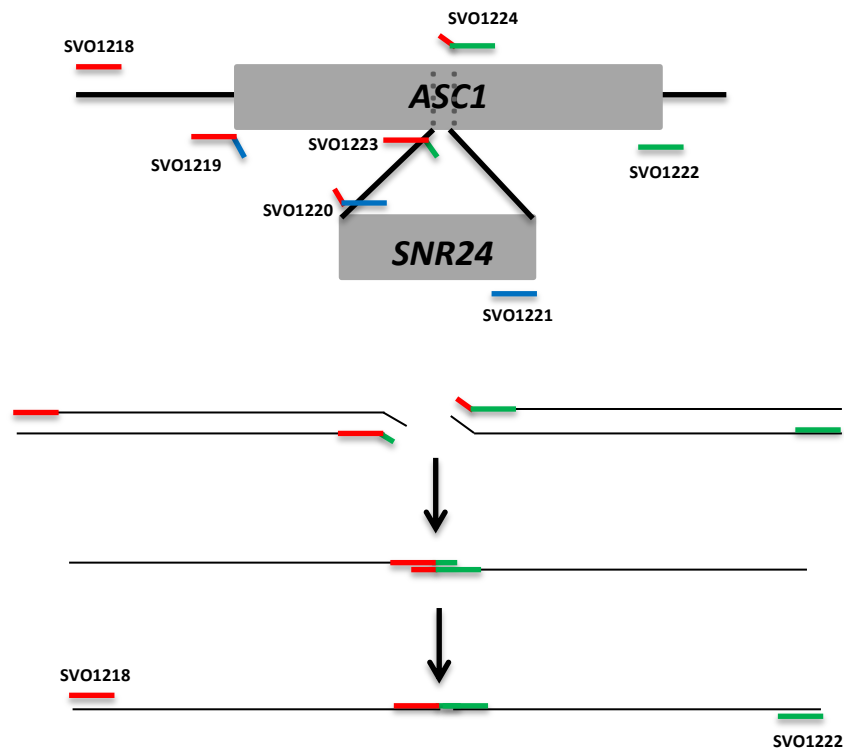


Figura 10. Esquema representativo da *overlap* PCR utilizada para clonagem dos genes *ASC1* e *SNR24*, contido no íntron de *ASC1*, separadamente. A amplificação dos fragmentos foram realizadas separadamente. Os oligonucleotídeos indicados foram utilizados para amplificação do éxon1 (SVO1218 e SVO1223) e do éxon 2 de *ASC1* (SVO1224 e SVO1222). Para amplificação de *SNR24* foram utilizados os oligonucleotídeos SVO1218 e SVO1219 para a região controladora e para o gene foram utilizados SVO1220 e SVO1221. Para a união dos fragmentos uma nova reação de PCR foi realizada, ocorrendo a hibridização dos fragmentos complementares e a consequente amplificação. A parte inferior do esquema ilustra a amplificação de *ASC1*, sem o seu íntron.

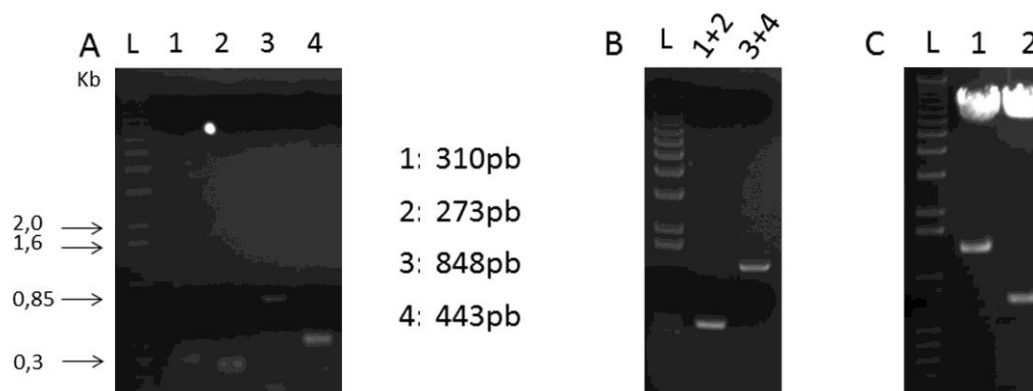


Figura 11. Amplificação e clonagem por *overlap* PCR dos genes *ASC1* e seu íntron *SNR24*. (A) Fragmentos da PCR de *ASC1* e *SNR24*. L: padrão de tamanho molecular (ladder), canaleta 1: região promotora de *ASC1*, canaleta 2: *SNR24*, canaleta 3: região promotora e éxon1 *ASC1* e canaleta 4: éxon2 *ASC1*. (B) L: padrão de tamanho molecular, canaleta 1: fragmento de *overlap* contendo a região promotora de *ASC1* e *SNR24* e canaleta 2: fragmento de *overlap* contendo a região promotora, o éxon 1 e o éxon 2 de *ASC1*. (C) Confirmação por diagnóstico de restrição da clonagem no vetor pSV59. L: padrão de tamanho molecular, canaleta 1: linearização do vetor e liberação do inserto de *ASC1* (região promotora, éxon 1 e éxon 2 do gene *ASC1*) e canaleta 2: linearização do vetor e liberação do inserto de *SNR24* (região promotora do gene *ASC1* e o gene *SNR24*). As enzimas utilizadas foram *Bam*HI e *Eco*RI.

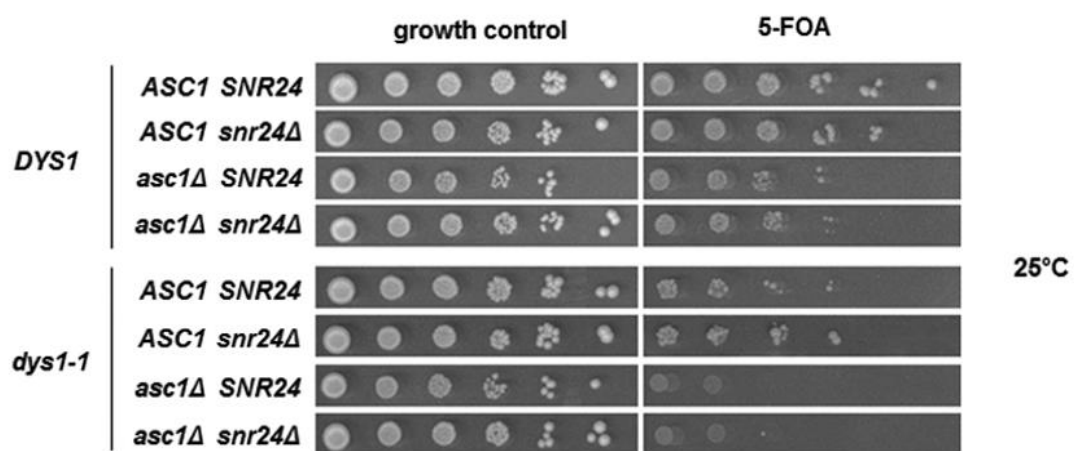


Figura 12. Avaliação da interação genética sintética entre *DYS1* e *ASC1*. As linhagens selvagem (*DYS1*) e mutante *dys1-1*, contendo os genes *ASC1* e *SNR24*, juntamente ou individualmente, bem como na ausência de ambos, foram crescidas, diluídas seriadamente e plaqueadas na presença ou ausência de 5-FOA para realização do *plasmid shuffle* e detecção da interação genética sintética.

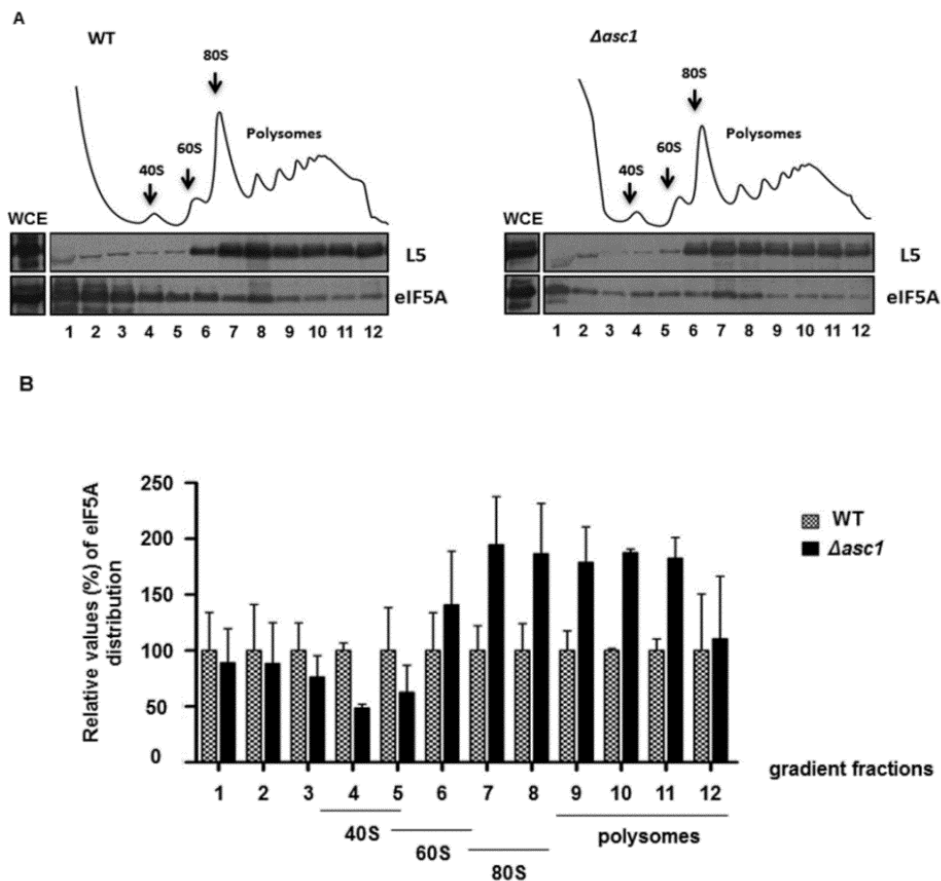


Figura 13. Caracterização do perfil polissomal do nocaute do gene *ASC1* ($\Delta asc1$) e análise da ligação de eIF5A nos polissomos. (A) Extratos totais das linhagens indicadas foram fracionados por centrifugação em gradiente de sacarose. Os gráficos representam a leitura de absorbância a 254nm dos gradientes. As frações do perfil polissomal foram coletadas e precipitadas por TCA para ensaio de *western blot*. A proteína L5 foi utilizada como controle do ensaio. (B) Quantificação dos níveis de eIF5A nas frações do perfil polissomal.

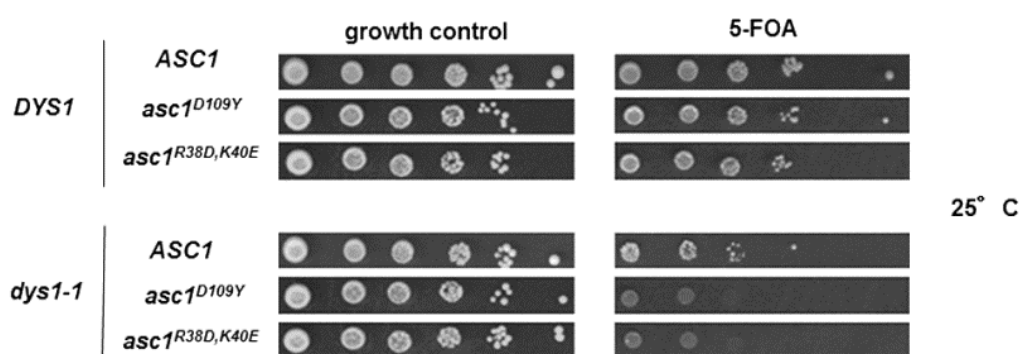


Figura 14. Avaliação da interação genética sintética entre *DYS1* e mutantes de *ASC1* com defeito na ligação ao ribossomo. As linhagens indicadas contendo *ASC1* selvagem e dois mutantes que apresentam defeito na ligação com o ribossomo (*asc1^{D109Y}* e *asc1^{R38D,K40E}*) foram crescidas, diluídas seriadamente e plaqueadas na presença ou ausência de 5-FOA para realização do *plasmid shuffle* e detecção da interação genética sintética.

4.2.2. Análise de interação genética do mutante *tif51A-1* com mutantes de genes relacionados à via secretória (*SEC65*, *SEC61* e *SEC62*)

Dados obtidos em nosso laboratório correlacionaram eIF5A com a via secretória em *S. cerevisiae*. Neste estudo, o gene *YPT1*, o qual é essencial e atua na fusão das vesículas do retículo endoplasmático (RE) ao complexo de Golgi (Segev 2001), foi identificado como letal sintético com um mutante condicional de eIF5A (*tif51A-3*). Ainda, foi observado que eIF5A se liga a frações de membrana, porém não atua diretamente no transporte vesicular. Além disso, ficou evidente que a participação de eIF5A nesta via não se dá de maneira geral, pois mutantes de eIF5A não apresentaram defeito no processamento de CPY, protease que é translocada exclusivamente pela via pós-traducional da via secretória (Frigieri *et al.* 2007; Frigieri *et al.* 2008).

A via secretória, cuja função é direcionar proteínas para sofrerem modificações pós-traducionais em compartimentos celulares (ex. RE), além do direcionamento de proteínas para o brotamento e consequentemente crescimento polarizado, é dividida em duas vias. Estas, conhecidas como via pós-traducional e via co-traducional, se diferem pela maneira pela qual ocorre a translocação das proteínas. Na via pós-traducional, ou via independente de SRP (*Signal Recognition Particle*), ocorre a síntese da cadeia polipeptídica e chaperonas são necessárias para manter o peptídeo desnaturado no citoplasma até que este seja translocado ao lúmen do RE. Isto ocorre por meio do translocon formado por Sec61 e Sec62/63 (Chirico *et al.* 1988; Caplan *et al.* 1992). Alternativamente, a translocação de proteínas pode ser realizada por meio da via co-traducional. Nesta, a síntese da cadeia polipeptídica ocorre concomitantemente à translocação, e é mediada pelo complexo SRP, o qual se liga ao peptídeo nascente através de uma sequência sinal e promove a parada da síntese protéica. Após a ligação de SRP ao translocon Sec61, a síntese da cadeia polipeptídica é retomada e ocorre a sua translocação para o lúmen do RE. Em *S. cerevisiae*, esta via é dependente do complexo SRP, o qual é formado pelas seguintes subunidades: Srp21, Srp14, Sec65, Srp54, Srp68 e Srp72. (Mason *et al.* 2000; Rapoport *et al.* 1999; Keenan *et al.* 2001). A Figura 15 apresenta um esquema simplificado dessas duas vias de translocação de proteínas para o RE (Rossi *et al.* 2014).

Uma vez excluída a participação de eIF5A na via pós-traducional, já que mutantes de eIF5A não apresentam defeitos no processamento de CPY, bem como de outros repórteres testados (Frigieri *et al.* 2008; Rossi *et al.* 2014), fez-se necessário testar a correlação entre eIF5A e os fatores que atuam na via co-traducional. Para tanto, foram selecionados mutantes condicionais de *SEC62* (*sec62-ts*), *SEC65* (*sec65-1*) e *SEC61* (*sec61-2*), os quais atuam, respectivamente, na via pós-traducional, na via co-traducional ou em ambas (Figura 15). Estes mutantes foram então, da mesma forma que descrito anteriormente, cruzados com o mutante *tif51A-1* coberto com *TIF51A* em plasmídeo *URA3*, os diploides foram selecionados, e seguiu-se para a seleção do haploide de interesse de acordo com o descrito no item 3.2.4. Esses haplóides, cobertos com *TIF51A*, *URA3* foram então transformados com o plasmídeo *TIF51A*, *LEU*, *CEN* (pSV 146) ou com o plasmídeo vazio (pSV59) e foram submetidos ao ensaio de *plasmid shuffle*. Como mostra a Figura 16, foi possível identificar interação genética sintética negativa com o mutante que atua exclusivamente na via co-traducional, *sec65-1*. Além disso, o mutante *sec61-2*, o qual apresenta defeito tanto na via co-traducional quanto na via pós-traducional também apresentou interação genética negativa quando combinado com o mutante *tif51A-1*. Por fim, o mutante *sec62-ts*, o qual apresenta defeitos exclusivos na via pós-traducional, quando combinado com o alelo mutante *tif51A-1* não apresentou nenhuma alteração no crescimento celular. Estes resultados de interação genética apontam para um envolvimento de eIF5A exclusivo na via co-traducional. Estes resultados em conjunto com a supressão do fenótipo de sensibilidade a temperatura do mutante *tif51A-1* pelo complexo SRP, os defeitos no processamento de proteínas pela via co-traducional e na ligação entre o peptídeo nascente com o complexo SRP no mutante *tif51A-1* deram origem ao artigo intitulado “eIF5A has a function in the cotranslational translocation of proteins into the ER”, publicado na revista *Amino Acids* (Rossi *et al.* 2014, Anexo II).

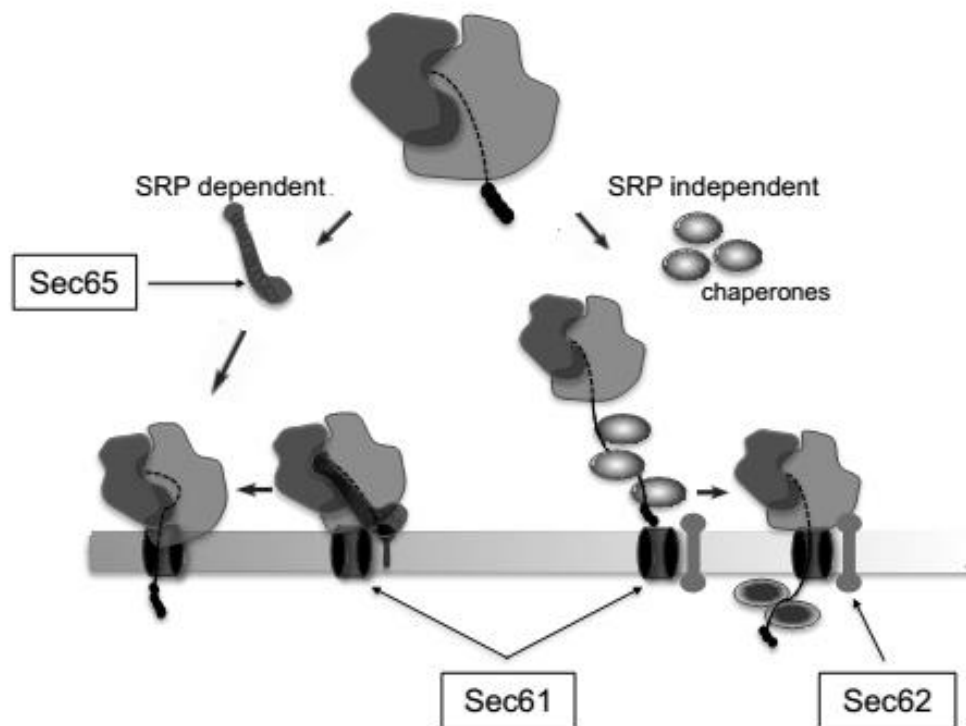


Figura 15. Esquema simplificado da translocação de proteínas para o retículo endoplasmático. O esquema representa os genes utilizados na análise de interação genética com o mutante *tif51A-1*, ilustrando a via dependente de SRP (via co-traducional) e a via independente de SRP (via pós-traducional).

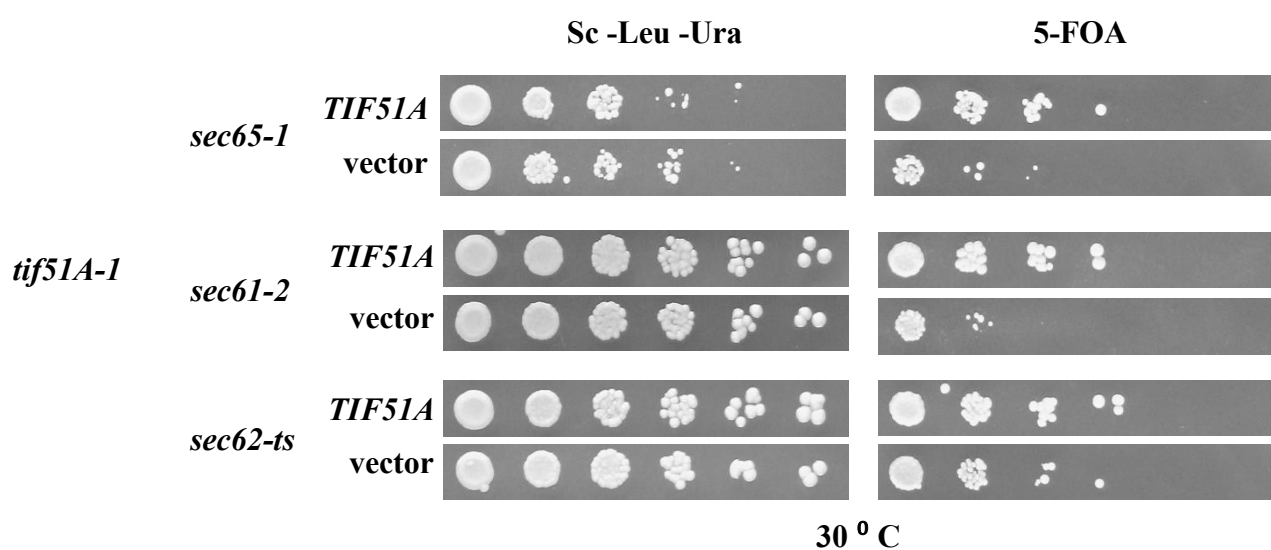


Figura 16. Avaliação da interação genética sintética entre *tif51A-1* e os mutantes *sec65-1*, *sec61-2* e *sec62-ts*, relacionados à via secretória. As linhagens indicadas, contendo o gene selvagem *TIF51A* ou o vetor vazio, foram crescidas, diluídas seriadamente e plaqueadas na presença ou ausência de 5-FOA para realização do *plasmid shuffle*. Em seguida, foram incubadas na temperatura permissiva de crescimento (30°C) por 3 dias.

4.3. Rastreamento de novas interações genéticas envolvendo eIF5A

Com o intuito de melhorar o entendimento da função de eIF5A, foi realizada a caracterização das interações genéticas de eIF5A em larga escala, utilizando mutantes deste fator e de sua enzima modificadora Dys1. A utilização de diversos mutantes se deve ao fato que além de eIF5A ter sido relacionada a várias funções celulares no passado, os mutantes utilizados nos rastreamentos apresentam diferenças na severidade e nos defeitos apresentados (Valentini *et al.* 2002; Dias *et al.* 2008). Portanto, foram selecionados 4 mutantes do gene que codifica para eIF5A e um mutante do gene *DYS1*, que codifica uma das enzimas para a modificação pós-traducional essencial de eIF5A. Para eIF5A, foram selecionados os alelos *tif51A-1*, *tif51A-3*, *tif51A*^{K56A} e *tif51A*^{Q22H/L93F}. Os alelos *tif51A-1* e *tif51A-3* foram gerados por mutagênese química em uma busca por genes relacionados ao transporte nucleocitoplasmático, sendo posteriormente identificados como mutantes para eIF5A (Sadler *et al.* 1989; Valentini *et al.* 2002). Diferentemente os alelos *tif51A*^{K56A} e *tif51A*^{Q22H/L93F} foram gerados por mutação sítio-dirigida e por PCR mutagênica, respectivamente (Dias *et al.* 2008). Diferenças fenotípicas foram descritas para estes mutantes, sendo os alelos condicionais *tif51A-1* e *tif51A-3* os mais sensíveis ao aumento de temperatura e que apresentam diminuição nos níveis de eIF5A total quando na temperatura restritiva de crescimento (Valentini *et al.* 2002). Por outro lado, os alelos condicionais *tif51A*^{K56A} e *tif51A*^{Q22H/L93F} além de serem mais resistente ao aumento de temperatura, não apresentam diminuição nos níveis de eIF5A total quando na temperatura restritiva de crescimento (Dias *et al.* 2008). No caso do mutante condicional *dys1-1*, gerado por mutação sítio-dirigida, apresenta diminuição nos níveis de eIF5A hipusina, sendo então utilizado como um mutante que apresenta defeitos na modificação pós-traducional e, consequentemente, na função de eIF5A (Galvão *et al.* 2013).

Dessa forma, a identificação das interações genéticas sintéticas com os diversos mutantes pode contribuir para a determinação da função de eIF5A, bem como para o esclarecimento da especificidade apresentada pelos diferentes mutantes.

Para a caracterização das interações genéticas sintéticas de maneira global, foi utilizada a metodologia conhecida como *Synthetic Genetic Array* (SGA), a qual permite, como apresentado anteriormente, a realização de rastreamento e identificação das interações genéticas sintéticas em larga escala.

Neste trabalho, os rastreamentos iniciais por SGA foram realizados durante o doutorado sanduíche na Universidade de Toronto, sob supervisão da Profa. Dra. Brenda Jean Andrews, e os rastreamentos confirmatórios bem como as análises das interações identificadas foram realizados na Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP.

Para tanto, inicialmente, foi necessária a geração das linhagens contendo os alelos selvagem e mutantes, no *background* genético específico para o rastreamento por meio do SGA.

4.3.1. Construção e confirmação das linhagens *query*

Para a caracterização das interações genéticas sintéticas utilizando a metodologia SGA é necessário que o gene de interesse (gene *query*) esteja fusionado a uma marca de seleção que o torne rastreável. Ainda, o gene *query* deve estar presente em uma linhagem com o *background* genético específico para a realização do rastreamento (BY7092). Esta linhagem contém os genes *CAN1* e *LYPI* nocauteados, os quais servirão como marcas recessivas para a identificação e seleção, após a realização do cruzamento e esporulação (descritos abaixo), das linhagens haplóides. *CAN1* e *LYPI* são, respectivamente, arginina e lisina permeases de membrana plasmática e suas deleções conferem resistência à canavanina e tialisina, respectivamente. Ainda, a linhagem deve apresentar o repórter *STE2pr-Sp_his5*, o qual promoverá, especificamente, a expressão do gene *his5* de *Schizosaccharomyces pombe* em linhagens do *mating type* A, complementando, desta forma, a deleção do gene *HIS3* de *S. cerevisiae* e permitindo o crescimento da linhagem na ausência de histidina no meio de cultura. Resumindo, todas estas marcas permitirão a seleção de linhagens haplóides, eliminando os diplóides indesejáveis.

Para tanto, os genes que codificam eIF5A e Dys1 (selvagem e mutantes), juntamente com o cassete que confere resistência à nourseotricina (*natMX4*), foram amplificados por PCR. Para amplificação do selvagem e mutante do gene que codifica para Dys1, os oligonucleotídeos utilizados foram *DYS1_F* e *DYS1_R*(R2), e para o gene que codifica eIF5A selvagem e mutantes, os oligonucleotídeos utilizados foram *TIF51A_F* e *TIF51A_R*(R2). Para amplificação do cassete de nourseotricina (*natMX4*) e fusioná-lo, respectivamente, a eIF5A e Dys1, foram utilizados os oligonucleotídeos *natMX4_R*(F3) e *TIF51A_nat_R4* ou *natMX4_R*(F3) e

DYSI_nat_R4. Conforme observado na Figura 17A, pode-se verificar a correta amplificação dos fragmentos de aproximadamente 1,4 Kb do cassete *natMX4* e aproximadamente 1,7 kb contendo o gene que codifica Dys1 selvagem e o mutante *dys1-1*. Ainda, como mostra a Figura 17B, podemos observar a correta amplificação dos fragmentos de aproximadamente 1,4 Kb para *natMX4* e aproximadamente 1,0 kb para o gene que codifica eIF5A selvagem e os mutantes utilizados neste trabalho. A seguir, os produtos de PCR foram cotransformados, gene *query* com o cassete de nourseotricina, na linhagem BY7092, de acordo com o descrito no item 3.2.10.1. As transformações foram então plaqueadas em YPD contendo 100 µg/mL de nourseotricina para seleção das linhagens que, através do processo de recombinação homóloga, tiveram os genes selvagem ou mutantes fusionados a *natMX4* e inseridos no correto *locus* gênico. Não foi possível obter a linhagem *query* para o mutante *dys1-1* (resultados não apresentados). Este fato era esperado devido à severidade de crescimento apresentada pelo mutante, o que levaria a obtenção de uma linhagem de difícil utilização no rastreamento por SGA (Dra. Brenda Andrews, comunicação pessoal). Os transformantes para eIF5A (selvagem e mutantes) foram então selecionados e analisados quanto ao fenótipo, já conhecido, de sensibilidade a temperatura (Valentini *et al.* 2002; Dias *et al.* 2008). Como mostra a Figura 18, as linhagens selecionadas foram testadas e confirmaram o fenótipo de sensibilidade a temperatura, fenótipo que foi suprimido quando na presença de um plasmídeo contendo o gene selvagem (*TIF51A*). Por fim, para confirmação da correta inserção no *locus* gênico, o DNA genômico das linhagens *query* foi isolado e reação de PCR foi realizada utilizando os oligonucleotídeos *natMX4_conf R* e *TIF51A_conf F*, que hibridizam separadamente nos dois fragmentos utilizados na cotransformação da linhagem BY7092 (Figura 5). Como mostra a Figura 19, foi possível observar a correta inserção dos fragmentos em todas as linhagens *query* de eIF5A, pela amplificação de um fragmento de aproximadamente 1,7 Kb. Portanto, todas as linhagens *query* para as análises com os mutantes de eIF5A foram confirmadas, tornando possível o rastreamento por SGA.

4.3.2. Análise de interação genética sintética em larga escala por meio do *Synthetic Genetic Array* (SGA)

Resumidamente, a metodologia de SGA consiste em varias etapas com sucessivas réplicas de maneira robotizada e sistemática. Após estas etapas, selecionam-se os haplóides de interesse, que no caso deste trabalho foi a obtenção dos haplóides contendo o gene *query* (selvagem e os mutantes *tif51A-1*, *tif51A-3*, *tif51A*^{K56A} e *tif51A*^{Q22H/L93F} de eIF5A) e um dos genes presentes nas coleções de linhagens nocautes ou linhagens de mutantes condicionais sensíveis a temperatura (ts). As etapas para a seleção dos mutantes duplos, bem como as análises das interações genéticas identificadas foram realizadas de acordo com o descrito nos itens 3.2.10.2 e 3.2.10.3, respectivamente.

Os resultados obtidos no rastreamento inicial, bem como no rastreamento confirmatório, estão resumidos na Tabela 4, para as coleções de linhagens nocautes e de linhagens de mutantes condicionais sensíveis a temperatura (ts). Como pode ser observado, o rastreamento com a coleção de linhagens nocautes apresentou uma diminuição no número total de interações identificadas, sendo que dos 418 genes identificados no rastreamento inicial, 338 foram confirmados (Tabela 4). Por outro lado, no rastreamento com a coleção de linhagens de mutantes condicionais sensíveis a temperatura (ts) não foi observado alteração no número total das interações genéticas, sendo 239 genes identificados nos rastreamentos inicial e confirmatório (Tabela 4), apesar de ter sido identificado interação com diferentes alelos do mesmo gene. Ainda, as interações genéticas não confirmadas foram as que apresentaram um menor *score*, ou seja, foram as interações que de acordo com o valor gerado pela análise utilizando o *software* SGA Tools apresentaram valores menos significativos, ainda que dentro do considerado confiável (*scores* menores que -0,2 para interações negativas e maiores que 0,2 para interações positivas - dados não mostrados).

A seguir, os resultados das interações genéticas foram analisados quanto à ontologia genética (GO), de acordo com as classificações do banco de dados de *S. cerevisiae* (*Saccharomyces Genome Database*, SGD). Estas análises de GO revelam genes que fazem parte de um mesmo processo biológico e que apresentam um aumento significativo na sua frequência, quando comparado com a frequência observada no genoma. As ontologias genéticas reveladas pelos genes identificados

nestes rastreamentos, após a realização dos rastreamentos confirmatórios, e que apresentaram aumento na frequência podem ser observadas na Figura 20.

Como pode ser observado, 51% das interações genéticas identificadas nos rastreamentos não apresentaram enriquecimento para nenhum processo biológico (Figura 20A, Anexo III), ou seja, apesar de confirmadas, estas interações não fazem parte de um mesmo processo biológico com frequência significativamente acima daquela observada no genoma. Interessantemente, 19% dos genes agrupados sem enriquecimento para determinada GO são genes cujos produtos têm funções desconhecidas ou até mesmo genes que provavelmente codificam alguma proteína (Anexo III).

No entanto, vários destes genes já foram identificados em outros estudos utilizando mutantes de eIF5A, como por exemplo, *SPE1*, *INO4* e *ROX1*, o que validam os dados obtidos (Costanzo *et al.* 2010; Zanelli e Valentini 2005). Interessantemente, o gene *ROX1*, gene que codifica um repressor para genes responsivos a anaerobiose, apresentou interação genética positiva com os mutantes de eIF5A (Anexo III), resultado já observado anteriormente (Costanzo *et al.* 2010). Dessa forma, decidiu-se analisar se o mecanismo pelo qual ocorre a supressão dos mutantes de eIF5A se dá devido a expressão do gene parálogo de *TIF51A* (*TIF51B* ou *ANB1*), o qual codifica para uma proteína com 90% de identidade. Como mostra a Figura 21, o mutante *tif51A-1*, o qual apresenta depleção de eIF5A quando na temperatura restritiva e, consequentemente, defeito no crescimento celular, recuperou a expressão de eIF5A quando combinado com o nocaute do gene *ROX1* (Figura 21A), assim como suprimiu o defeito de crescimento apresentado pelo mutante na temperatura restritiva de crescimento (Figura 21B). Dessa forma, a deleção de *ROX1* nos mutantes de eIF5A deve levar a expressão de *TIF51B* e, consequentemente, supressão dos defeitos apresentados pelo mutante na ausência de eIF5A codificada por *TIF51A*.

Por outro lado, 49% dos genes confirmados nestes rastreamentos apresentaram enriquecimento para algum processo biológico (Figura 20A). A análise dos dados revelou apenas quatro processos biológicos gerais (Figura 20B), com suas diversas subcategorias. Para exemplificar, o processo biológico de ciclo celular contempla as seguintes subcategorias: ciclo celular mitótico, ciclo celular meiótico, controle do ciclo celular, organização do citoesqueleto, segregação cromossômica, replicação de

DNA, organização da cromatina e citocinese. Como pode ser observado na Figura 20B, 53% das interações genéticas revelaram genes que atuam em etapas do ciclo celular (Anexo IV), 18% atuam no reparo de DNA (Anexo V), 16% atuam na tradução (Anexo VI) e 13% das interações identificadas revelaram genes relacionados ao tráfego vesicular/secreção (Anexo VII). Para ilustrar o enriquecimento, foram observados os seguintes resultados para as subcategorias do processo de ciclo celular com a coleção de mutantes sensíveis a temperatura: ciclo celular mitótico, frequência observada de 20,1%, (frequência no genoma de 5,2%); ciclo celular meiótico 7,8% (4,4% no genoma); controle do ciclo celular 7,4% (3,0% no genoma); organização do citoesqueleto 14,3% (3,8% no genoma); segregação cromossômica 12,3% (2,9% no genoma); replicação de DNA 9,4% (2,4% no genoma); organização da cromatina 8,2% (3,8% no genoma) e citocinese 4,9% (1,5% no genoma). Como pode ser observado, o enriquecimento para estas subcategorias oscilou de, 1,8 a 4,2 vezes a frequência do genoma.

Por fim, foram gerados *heat maps* com os genes pertencentes a uma mesma ontologia genética, os quais apresentam as interações genéticas sintéticas negativas em escala de vermelho, de acordo com a intensidade da interação, e em escala de verde as interações genéticas sintéticas positivas, de acordo com o descrito em Materiais e Métodos.

Como mostra a Figura 22, os rastreamentos genéticos revelaram 54 genes que codificam proteínas relacionadas ao processo geral da tradução (16% dos genes com GO), sendo que a grande maioria são proteínas ribossomais. Interessantemente, *SSDI*, gene que codifica um repressor traducional com função no crescimento polarizado e já descrito como supressor do mutante *tif51A-1* (Zanelli e Valentini 2005), apresentou uma interação genética negativa com os quatro mutantes utilizados neste estudo. Além disso, o nocaute de *TIF51B* (*ANB1*), gene parálogo de *TIF51A*, apresentou interação negativa com mutantes de eIF5A, sugerindo que no momento de perda da função devido à mutação em *TIF51A*, a proteína codificada por *TIF51B* desempenhe papel compensatório, mesmo em condições aeróbicas.

Ainda, o nocaute de *ASCI* (*Δasc1*) apresentou uma forte interação genética negativa com todos os mutantes de eIF5A utilizados nos rastreamentos, o que corrobora os resultados obtidos para o mutante *dys1-1* (Figura 12). Neste sentido, algumas das interações identificadas foram selecionadas para avaliação do impacto na

tradução. Assim, foram obtidos os perfis polissomais dos mutantes dos genes envolvidos nessas interações, separadamente e em combinação com um mutante de eIF5A (*tif51A*^{K56A}). Como pode ser observado na Figura 23, foram selecionados mutantes de genes que codificam proteínas estruturais do ribossomo, tanto da subunidade menor 40S (*Arps6B*) quanto da subunidade maior 60S (*Arpl1B*, *Arpl8A* e seu parólogo *Arpl8B*, *Arpl16B* e *Arpl19B*), e que apresentaram interações tanto positivas quanto negativas, além de um mutante do gene que codifica uma proteína que se associa ao ribossomo, utilizado como controle de proteína não ribossomal (*Asro9*). Curiosamente, apenas as deleções de *RPL1B* (*Arpl1B*) e *RPL8A* (*Arpl8A*) apresentaram alteração drástica no perfil polissomal quando na presença do mutante *tif51A*^{K56A}. O mutante *Arpl1B*, o qual revelou uma interação negativa com os mutantes de eIF5A, apresenta defeito no perfil polissomal característico de defeitos na etapa da elongação da tradução, assim como o mutante *tif51A*^{K56A} (McIntosh *et al.* 2011; Dias *et al* 2012). Entretanto, quando combinados, o defeito observado no perfil polissomal é característico de defeitos na etapa de início da tradução, evidenciando um impacto mais drástico na síntese proteica (Figura 23). Ainda, para o mutante *Arpl8A*, o qual conhecidamente apresenta diminuição de 60S livre (Jakovljevic *et al.* 2012), quando na presença do mutante *tif51A*^{K56A} apresentou diminuição da subunidade 40S, o que, provavelmente, devido ao equilíbrio entre 60S e 40S livres, resultou em uma melhora da tradução, refletindo numa interação genética positiva (Figura 22). Estes resultados envolvendo interação genética entre eIF5A e proteínas ribossomais estão sendo melhor caracterizados por outro aluno de Doutorado do laboratório (Paulo E. G. Boldrin).

Além disso, outro processo biológico já relacionado com a função de eIF5A foi identificado nestes rastreamentos. Como mostra a Figura 24, foram identificadas interações genéticas com 42 genes (13% dos genes com GO) pertencentes ao processo de tráfego vesicular/secção. Nesta GO, podemos identificar o gene *SEC65* com interação genética negativa com os mutantes de eIF5A, corroborando os dados apresentados anteriormente e que descreveram um papel para eIF5A na translocação de proteínas para o RE, pela via co-traducional (Figura 16). Ainda, mesmo que com um valor de *score* baixo, pode ser observada uma interação genética positiva com o gene *SEC62*, cujo produto participa apenas da via pós-traducional.

Na Figura 25, podem ser observados 58 genes (18% dos genes com GO) que revelaram, após análise de ontologia genética, correlação com reparo de DNA, função que nunca foi relacionada ao papel de eIF5A na célula. Curiosamente, dos genes identificados com esta ontologia genética, aproximadamente 68% apresentam redundância com o *heat map* de ciclo celular (Figura 26), incluindo *CDC28*. Ainda, é mostrado na Figura 27 que hidroxiuréia, um conhecido composto que afeta a replicação do DNA (Kurat *et al.* 2014), não apresentou nenhum efeito direto sobre os mutantes de eIF5A. Uma vez que a identificação e o reparo de danos ao DNA é um dos *checkpoints* necessários para a correta progressão do ciclo celular, esta ontologia genética identificada pode refletir um efeito secundário da função de eIF5A no ciclo celular. Dessa forma, o acúmulo de defeitos durante a progressão do ciclo celular resultaria em uma piora neste processo biológico, o que explicaria a maior frequência de interações genéticas negativas observadas com esta ontologia genética (Figura 25).

Por fim, como observado na Figura 26, a qual representa a ontologia genética com maior frequência apresentada nesta análise (53% das interações com GO), foi identificada uma correlação funcional entre eIF5A e ciclo celular. Para visualização dos 173 genes identificados, a Figura 26 foi desmembrada em três partes (Figuras 26A, 26B e 26C). Apesar desta correlação funcional já ter sido sugerida anteriormente, a maneira e/ou mecanismo e quais os genes que interferem com esta função de eIF5A ainda não foram identificados (Park *et al.* 1993a; Park *et al.* 1997; Zanelli e Valentini 2005). Neste sentido, vários genes envolvidos com diferentes etapas/controla da progressão do ciclo celular foram identificados, como por exemplo, *BBP1*, *CDC10*, *CDC11*, *CDC37* e *CDC48*, entre outros. Interessantemente, *PKC1*, um gene supressor já descrito para diferentes mutantes de eIF5A (Valentini *et al.* 2002; Zanelli e Valentini 2005), foi identificado nos rastreamentos com interação genética negativa. Estes resultados estão de acordo com uma função para eIF5A na progressão do ciclo celular. Além disso, fatores chaves do ciclo celular, como por exemplo, a única quinase essencial para este processo, *CDC28*, foi também identificada.

Dois alelos mutados de *CDC28* foram identificados (*cdc28-1* e *cdc28-td*) e revelaram, respectivamente, interação genética negativa e positiva. Uma vez que Cdc28 está presente em todas as etapas do ciclo celular (G1, S, G2 e M) e considerando um possível função direta de eIF5A neste processo biológico, a

caracterização desta alelo especificidade poderia indicar a etapa específica que eIF5A e Cdc28 se correlacionam durante o ciclo celular. Porém, como foi identificado um mutante degron temperatura sensível (*cdc28-td*) e o rastreamento foi realizado a 25°C, a interação genética positiva revelada com este mutante poderia não ter sido identificada corretamente. Para testarmos esta hipótese, foi realizado teste de sensibilidade a temperatura com estes mutantes e foi possível observar que quando do aumento de temperatura, ou seja, na indução do defeito em *cdc28-td*, este mutante também apresentou interação genética negativa, assim como o mutante *cdc28-1*, utilizado como controle (Figura 28).

Além de Cdc28, Cdc14 também apresentou no rastreamento alelo especificidade nas interações com os mutantes de eIF5A. Cdc14 promove, através da ativação do complexo APC, a degradação das Clbs e a estabilização de Sic1, inibindo desta forma o complexo Clb-Cdc28 (Visintin *et al.* 1998).

Ainda, uma vez que foi sugerida a atuação de eIF5A no crescimento polarizado (Frigieri *et al.* 2008; Zanelli *et al.* 2006), as interações negativas identificadas com *MYO2*, gene que codifica para uma proteína necessária para o transporte das vesículas para o crescimento polarizado, e com mutantes de *ACT1*, que codifica para proteínas estruturais envolvidas com polarização, corroboram a hipótese de envolvimento de eIF5A com a progressão do ciclo celular.

Além disso, como apresentado na Introdução, a correta progressão do ciclo celular depende de fatores relacionados com o controle da degradação das ciclinas, as quais necessitam ser ubiquitinadas e, conseqüentemente, degradadas (Bloom e Cross 2007). Nesse sentido, nos rastreamentos foram identificados fatores chaves nesta etapa de degradação. Entre eles, se destaca *SIC1*, que apresentou interação genética negativa com mutantes de eIF5A. A proteína Sic1 é responsável pela inibição do complexo Cdc28-Clbs, envolvida na transição G1/S (Bloom e Cross 2007). Além deste, genes relacionados ao complexo APC/C (*APC2*, *APC5*, *UBC9*, *CDC27* e *MPS1*) também apresentaram interação genética negativa com os mutantes de eIF5A. Este complexo, como mencionado na Introdução, é responsável pela ubiquitação e a conseqüente degradação pelo proteasoma das diferentes ciclinas (Bloom e Cross 2007).

Curiosamente, nenhuma das ciclinas envolvidas nas diferentes etapas do ciclo celular foi identificada nos rastreamentos. Isso se deve provavelmente à redundância funcional existente entre as ciclinas do mesmo tipo (Cln-Cln ou Clb-Clb).

Por fim, ao analisarmos a presença de poliprolinas nos genes identificados nos rastreamentos, foi possível identificar um total de 81 genes (14%) contendo as sequências PPP ou PPG. Uma vez que genes contendo poliprolinas são mais frequentes nas ontologias genéticas relacionadas com o ciclo celular, como por exemplo, brotamento celular, shmoo e envolvimento com o crescimento polarizado (Li *et al.* 2014), decidimos analisar os genes identificados nos rastreamentos classificados nas GOs. Nesta análise, foram identificados 32 genes (18,5%) no ciclo celular, 12 (20,7%) reparo de DNA, 3 (7,1%) tráfego vesicular/secreção e 3 (5,6%) relacionados com tradução que apresentam sequências de poliprolinas. Apesar da alta frequência observada para ciclo celular, isto provavelmente é reflexo da ontologia genética natural observada para as proteínas com poliprolinas (Li *et al.* 2014), sendo não necessariamente relacionada a tradução específica por eIF5A. Além disso, dados não publicados do nosso laboratório, envolvendo ensaios de expressão gênica em mutantes de eIF5A e utilizando repórteres contendo sequências de poliprolinas ou genes que naturalmente apresentam poliprolinas, juntamente com dados obtidos por colaboradores (Comunicação pessoal, Dra. Myung Hee Park, NIH), não identificaram, até o momento, a correlação entre eIF5A e a tradução específica de sequências de poliprolinas.

Dessa forma, o aprofundamento do estudo das interações genéticas identificadas nos rastreamentos e relacionadas ao ciclo celular será muito importante para a definição da função de eIF5A neste processo biológico, uma vez que eIF5A pode estar relacionada à tradução específica de fatores relacionados à progressão do ciclo celular.

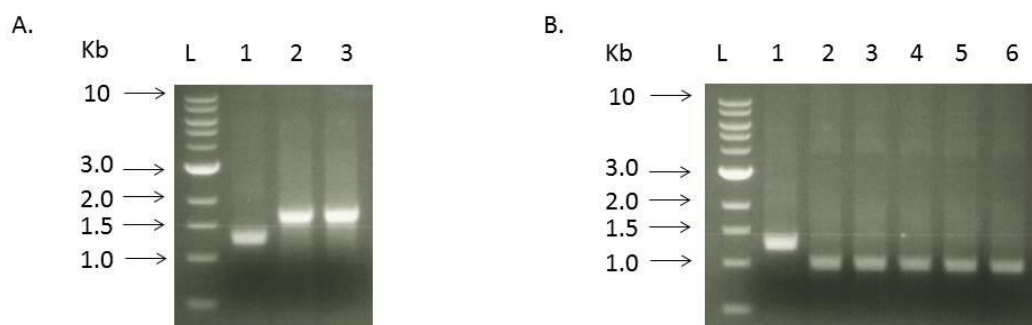


Figura 17. Amplificação por PCR dos genes *DYS1* e *TIF51A* (selvagem e mutantes) e do cassete de nourseotricina para a construção das linhagens *query*. (A) Fragmentos da PCR do gene que codifica Dys1 (selvagem e mutante) e do cassete de nourseotricina (*natMX4*). L: padrão de tamanho molecular (ladder), canaleta 1: *natMX4*, canaleta 2: mutante *dys1-1* e canaleta 3: *DYS1* (selvagem). (B) Fragmentos da PCR do gene que codifica eIF5A (selvagem e mutantes) e do cassete de nourseotricina (*natMX4*). L: padrão de tamanho molecular, canaleta 1: *natMX4*, canaleta 2: mutante *tif51A*^{Q22H/L93F}, canaleta 3: mutante *tif51A*^{K56A}, canaleta 4: mutante *tif51A-3*, canaleta 5: mutante *tif51A-1* e canaleta 6: *TIF51A* (selvagem).

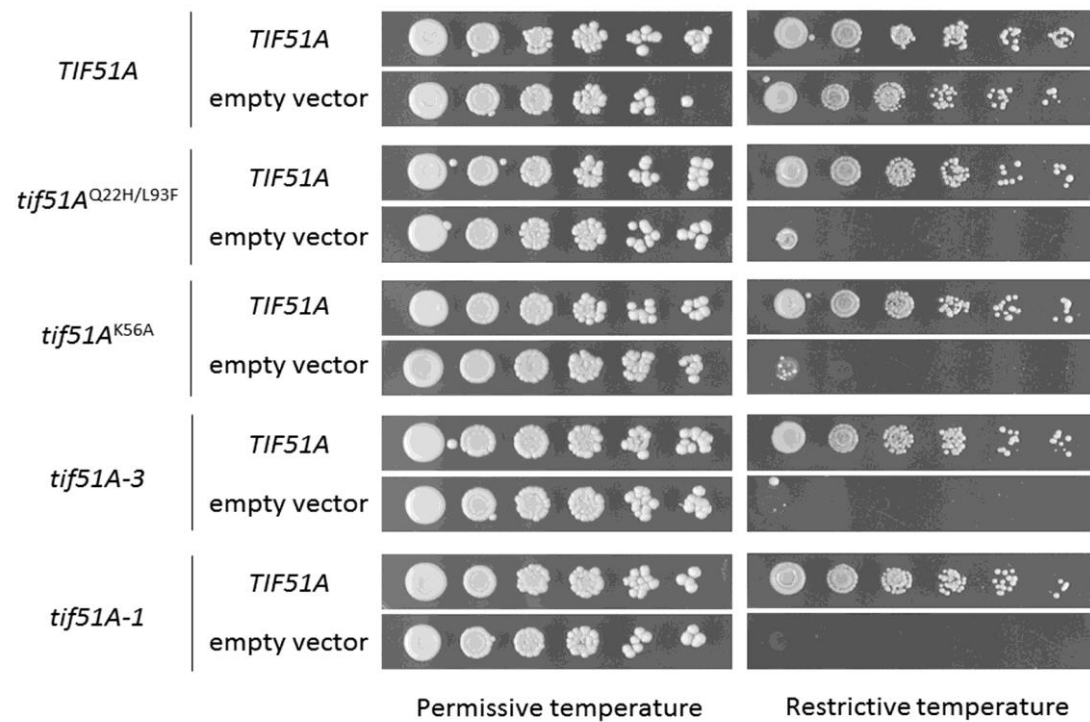


Figura 18. Avaliação do fenótipo de sensibilidade a temperatura e a complementação pelo alelo selvagem dos mutantes de eIF5A. As linhagens indicadas foram transformadas com o gene selvagem (*TIF51A*) ou com o vetor vazio (empty vector), utilizado como controle negativo. Após diluição seriada, as células foram plaqueadas em meio SC - ura e crescidas na temperatura permissiva e restritiva.

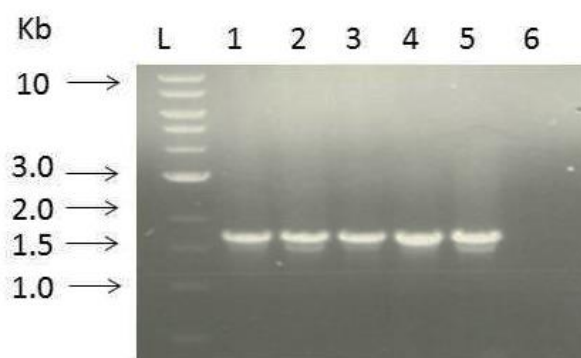


Figura 19. Confirmação da correta inserção de *TIF51A* (selvagem ou mutantes), fusionados ao cassete *natMX4*, na linhagem *query*. Produtos de PCR foram gerados de acordo com o descrito em Materiais e Métodos, utilizando os oligonucleotídeos *TIF51A*_conf F e *natMX4*_conf R (Figura 5). L: padrão de tamanho molecular (ladder), canaleta 1: *TIF51A* (selvagem), canaleta 2: mutante *tif51A*^{Q22H/L93F}, canaleta 3: mutante *tif51A*^{K56A}, canaleta 4: mutante *tif51A-3*, canaleta 5: mutante *tif51A-1* e canaleta 6: controle negativo (BY7092).

Tabela 4. Número de interações genéticas identificadas nos rastreamentos por SGA com os mutantes de *TIF51A* (*tif51A-1*, *tif51A-3*, *tif51A*^{K56A} e *tif51A*^{Q22H/L93F}) e as coleções de linhagens nocautes ou de mutantes condicionais sensíveis a temperatura (ts).

Rastreamento	Coleção de linhagens nocautes	Coleção de mutantes sensíveis a temperatura (ts)	Total
Inicial	418	239	657
Confirmatório	338	239	577

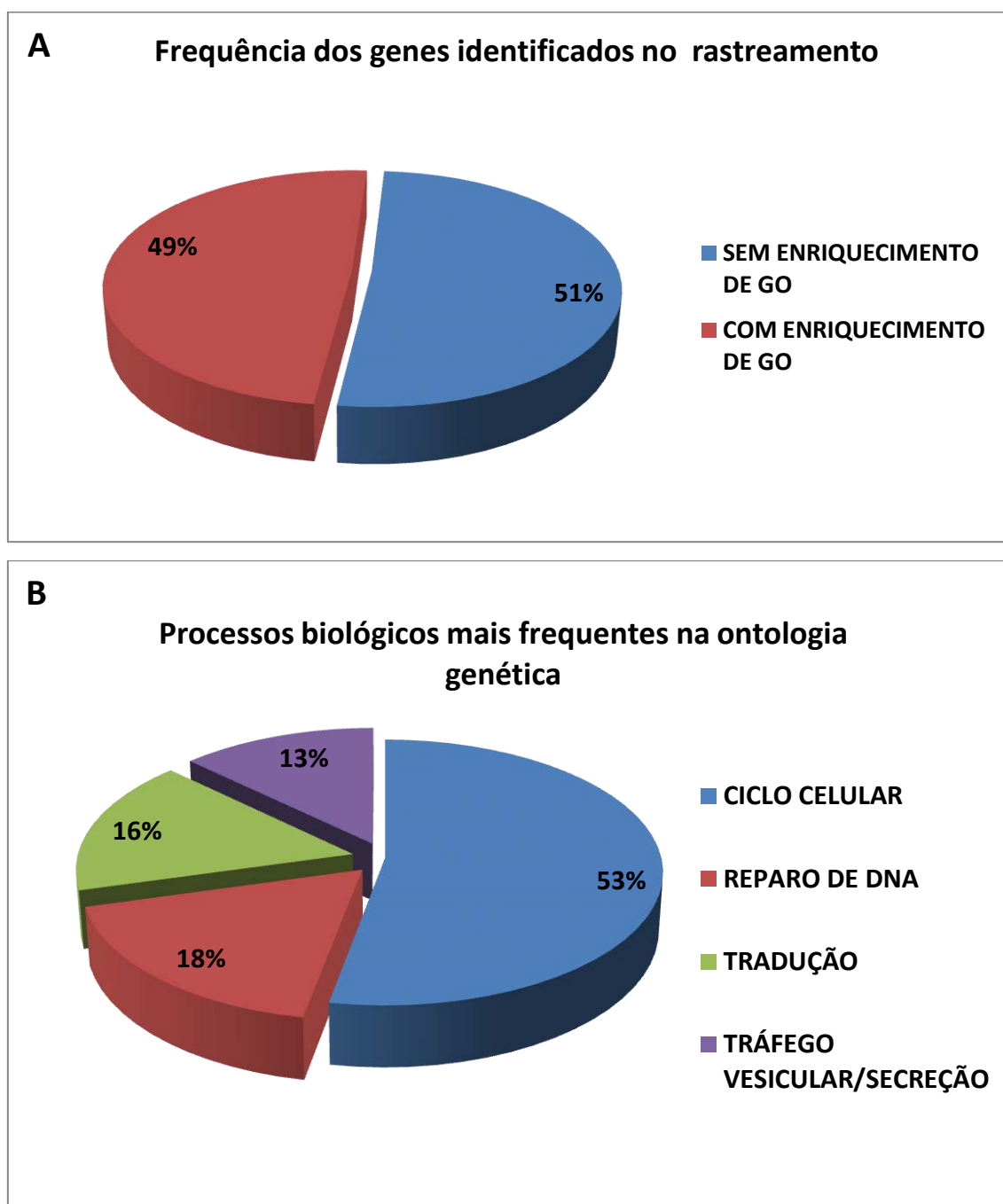


Figura 20. Frequência das ontologias genéticas identificadas nos rastreamentos por SGA. (A) Análise da frequência de genes pertencentes a um mesmo processo biológico por ontologia genética (GO). **(B)** Processos biológicos mais frequentes identificados nos rastreamentos por SGA.

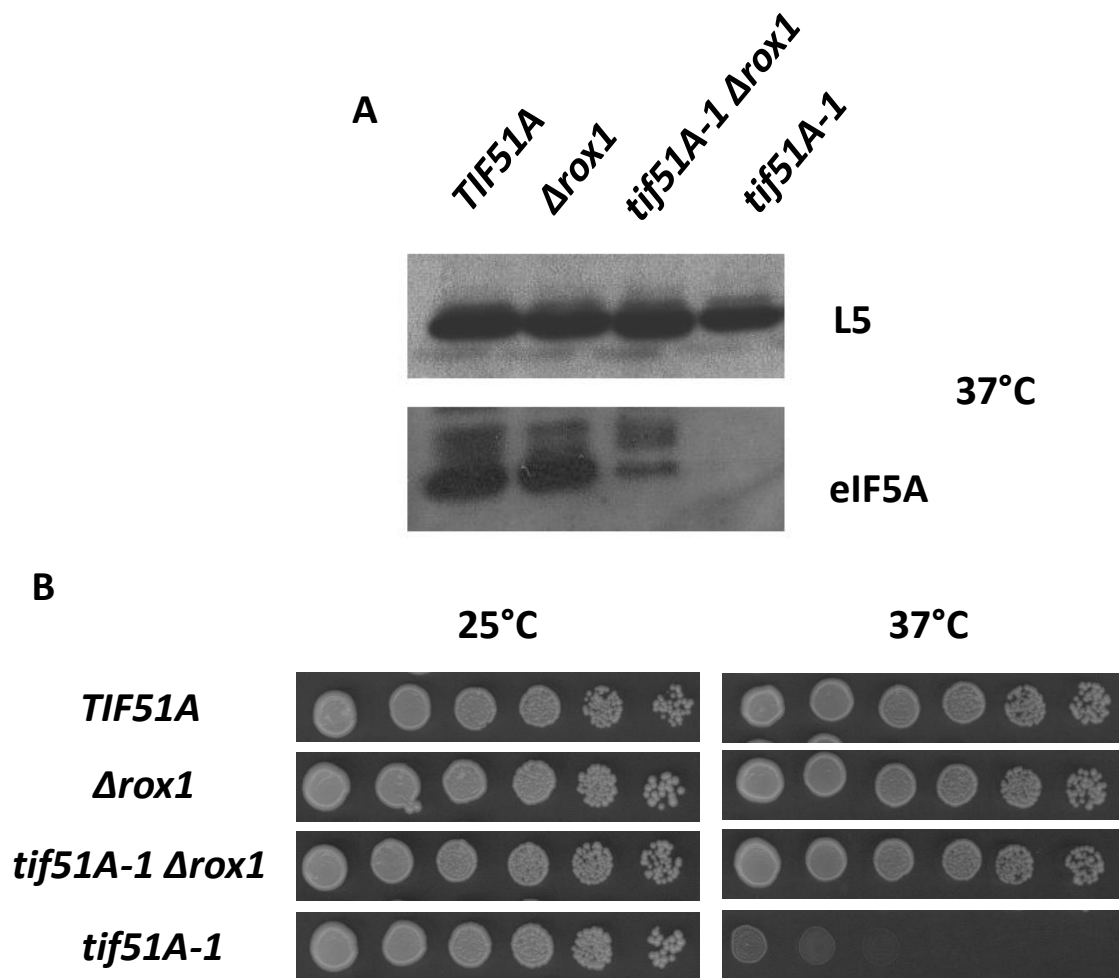


Figura 21. Caracterização da interação genética envolvendo eIF5A e Rox1. (A) Identificação dos níveis de eIF5A no mutante *tif51A-1* com e sem a deleção de *ROX1*, na temperatura restritiva de crescimento (37°C). A proteína ribossomal L5 foi utilizado como controle de carregamento. (B) As linhagens indicadas foram diluídas seriadamente, plaqueadas em meio YPD e crescidas na temperatura permissiva (25°C) e restritiva (37°C) para o mutante *tif51A-1*.

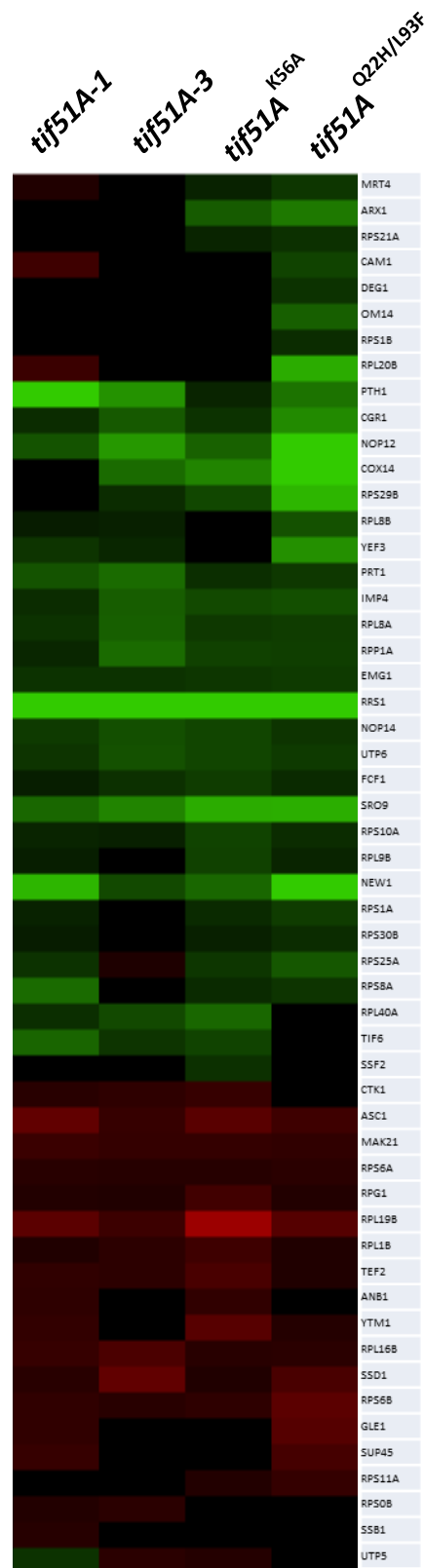


Figura 22. *Heat map* das interações identificadas nos rastreamentos realizados e relacionadas ao processo da tradução. Os genes identificados nos rastreamentos pertencentes a mesma ontologia genética foram agrupados e o *heat map* gerado para cada um dos mutantes de eIF5A, individualmente, de acordo com o *score* da interação genética sintética.

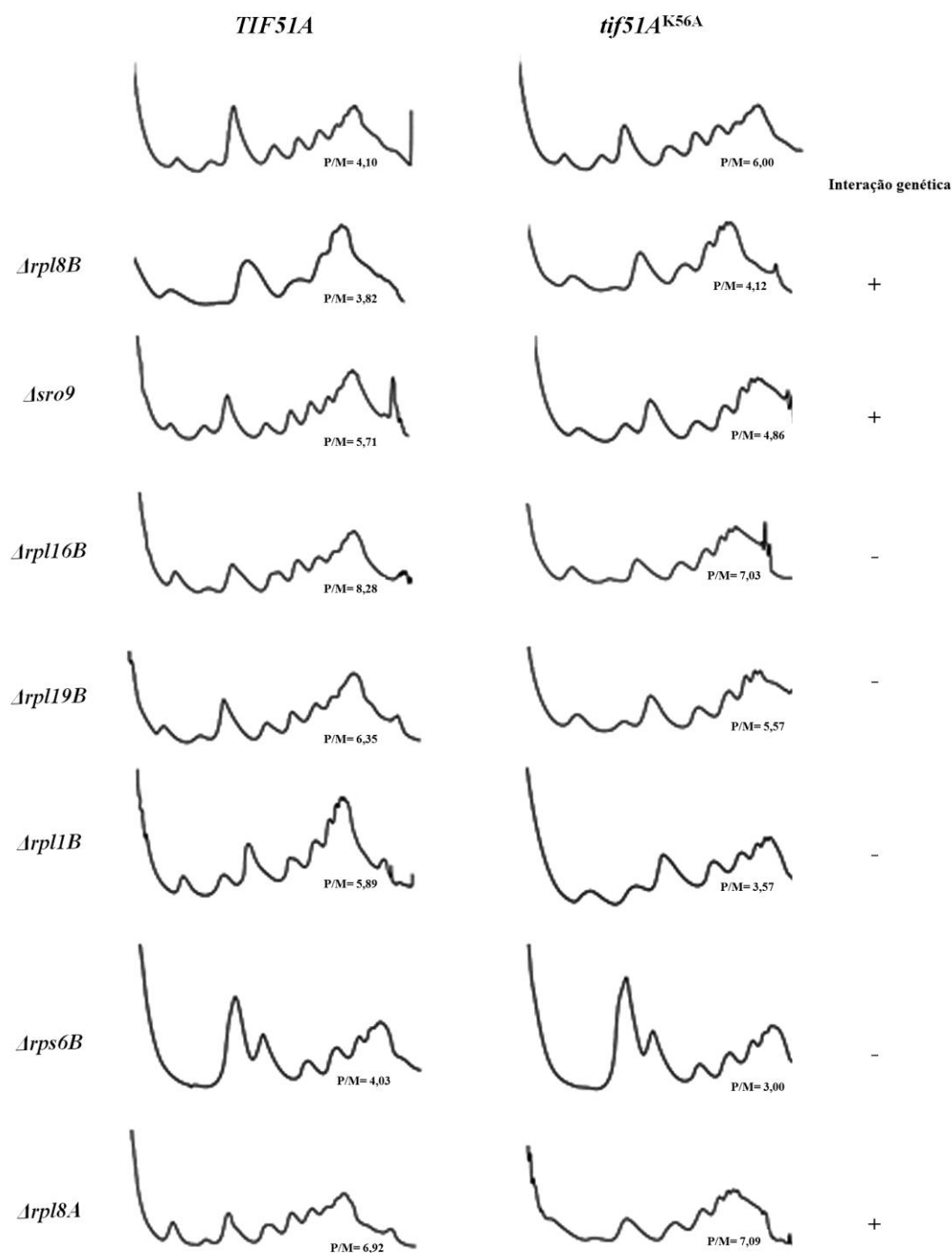


Figura 23. Análise do perfil polissomal de mutantes identificados nos rastreamentos e que atuam no processo da tradução, em combinação ou não com o mutante *tif51A^{K56A}*. Extratos totais das linhagens indicadas foram fracionados por centrifugação em gradiente de sacarose. Os gráficos representam a leitura de absorbância a 254nm dos gradientes. A relação polissomo/monossomo (P/M) está indicada em cada perfil polissomal.



Figura 24. *Heat map* das interações identificadas nos rastreamentos realizados e relacionadas ao processo de tráfego vesicular/secção. Os genes identificados nos rastreamentos pertencentes a mesma ontologia genética foram agrupados e o *heat map* gerado para cada um dos mutantes de eIF5A, individualmente, de acordo com o *score* da interação genética sintética.



Figura 25. *Heat map* das interações identificadas nos rastreamentos realizados e relacionadas ao processo de reparo de DNA. Os genes identificados nos rastreamentos pertencentes a mesma ontologia genética foram agrupados e o *heat map* gerado para cada um dos mutantes de eIF5A, individualmente, de acordo com o *score* da interação genética sintética.

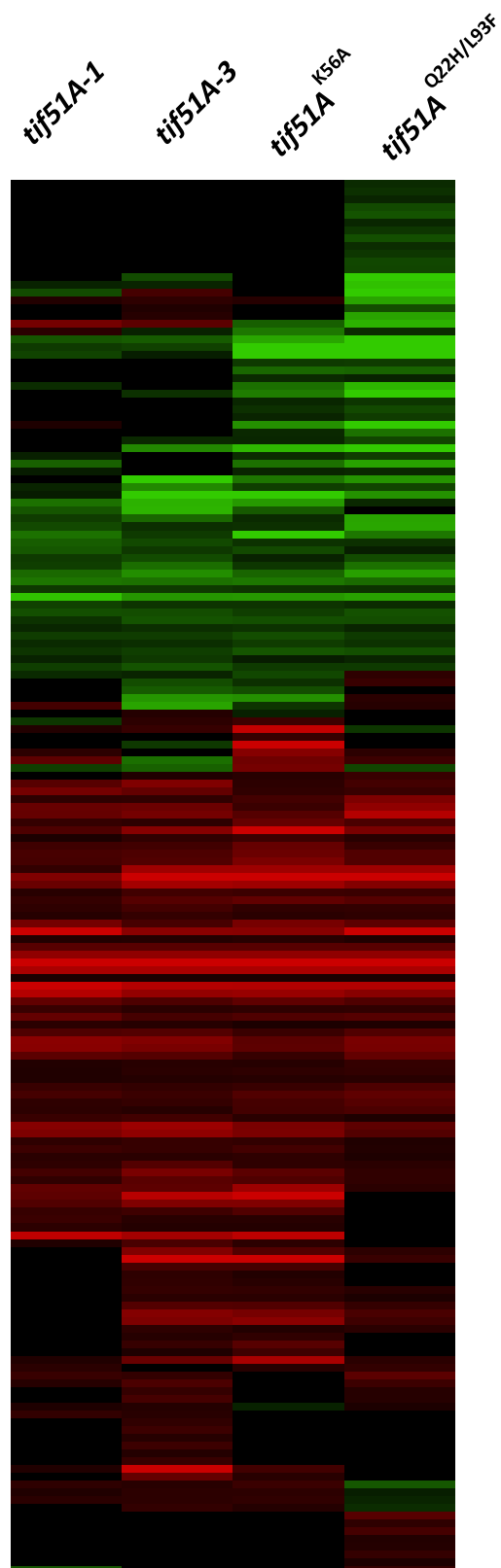


Figura 26. *Heat map* das interações identificadas nos rastreamentos realizados e relacionadas ao ciclo celular. Os genes identificados nos rastreamentos pertencentes a mesma ontologia genética foram agrupados e o *heat map* gerado para cada um dos mutantes de eIF5A, individualmente, de acordo com o *score* da interação genética sintética.



Figura 26A. *Heat map* das interações identificadas nos rastreamentos realizados e relacionadas ao ciclo celular (continuação).



Figura 26B. *Heat map* das interações identificadas nos rastreamentos realizados e relacionadas ao ciclo celular (continuação).

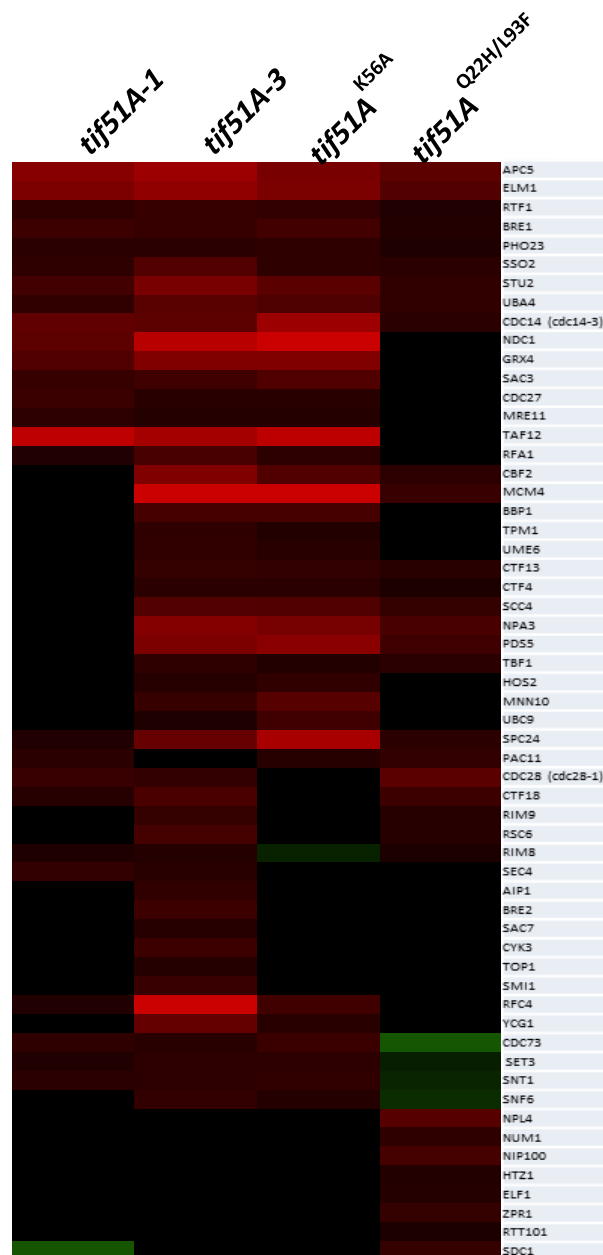


Figura 26C. *Heat map* das interações identificadas nos rastreamentos realizados e relacionadas ao ciclo celular (continuação).

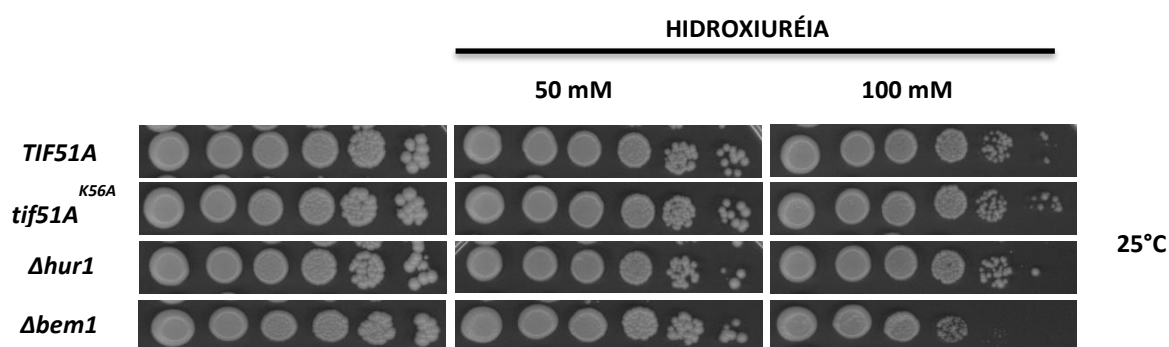


Figura 27. Avaliação da sensibilidade à hidroxiuréia do mutante *tif51A^{K56A}*. As linhagens indicadas foram crescidas em meio YPD e submetidas à diluição seriada. Em seguida, foram plaqueadas em YPD na ausência ou na presença de 50mM ou 100mM de hidroxiuréia e incubadas a 25°C, por 3 dias. As linhagens *Δhur1* e *Δbem1* foram utilizadas, respectivamente, como controle de resistência e sensibilidade à hidroxiuréia.

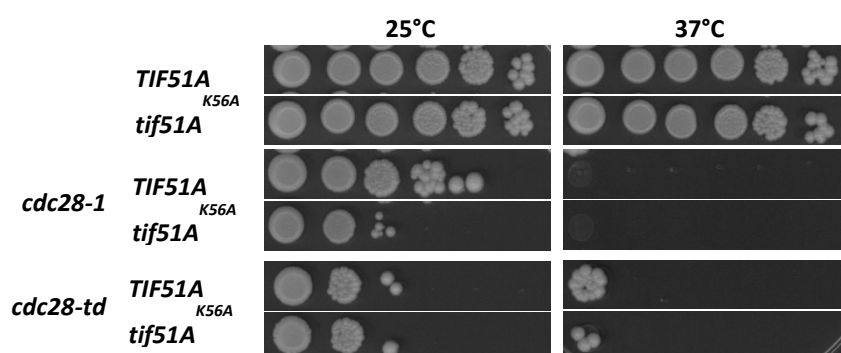


Figura 28. Avaliação da sensibilidade a temperatura dos mutantes *cdc28-1* e *cdc28-td* quando combinados com o mutante *tif51A*^{K56A}. As linhagens indicadas foram crescidas em meio YPD e submetidas a diluição seriada. Em seguida foram plaqueadas na presença em YPD e incubadas a 25°C e 37°C, por 3 dias.

5. CONCLUSÕES

- O mutante *dys1-1* possui defeitos no perfil polissomal relacionados à etapa da elongação da tradução e diminuição nos níveis de síntese proteica total de forma semelhante ao observado para mutantes condicionais de eIF5A;
- A ligação de eIF5A nos polissomos está reduzida no mutante *dys1-1*;
- O mutante *dys1-1* apresenta interação genética sintética letal com mutantes de *ASC1* ($\Delta asc1$, $asc1^{D109Y}$ e $asc1^{R38D,K40E}$) de forma independente de *SNR24*, presente no íntron do gene *ASC1*;
- A ligação de eIF5A nos polissomos está aumentada no nocaute de *ASC1* ($\Delta asc1$);
- O mutante *tif51A-1* apresenta interação genética negativa com os mutantes *sec65-1* e *sec61-2*, mas não com o mutante *sec62-ts*, sugerindo um papel para eIF5A na secreção, especificamente na translocação de proteínas para o RE, pela via co-traducional;
- Os rastreamentos genéticos por SGA com os mutantes de eIF5A identificaram 577 interações genéticas sintéticas, positivas ou negativas;
- Foram identificados, respectivamente, 338 e 239 genes das coleções de linhagens nocautes e mutantes sensíveis a temperatura (ts) que interagiram com os mutantes de eIF5A;
- Após análise de ontologia genética, ciclo celular (53%), reparo de DNA (18%), tradução (16%) e tráfego vesicular/secreção (13%) foram os processos biológicos identificados nos rastreamentos por SGA, com maior frequência e que revelaram enriquecimento em relação ao genoma.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abid, R., K. Ueda e M. Miyazaki, 1997 Novel features of the functional site and expression of the yeast deoxyhypusine synthase. *Biol Signals* 6: 157-165.
- Amberg, D., 2005 *Methods in yeast genetics*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp., edited by D. Burke e S. JN.
- Ausubel, F., 2004 *Current protocols in molecular biology*, New York, pp., edited by R. Brent, R. Kingston, D. Moore, J. Sedman, J. Smith *et al.*
- Bailly, M., e V. de Crécy-Lagard, 2010 Predicting the pathway involved in post-translational modification of elongation factor P in a subset of bacterial species. *Biol Direct* 5: 3.
- Baryshnikova, A., M. Costanzo, S. Dixon, F. J. Vizeacoumar, C. L. Myers *et al.*, 2010a Synthetic genetic array (SGA) analysis in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol* 470: 145-179.
- Baryshnikova, A., M. Costanzo, Y. Kim, H. Ding, J. Koh *et al.*, 2010b Quantitative analysis of fitness and genetic interactions in yeast on a genome scale. *Nat Methods* 7: 1017-1024.
- Beelman, C. A., e R. Parker, 1994 Differential effects of translational inhibition in cis and in trans on the decay of the unstable yeast MFA2 mRNA. *J Biol Chem* 269: 9687-9692.
- Benne, R., e J. W. Hershey, 1978 The mechanism of action of protein synthesis initiation factors from rabbit reticulocytes. *J Biol Chem* 253: 3078-3087.
- Bevec, D., e J. Hauber, 1997 Eukaryotic initiation factor 5A activity and HIV-1 Rev function. *Biol Signals* 6: 124-133.
- Bevec, D., H. Jaksche, M. Oft, T. Wohl, M. Himmelspach *et al.*, 1996 Inhibition of HIV-1 replication in lymphocytes by mutants of the Rev cofactor eIF-5A. *Science* 271: 1858-1860.
- Bloom, J., e F. R. Cross, 2007 Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 149-160.
- Boone, C., H. Bussey e B. J. Andrews, 2007 Exploring genetic interactions and networks with yeast. *Nat Rev Genet* 8: 437-449.
- Brochier, C., P. López-García e D. Moreira, 2004 Horizontal gene transfer and archaeal origin of deoxyhypusine synthase homologous genes in bacteria. *Gene* 330: 169-176.
- Caplan, A. J., D. M. Cyr e M. G. Douglas, 1992 YDJ1p facilitates polypeptide translocation across different intracellular membranes by a conserved mechanism. *Cell* 71: 1143-1155.
- Chantrel, Y., M. Gaisne, C. Lions e J. Verdière, 1998 The transcriptional regulator Hap1p (Cyp1p) is essential for anaerobic or heme-deficient growth of *Saccharomyces cerevisiae*: Genetic and molecular characterization of an extragenic suppressor that encodes a WD repeat protein. *Genetics* 148: 559-569.
- Chen, K. Y., e A. Y. Liu, 1997 Biochemistry and function of hypusine formation on eukaryotic initiation factor 5A. *Biol Signals* 6: 105-109.
- Chirico, W. J., M. G. Waters e G. Blobel, 1988 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature* 332: 805-810.
- Clement, P. M., H. E. Johansson, E. C. Wolff e M. H. Park, 2006 Differential expression of eIF5A-1 and eIF5A-2 in human cancer cells. *Febs J* 273: 1102-1114.
- Cooper, H. L., M. H. Park e J. E. Folk, 1982 Posttranslational formation of hypusine in a single major protein occurs generally in growing cells and is associated with activation of lymphocyte growth. *Cell* 29: 791-797.
- Costanzo, M., A. Baryshnikova, J. Bellay, Y. Kim, E. D. Spear *et al.*, 2010 The genetic landscape of a cell. *Science* 327: 425-431.

- Coudreuse, D., e P. Nurse, 2010 Driving the cell cycle with a minimal CDK control network. *Nature* 468: 1074-1079.
- Coyle, S. M., W. V. Gilbert e J. A. Doudna, 2009 Direct link between RACK1 function and localization at the ribosome in vivo. *Mol Cell Biol* 29: 1626-1634.
- Davierwala, A. P., J. Haynes, Z. Li, R. L. Brost, M. D. Robinson *et al.*, 2005 The synthetic genetic interaction spectrum of essential genes. *Nat Genet* 37: 1147-1152.
- Dias, C. A., V. S. Cano, S. M. Rangel, L. H. Apponi, M. C. Frigieri *et al.*, 2008 Structural modeling and mutational analysis of yeast eukaryotic translation initiation factor 5A reveal new critical residues and reinforce its involvement in protein synthesis. *Febs J* 275: 1874-1888.
- Dias, C. A., A. P. Gregio, D. Rossi, F. C. Galvão, T. F. Watanabe *et al.*, 2012 eIF5A interacts functionally with eEF2. *Amino Acids* 42: 697-702.
- Dixon, S. J., M. Costanzo, A. Baryshnikova, B. Andrews and C. Boone, 2009 Systematic mapping of genetic interaction networks. *Annu Rev Genet* 43: 601-625.
- Doerfel, L. K., I. Wohlgemuth, C. Kothe, F. Peske, H. Urlaub *et al.*, 2013 EF-P is essential for rapid synthesis of proteins containing consecutive proline residues. *Science* 339: 85-88.
- Forsburg, S. L., 2001 The art and design of genetic screens: yeast. *Nat Rev Genet* 2: 659-668.
- Frigieri, M. C., M. V. Joao Luiz, L. H. Apponi, C. F. Zanelli e S. R. Valentini, 2008 Synthetic lethality between eIF5A and Ypt1 reveals a connection between translation and the secretory pathway in yeast. *Mol Genet Genomics* 280: 211-221.
- Frigieri, M. C., G. M. Thompson, J. R. Pandolfi, C. F. Zanelli e S. R. Valentini, 2007 Use of a synthetic lethal screen to identify genes related to TIF51A in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genet Mol Res* 6: 152-165.
- Gerbasi, V. R., C. M. Weaver, S. Hill, D. B. Friedman e A. J. Link, 2004 Yeast Asc1p and mammalian RACK1 are functionally orthologous core 40S ribosomal proteins that repress gene expression. *Mol Cell Biol* 24: 8276-8287.
- Giaever, G., A. M. Chu, L. Ni, C. Connelly, L. Riles *et al.*, 2002 Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* 418: 387-391.
- Goffeau, A., B. G. Barrell, H. Bussey, R. W. Davis, B. Dujon *et al.*, 1996 Life with 6000 genes. *Science* 274: 546, 563-547.
- Gough, J., K. Karplus, R. Hughey e C. Chothia, 2001 Assignment of homology to genome sequences using a library of hidden Markov models that represent all proteins of known structure. *J Mol Biol* 313: 903-919.
- Gregio, A. P., V. P. Cano, J. S. Avaca, S. R. Valentini e C. F. Zanelli, 2009 eIF5A has a function in the elongation step of translation in yeast. *Biochem Biophys Res Commun* 380: 785-790.
- Guarente, L., 1993 Synthetic enhancement in gene interaction: a genetic tool come of age. *Trends Genet* 9: 362-366.
- Guthrie, C., e G. R. E. Fink, 1991 *Guide to Yeast Genetics*. Academic Press, New York, NY.
- Gutierrez, E., B. S. Shin, C. J. Woolstenhulme, J. R. Kim, P. Saini *et al.*, 2013 eIF5A promotes translation of polyproline motifs. *Mol Cell* 51: 35-45.
- Hanawa-Suetsugu, K., S. Sekine, H. Sakai, C. Hori-Takemoto, T. Terada *et al.*, 2004 Crystal structure of elongation factor P from *Thermus thermophilus* HB8. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 9595-9600.
- Hartman, J. L., B. Garvik e L. Hartwell, 2001 Principles for the buffering of genetic variation. *Science* 291: 1001-1004.
- Hartwell, L. H., e T. A. Weinert, 1989 Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246: 629-634.

- Henderson, B. R., e P. Percipalle, 1997 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* 274: 693-707.
- Hochegger, H., S. Takeda e T. Hunt, 2008 Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all? *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 910-916.
- Jakovljevic, J., U. Ohmayer, M. Gamalinda, J. Talkish, L. Alexander *et al.*, 2012 Ribosomal proteins L7 and L8 function in concert with six A₃ assembly factors to propagate assembly of domains I and II of 25S rRNA in yeast 60S ribosomal subunits. *RNA* 18: 1805-1822.
- Jao, D. L., e K. Y. Chen, 2006 Tandem affinity purification revealed the hypusine-dependent binding of eukaryotic initiation factor 5A to the translating 80S ribosomal complex. *J Cell Biochem* 97: 583-598.
- Jao, D. L., e K. Yu Chen, 2002 Subcellular localization of the hypusine-containing eukaryotic initiation factor 5A by immunofluorescent staining and green fluorescent protein tagging. *J Cell Biochem* 86: 590-600.
- Kang, H. A., e J. W. Hershey, 1994 Effect of initiation factor eIF-5A depletion on protein synthesis and proliferation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 269: 3934-3940.
- Kang, H. A., H. G. Schwelberger e J. W. Hershey, 1993 Translation initiation factor eIF-5A, the hypusine-containing protein, is phosphorylated on serine in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 268: 14750-14756.
- Keenan, R. J., D. M. Freymann, R. M. Stroud e P. Walter, 2001 The signal recognition particle. *Annu Rev Biochem* 70: 755-775.
- Kim, K. K., L. W. Hung, H. Yokota, R. Kim e S. H. Kim, 1998 Crystal structures of eukaryotic translation initiation factor 5A from *Methanococcus jannaschii* at 1.8 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 10419-10424.
- Kiss-László, Z., Y. Henry, J. P. Bachellerie, M. Caizergues-Ferrer e T. Kiss, 1996 Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: a novel function for small nucleolar RNAs. *Cell* 85: 1077-1088.
- Klier, H., T. Wohl, C. Eckerskorn, V. Magdolen e F. Lottspeich, 1993 Determination and mutational analysis of the phosphorylation site in the hypusine-containing protein Hyp2p. *FEBS Lett* 334: 360-364.
- Kouba, T., E. Rutkai, M. Karásková e L. Valášek, 2012 The eIF3c/NIP1 PCI domain interacts with RNA and RACK1/ASC1 and promotes assembly of translation preinitiation complexes. *Nucleic Acids Res* 40: 2683-2699.
- Kurat, C. F., J. Recht, E. Radovani, T. Durbic, B. Andrews *et al.*, 2014 Regulation of histone gene transcription in yeast. *Cell Mol Life Sci* 71: 599-613.
- Kuroha, K., M. Akamatsu, L. Dimitrova, T. Ito, Y. Kato *et al.*, 2010 Receptor for activated C kinase 1 stimulates nascent polypeptide-dependent translation arrest. *EMBO Rep* 11: 956-961.
- Landau, G., Z. Bercovich, M. H. Park e C. Kahana, 2010 The role of polyamines in supporting growth of mammalian cells is mediated through their requirement for translation initiation and elongation. *J Biol Chem* 285: 12474-12481.
- Li, F., T. Long, Y. Lu, Q. Ouyang e C. Tang, 2004 The yeast cell-cycle network is robustly designed. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 4781-4786.
- Li, T., B. Belda-Palazón, A. Ferrando e P. Alepuz, 2014 Fertility and polarized cell growth depends on eIF5A for translation of polyproline-rich formins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 197: 1191-1200.
- Li, Z., F. J. Vizeacoumar, S. Bahr, J. Li, J. Warringer *et al.*, 2011 Systematic exploration of essential yeast gene function with temperature-sensitive mutants. *Nat Biotechnol* 29: 361-367.

- Magdolen, V., H. Klier, T. Wohl, F. Klink, H. Hirt *et al.*, 1994 The function of the hypusine-containing proteins of yeast and other eukaryotes is well conserved. *Mol Gen Genet* 244: 646-652.
- Maier, B., T. Ogiwara, A. P. Trace, S. A. Tersey, R. D. Robbins *et al.*, 2010 The unique hypusine modification of eIF5A promotes islet beta cell inflammation and dysfunction in mice. *J Clin Invest* 120: 2156-2170.
- Mani, R., R. P. St Onge, J. L. Hartman, G. Giaever e F. P. Roth, 2008 Defining genetic interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 3461-3466.
- Mason, N., L. F. Ciufo e J. D. Brown, 2000 Elongation arrest is a physiologically important function of signal recognition particle. *EMBO J* 19: 4164-4174.
- McIntosh, K. B., A. Bhattacharya, I. M. Willis e J. R. Warner, 2011 Eukaryotic cells producing ribosomes deficient in Rpl1 are hypersensitive to defects in the ubiquitin-proteasome system. *PLoS One* 6: e23579
- Melamed, D., L. Bar-Ziv, Y. Truzman e Y. Arava, 2010 Asc1 supports cell-wall integrity near bud sites by a Pkc1 independent mechanism. *PLoS One* 5: e11389.
- Murray A., H. T., 1993 The cell cycle: An introduction.
- Murray, A. W., 1995 The genetics of cell cycle checkpoints. *Curr Opin Genet Dev* 5: 5-11.
- Navarre, W. W., S. B. Zou, H. Roy, J. L. Xie, A. Savchenko *et al.*, 2010 PoxA, yjeK, and elongation factor P coordinately modulate virulence and drug resistance in *Salmonella enterica*. *Mol Cell* 39: 209-221.
- Nguyen, C., 2015 Cell cycle regulation in the budding yeast, pp.
- Olsen, G. J., e C. R. Woese, 1997 Archaeal genomics: an overview. *Cell* 89: 991-994.
- Ouzounis, C. A., e N. C. Kyrpides, 1996 The core histone fold: limits to functional versatility. *J Mol Evol* 43: 541-542.
- Park, M. H., 1989 The essential role of hypusine in eukaryotic translation initiation factor 4D (eIF-4D). Purification of eIF-4D and its precursors and comparison of their activities. *J Biol Chem* 264: 18531-18535.
- Park, M. H., 2006 The Post-Translational Synthesis of a Polyamine-Derived Amino Acid, Hypusine, in the Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A (eIF5A). *J Biochem (Tokyo)* 139: 161-169.
- Park, M. H., Y. B. Lee e Y. A. Joe, 1997 Hypusine is essential for eukaryotic cell proliferation. *Biol Signals* 6: 115-123.
- Park, M. H., K. Nishimura, C. F. Zanelli e S. R. Valentini, 2010 Functional significance of eIF5A and its hypusine modification in eukaryotes. *Amino Acids* 38: 491-500.
- Park, M. H., E. C. Wolff e J. E. Folk, 1993a Hypusine: its post-translational formation in eukaryotic initiation factor 5A and its potential role in cellular regulation. *Biofactors* 4: 95-104.
- Park, M. H., E. C. Wolff e J. E. Folk, 1993b Is hypusine essential for eukaryotic cell proliferation? *Trends Biochem Sci* 18: 475-479.
- Peat, T. S., J. Newman, G. S. Waldo, J. Berendzen e T. C. Terwilliger, 1998 Structure of translation initiation factor 5A from *Pyrobaculum aerophilum* at 1.75 Å resolution. *Structure* 6: 1207-1214.
- Phillips P. C., O. S. P., Whitlock M. C., 2000 Beyond the average: the evolutionary importance of gene interactions and variability of epistatic effects. Oxford University Press, Oxford, England.
- Rapoport, T. A., K. E. Matlack, K. Plath, B. Misselwitz e O. Staack, 1999 Posttranslational protein translocation across the membrane of the endoplasmic reticulum. *Biol Chem* 380: 1143-1150.
- Rine, J., 1991 Gene overexpression in studies of *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol* 194: 239-251.

- Rosorius, O., B. Reichart, F. Kratzer, P. Heger, M. C. Dabauvalle *et al.*, 1999 Nuclear pore localization and nucleocytoplasmic transport of eIF-5A: evidence for direct interaction with the export receptor CRM1. *J Cell Sci* 112 (Pt 14): 2369-2380.
- RRothstein, R. J., 1983 One-step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol* 101: 202-211.
- Ruhl, M., M. Himmelsbach, G. M. Bahr, F. Hammerschmid, H. Jaksche *et al.*, 1993 Eukaryotic initiation factor 5A is a cellular target of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain mediating trans-activation. *J Cell Biol* 123: 1309-1320.
- Sadler, I., A. Chiang, T. Kurihara, J. Rothblatt, J. Way *et al.*, 1989 A yeast gene important for protein assembly into the endoplasmic reticulum and the nucleus has homology to DnaJ, an Escherichia coli heat shock protein. *J Cell Biol* 109: 2665-2675.
- Saini, P., D. E. Eyler, R. Green e T. E. Dever, 2009 Hypusine-containing protein eIF5A promotes translation elongation. *Nature* 459: 118-121.
- Schnier, J., H. G. Schwelberger, Z. Smit-McBride, H. A. Kang e J. W. Hershey, 1991 Translation initiation factor 5A and its hypusine modification are essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 11: 3105-3114.
- Schwelberger, H. G., H. A. Kang e J. W. Hershey, 1993 Translation initiation factor eIF-5A expressed from either of two yeast genes or from human cDNA. Functional identity under aerobic and anaerobic conditions. *J Biol Chem* 268: 14018-14025.
- Segev, N., 2001 Ypt/rab gtpases: regulators of protein trafficking. *Sci STKE* 2001: RE11.
- Shi, X. P., K. C. Yin e L. Waxman, 1997 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* 6: 143-149.
- Smit-McBride, Z., J. Schnier, R. J. Kaufman e J. W. Hershey, 1989 Protein synthesis initiation factor eIF-4D. Functional comparison of native and unhypusinated forms of the protein. *J Biol Chem* 264: 18527-18530.
- Spellman, P. T., G. Sherlock, M. Q. Zhang, V. R. Iyer, K. Anders *et al.*, 1998 Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol Biol Cell* 9: 3273-3297.
- Thompson, G. M., V. S. Cano e S. R. Valentini, 2003 Mapping eIF5A binding sites for Dys1 and Lia1: in vivo evidence for regulation of eIF5A hypusination. *FEBS Lett* 555: 464-468.
- Tome, M. E., e E. W. Gerner, 1997 Cellular eukaryotic initiation factor 5A content as a mediator of polyamine effects on growth and apoptosis. *Biol Signals* 6: 150-156.
- Tong, A. H., e C. Boone, 2006 Synthetic genetic array analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol Biol* 313: 171-192.
- Tong, Y., I. Park, B. S. Hong, L. Nedyalkova, W. Tempel *et al.*, 2009 Crystal structure of human eIF5A1: insight into functional similarity of human eIF5A1 and eIF5A2. *Proteins* 75: 1040-1045.
- Ude, S., J. Lassak, A. L. Starosta, T. Kraxenberger, D. N. Wilson *et al.*, 2013 Translation elongation factor EF-P alleviates ribosome stalling at polyproline stretches. *Science* 339: 82-85.
- Valentini, S. R., J. M. Casolari, C. C. Oliveira, P. A. Silver e A. E. McBride, 2002 Genetic interactions of yeast eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) reveal connections to poly(A)-binding protein and protein kinase C signaling. *Genetics* 160: 393-405.
- Visintin, R., K. Craig, E. S. Hwang, S. Prinz, M. Tyers *et al.*, 1998 The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation. *Mol Cell* 2: 709-718.
- Wagih, O., M. Usaj, A. Baryshnikova, B. VanderSluis, E. Kuzmin *et al.*, 2013 SGAtools: one-stop analysis and visualization of array-based genetic interaction screens. *Nucleic Acids Res* 41: W591-596.

- Weir, B. A., e M. P. Yaffe, 2004 Mmd1p, a novel, conserved protein essential for normal mitochondrial morphology and distribution in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* 15: 1656-1665.
- Winzeler, E. A., D. D. Shoemaker, A. Astromoff, H. Liang, K. Anderson *et al.*, 1999 Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* 285: 901-906.
- Wohl, T., H. Klier, H. Ammer, F. Lottspeich e V. Magdolen, 1993 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* 241: 305-311.
- Woolstenhulme, C. J., N. R. Guydosh, R. Green e A. R. Buskirk, 2015 High-precision analysis of translational pausing by ribosome profiling in bacteria lacking EFP. *Cell Rep* 11: 13-21.
- Xu, A., e K. Y. Chen, 2001 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* 276: 2555-2561.
- Xu, A., D. L. Jao e K. Y. Chen, 2004 Identification of mRNA that binds to eukaryotic initiation factor 5A by affinity co-purification and differential display. *Biochem J* 384: 585-590.
- Yanagisawa, T., T. Sumida, R. Ishii, C. Takemoto e S. Yokoyama, 2010 A paralog of lysyl-tRNA synthetase aminoacylates a conserved lysine residue in translation elongation factor P. *Nat Struct Mol Biol* 17: 1136-1143.
- Yao, M., A. Ohsawa, S. Kikukawa, I. Tanaka e M. Kimura, 2003 Crystal structure of hyperthermophilic archaeal initiation factor 5A: a homologue of eukaryotic initiation factor 5A (eIF-5A). *J Biochem (Tokyo)* 133: 75-81.
- Yasutis, K. M., e K. G. Kozminski, 2013 Cell cycle checkpoint regulators reach a zillion. *Cell Cycle* 12: 1501-1509.
- Zanelli, C. F., A. L. Maragno, A. P. Gregio, S. Komili, J. R. Pandolfi *et al.*, 2006 eIF5A binds to translational machinery components and affects translation in yeast. *Biochem Biophys Res Commun* 348: 1358-1366.
- Zanelli, C. F., e S. R. Valentini, 2005 Pkc1 acts through Zds1 and Gic1 to suppress growth and cell polarity defects of a yeast eIF5A mutant. *Genetics* 171: 1571-1581.
- Zhu, H., M. Bilgin, R. Bangham, D. Hall, A. Casamayor *et al.*, 2001 Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science* 293: 2101-2105.
- Zuk, D., e A. Jacobson, 1998 A single amino acid substitution in yeast eIF-5A results in mRNA stabilization. *Embo J* 17: 2914-2925.

ANEXOS

The Deoxyhypusine Synthase Mutant *dys1-1* Reveals the Association of eIF5A and Asc1 with Cell Wall Integrity

Fabio Carrilho Galvão[¶], Danuza Rossi[¶], Wagner da Silva Silveira, Sandro Roberto Valentini, Cleslei Fernando Zanelli*

Department of Biological Sciences, Univ Estadual Paulista – UNESP, Araraquara-Saõ Paulo, Brazil

Abstract

The putative eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) is a highly conserved protein among archaea and eukaryotes that has recently been implicated in the elongation step of translation. eIF5A undergoes an essential and conserved posttranslational modification at a specific lysine to generate the residue hypusine. The enzymes deoxyhypusine synthase (Dys1) and deoxyhypusine hydroxylase (Lia1) catalyze this two-step modification process. Although several *Saccharomyces cerevisiae* eIF5A mutants have importantly contributed to the study of eIF5A function, no conditional mutant of Dys1 has been described so far. In this study, we generated and characterized the *dys1-1* mutant, which showed a strong depletion of mutated Dys1 protein, resulting in more than 2-fold decrease in hypusine levels relative to the wild type. The *dys1-1* mutant demonstrated a defect in total protein synthesis, a defect in polysome profile indicative of a translation elongation defect and a reduced association of eIF5A with polysomes. The growth phenotype of *dys1-1* mutant is severe, growing only in the presence of 1 M sorbitol, an osmotic stabilizer. Although this phenotype is characteristic of Pkc1 cell wall integrity mutants, the sorbitol requirement from *dys1-1* is not associated with cell lysis. We observed that the *dys1-1* genetically interacts with the sole yeast protein kinase C (Pkc1) and Asc1, a component of the 40S ribosomal subunit. The *dys1-1* mutant was synthetically lethal in combination with *asc1Δ* and overexpression of *TIF51A* (eIF5A) or *DYS1* is toxic for an *asc1Δ* strain. Moreover, eIF5A is more associated with translating ribosomes in the absence of Asc1 in the cell. Finally, analysis of the sensitivity to cell wall-perturbing compounds revealed a more similar behavior of the *dys1-1* and *asc1Δ* mutants in comparison with the *pkc1Δ* mutant. These data suggest a correlated role for eIF5A and Asc1 in coordinating the translational control of a subset of mRNAs associated with cell integrity.

Citation: Galvão FC, Rossi D, Silveira WdS, Valentini SR, Zanelli CF (2013) The Deoxyhypusine Synthase Mutant *dys1-1* Reveals the Association of eIF5A and Asc1 with Cell Wall Integrity. PLoS ONE 8(4): e60140. doi:10.1371/journal.pone.0060140

Editor: Gustavo Henrique Goldman, Universidade de São Paulo, Brazil

Received: November 7, 2012; **Accepted:** February 21, 2013; **Published:** April 1, 2013

Copyright: © 2013 Galvão et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants to SRV and CFZ from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and PADC from Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP. The authors also thank FAPESP for fellowships awarded to the authors (FCG and DR). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: zanellifc@fcf.unesp.br

¶ These authors contributed equally to this work.

Introduction

Initially purified from the ribosomes of reticulocyte lysates, the putative eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) was shown to stimulate the synthesis of methionyl-puromycin *in vitro*, indicating a role in the formation of the first peptide bond [1]. However, the depletion of eIF5A in yeast only showed a small decrease in the overall rate of protein synthesis, arguing against an essential role for eIF5A in general translation [2,3]. Therefore, it has been proposed that eIF5A plays a role in the translation of mRNAs encoding specific proteins, such as those required for cell cycle progression [4].

eIF5A has also been implicated in several mechanisms, such as mRNA decay. However, the time of growth arrest of the yeast eIF5A mutants used in the studies do not correlate with the time of mRNA degradation defect [5], the mRNA degradation defect and block of formation of P-bodies is identical to the effect of the translation elongation blocker cycloheximide [6] and another translation elongation mutant, the *cca1-1*, also demonstrate an mRNA degradation defect [7], suggesting that the effect of eIF5A on mRNA decay is actually secondary. Besides, eIF5A was

involved with the nuclear export of HIV1 Rev by the Crm1/Xpo1 transporter [8–10], nevertheless, results generated by other groups failed to confirm physical and functional interactions between eIF5A and HIV-1 Rev or the Crm1/Xpo1 transporter in different experimental models [5,11–14].

Although there might be a role for eIF5A in translation initiation [15], it has been demonstrated that eIF5A physically interacts with the 80S ribosome and translation elongation factors [16,17] and functionally interacts with elongation factor 2 [18]. Furthermore, the accumulation of polysomes and an increase in the average ribosomal transit time has been observed in yeast eIF5A mutants, supporting a role for eIF5A in translation elongation instead of translation initiation [6,19].

Interestingly, eIF5A requires a unique and essential post-translational modification in which a specific lysine is converted to hypusine. This specific lysine (K51 in *S. cerevisiae*) is located at the tip of an exposed loop in the N-terminal domain of eIF5A [20–23]. eIF5A is the only protein containing a hypusine residue, which results from a posttranslational modification in which the enzyme deoxyhypusine synthase (Dys1 in *S. cerevisiae*) transfers an

aminobutyl moiety from polyamine spermidine to the amino group of a specific lysine residue to form deoxyhypusine, followed by the addition of a hydroxyl group, which is catalyzed through deoxyhypusine hydroxylase (Lial in *S. cerevisiae*) activity [4]. Curiously, the deoxyhypusine synthase gene (*DYS1*) is only essential for growth in *S. cerevisiae*, and deoxyhypusine hydroxylase function is only essential in higher eukaryotes [24,25]. Although posttranslational modification is essential for eIF5A activity, and the mechanism of hypusination has been extensively characterized, the role of the hypusine residue in eIF5A remains obscure.

To further investigate the function of eIF5A and its unique hypusine residue, we generated a conditional *DYS1* mutant at the *dys1-1* allele and characterized its hypusine content, growth phenotype, total protein synthesis and polysome profile. We also identified the genetic interactions of the *dys1-1* mutant with *PKC1* and *ASC1* mutants, implicating a role for eIF5A and Asc1 in the maintenance of cell integrity at the translational level in a distinct pathway associated with the well-known Pkc1 pathway.

Results

The Osmotic Stabilizer Requirement for *dys1-1* Growth is not Associated with Cell Lysis

To generate a conditional *DYS1* mutant for the characterization of the role of the hypusine modification in eIF5A, we used site-directed mutagenesis to target conserved residues of deoxyhypusine synthase and selected for mutations that would impair the capacity of the *DYS1* gene to complement a *dys1Δ* yeast strain. Because it has previously been shown that eIF5A mutants exhibit suppression of the temperature-sensitive phenotype in the presence of an osmotic stabilizer such as sorbitol [5,26], we supplemented the growth medium with 1 M sorbitol. One of the mutants generated was able to complement the *dys1Δ* yeast strain in the presence of an osmotic stabilizer at 25°C (permissive condition) and also showed a temperature-sensitive phenotype at 35°C (restrictive condition) (Figure 1A). Furthermore, this mutant exhibited a reduced growth rate, even under the permissive growth condition (Figure 1B). These phenotypes demonstrate a more severe growth defect when compared with eIF5A mutants [5,26].

As expected from the mutation of conserved residues, this mutant carried a T118A substitution in the Dys1 protein. However, two additional and unexpected mutations (W75R and A147T) were revealed in this mutant. When verified, W303 background strains naturally contained R75 and T147 instead of W75 and A147, which are found in S288C background strains. We also generated the T118A mutation in the S288C *DYS1*, but no phenotype was observed. Moreover, a *dys1Δ* yeast strain complemented by either W303 *DYS1* (R75, T147) or S288C *DYS1* (W75, A147) alleles show no distinguishable phenotypes (data not shown). Therefore, although R75 and T147 are naturally occurring variations in the sequence coded by *DYS1* in W303 and do not impair Dys1 function in this background, together with the T118A mutation, they significantly impair Dys1 function. The triple mutant *dys1*^{W75R, T118A, A147T} was named here *dys1-1*.

Mutations in the Pkc1 cell integrity pathway result in an osmolarity support for vegetative growth phenotype due to increased cell lysis [27]. To determine whether the *dys1-1* mutant shows increased lysis compared with the wild type strain, we conducted methylene blue staining and zymolyase sensitivity assays according to standard procedures [28,29]. As observed in the vital staining experiment (Figure 1C), the *dys1-1* mutant revealed almost no cell lysis in the presence of 1 M sorbitol and a small cell lysis defect (<20%) in the absence of 1 M sorbitol,

a condition in which the *dys1-1* mutant does not grow (Figure 1A). A similar result was observed in the experiment using zymolyase (Figure 1D). However, the *pkc1Δ* mutant showed almost 40% cell lysis, even in the presence of 1 M sorbitol, and approximately 80% cell lysis in the absence of 1 M sorbitol. These results suggest a minor cell lysis defect in the *dys1-1* mutant, which could not produce the severe growth impairment observed for this mutant. Therefore, although the *dys1-1* mutant is viable only in the presence of an osmotic stabilizer (1 M sorbitol), this phenotype does not reflect cell lysis, as shown for cell wall integrity mutants, such as *pkc1Δ* [27].

The *dys1-1* Mutant is Hypusine Deficient and shows a Defect in Translation Elongation

To further characterize the *dys1-1* mutant, we first analyzed the expression of Dys1 and hypusine-containing eIF5A protein. The haploid yeast strain, carrying only the *dys1-1* allele, showed a dramatic decrease in Dys1 protein levels and an expected reduction in the amount of hypusine-containing, but not total, eIF5A (Figure 2A and 2B). The quantification of the hypusine-containing eIF5A protein revealed that the *dys1-1* mutant showed a 60% decrease compared with wild type cells (Figure 2C).

As previously demonstrated, different eIF5A mutants display a significant decrease in total cellular protein synthesis, and the polysome profiles showed an increase of polysomes compared with monosomes, consistent with a defect in translation elongation [6,19]. As the modification hypusine is essential for eIF5A activity [24], we examined whether the *dys1-1* mutant strain would also show these defects. As observed in Figure 3A, protein synthesis analysis of the *dys1-1* mutant revealed a 50% decrease in [³H]leucine incorporation in total cellular protein. Moreover, the polysome profile analysis of the *dys1-1* mutant demonstrated a significant increase in the polysome to monosome (P/M) ratio (Figure 3B, upper panels; Figure S4). These results are consistent with defects in translation elongation and support the idea that eIF5A plays a role in this step of protein synthesis. These findings reveal that the reduced levels of hypusine formation in the *dys1-1* mutant results in translation elongation defects similar to those observed for eIF5A mutants [6,17,19,26].

We also investigated the association of eIF5A with ribosomes purified from the fractionation of the polysome profiles of wild type and *dys1-1* mutant strains. Although no decrease in total eIF5A levels was observed in the *dys1-1* mutant (Figure 2B), a significantly reduced amount of eIF5A was associated with polysomal fractions in this mutant (Figure 3B and 3C). This observation is consistent with our previous data showing that the mutant eIF5A^{K51R}, which is defective for hypusine modification, is significantly impaired for ribosome binding [17].

DYS1 and *TIF51A* Genetically Interacts with *ASC1* and eIF5A Binding to Translating Ribosomes is Enhanced in the Absence of Asc1

The overexpression of *PKC1* suppresses the temperature-sensitive phenotype of the *tif51A-1* mutant of eIF5A [5]; therefore, we determined whether the overexpression of *PKC1* also rescues the growth defects of the *dys1-1* mutant. However, neither the requirement for osmolarity support nor the temperature sensitivity of the *dys1-1* mutant was suppressed after the overexpression of *PKC1* (data not shown). We also determined whether the overexpression of inactive (K853R) or constitutively active (R398A) Pkc1 affects the growth of the *dys1-1* mutant. Interestingly, whereas both mutated forms of Pkc1 reduced the growth of the wild type strain (Figure 4A, upper panels), the

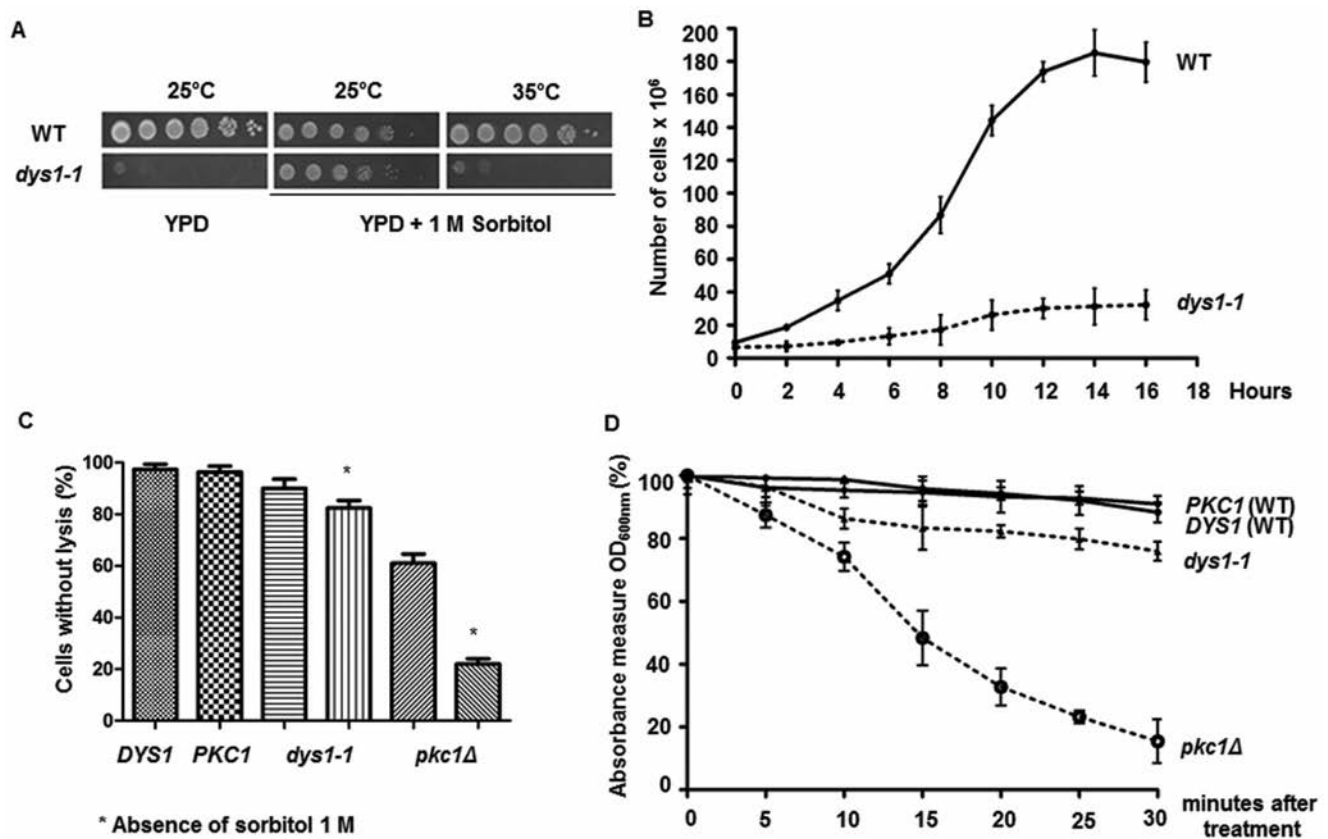


Figure 1. The *dys1-1* mutant shows a severe growth defect that is not associated with cell lysis. (A) Serial dilutions of the wild type and *dys1-1* mutant strains were plated onto YPD medium in the presence or absence of 1 M sorbitol at the indicated temperatures. (B) Growth curves of the wild type and *dys1-1* mutant strains. The strains were grown at 25°C in YPD medium containing 1 M sorbitol, and the cell numbers were counted to monitor the 16-h growth rate. (C) The cells were grown as in Figure 1B, to mid-log phase, treated with methylene blue and counted to analyze the cell lysis. The quantification is shown relative to the wild type (100%). (D) Sensitivity to zymolyase. The cells were grown as in Figure 1C and treated with zymolyase. The turbidity was measured at the indicated time points after the cells were treated with SDS. doi:10.1371/journal.pone.0060140.g001

inactive Pkc1 (K853R) form did not affect the *dys1-1* mutant (Figure 4A, lower panels).

Curiously, the *asc1Δ* mutant also exhibits a marked resistance to the overexpression of the inactive Pkc1 mutant (K853R) [29]. Asc1 is an ortholog of mammalian RACK1, a core component of the small (40S) ribosomal subunit that is also involved in Gpa2 signaling in response to glucose sensing as a G-protein β -subunit [30,31]. Because both eIF5A and Asc1 are directly associated with translation and genetically related to *PKC1*, we characterized the genetic interaction between eIF5A mutants or the *dys1-1* mutant with the *asc1Δ* mutant.

Notably, an intron of *ASC1* contains the gene *SNR24* encoding for the small nucleolar RNA (snoRNA) U24 [32], which is involved in the maturation of the large subunit rRNA [33]. To distinguish the genetic interactions with *ASC1* from those with *SNR24*, the genetic analysis was performed in a double *asc1Δ snr24Δ* haploid mutant strain complemented with *ASC1* (without *SNR24*), *SNR24* alone or the entire *ASC1* gene (*ASC1+SNR24*) (Figure S1).

Although a clear synthetic lethality between the eIF5A mutants and the *asc1Δ* mutant was not observed (data not shown), the haploid strain harboring both *dys1-1* and *asc1Δ* alleles was not viable, suggesting synthetic lethality between these two genes (Figure 4B). This genetic interaction was specific to the absence of *ASC1* alone, as the strain without the *SNR24* gene did not exhibit a synthetic lethality with the *dys1-1* mutant. This synthetic lethality

between *dys1-1* and *asc1Δ* suggests that wild type levels of hypusine-containing eIF5A in the cell are necessary to compensate for the absence of Asc1 function, and therefore both proteins might function at the translational level to ensure the correct expression of the genes associated with cell wall integrity.

We further examined whether the overexpression of *ASC1* was able to suppress the conditional growth phenotypes of the eIF5A and *dys1-1* mutants. However, no suppression was observed (Figure S2). We also examined the effect of eIF5A (*TIF51A*) and *DYS1* overexpression in the *asc1Δ* mutant. As shown in Figure 4C, the overexpression of both *TIF51A* or *DYS1* was toxic in the *asc1Δ* mutant (lower panels), but had no effect on the growth of the wild type *ASC1* strain (upper panels). This toxic effect was reproducible and suggests that eIF5A and Asc1 act in a competitive manner to differentially regulate mRNA translation in the cell.

We also tested whether presence or absence of Asc1 in the cell influences eIF5A binding to ribosomes. As shown in Figure 5, quantification of eIF5A binding to ribosomes, relative to ribosomal protein L5 as a loading control, demonstrates an increase of eIF5A association with 80S and polysome fractions in the absence of Asc1. The increase in eIF5A binding to translating ribosomes is in agreement with the idea that there must be a balance between Asc1 and eIF5A in the control of protein synthesis.

In addition, to evaluate the biological effects of Asc1 and eIF5A/Dys1 in the cell, we examined the sensitivity of *asc1Δ* and *dys1-1* mutants to three compounds that affect cytoplasmic

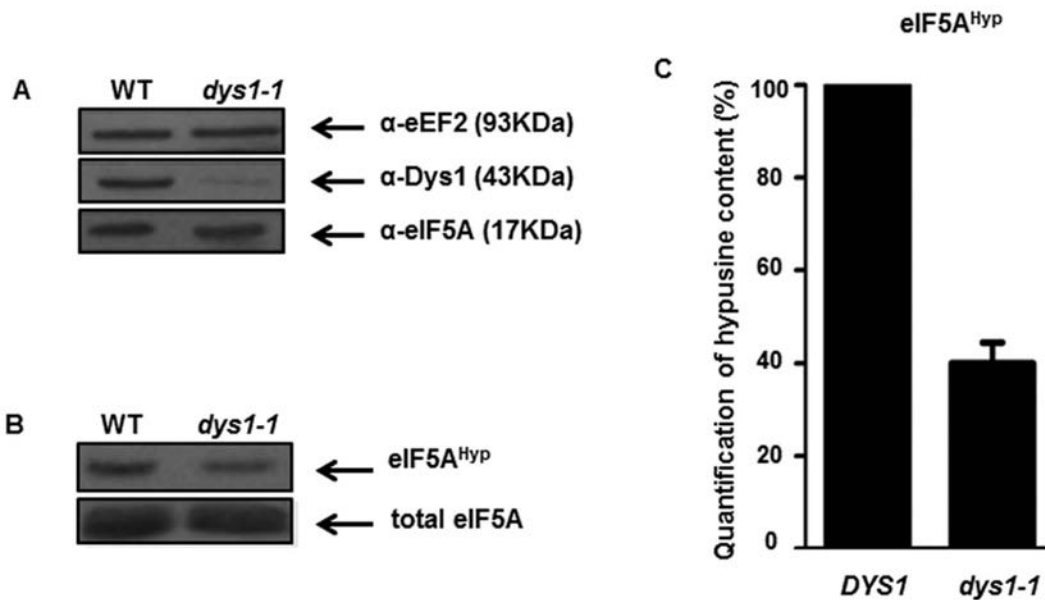


Figure 2. The *dys1-1* mutant reveals a drastic reduction in Dys1 protein levels resulting in a reduction in hypusine-containing eIF5A. (A) Determination of mutant Dys1 protein levels. Wild type and *dys1-1* mutant strains were grown to mid-log phase at the permissive temperature in YPD medium containing 1 M sorbitol. The cells were lysed and 10 μg of total protein were blotted with the indicated antibodies. Samples were probed for eEF2 as a loading control. (B) Detection of hypusine-containing eIF5A of wild type and *dys1-1* mutant strains. Total eIF5A was immunoprecipitated and subjected to SDS-PAGE. Hypusine-containing eIF5A was revealed by autoradiography. (C) Quantification of relative hypusination levels after analysis of hypusine-containing versus total eIF5A, comparing the *dys1-1* mutant with the wild type (*DYS1*) and expressed the quantification as percent of wild type. doi:10.1371/journal.pone.0060140.g002

membrane and/or cell wall integrity: caffeine, a phosphodiesterase inhibitor that activates the Pkc1p-MAP kinase cell integrity pathway; tunicamycin, a general inhibitor of protein N-glycosylation; and caspofungin, an inhibitor of β(1,3)-glucan synthase. The different genetic strain backgrounds significantly affected the sensitivity to some compounds, and the sensitivity analysis using the *tif51A-1* mutant of eIF5A was not informative (data not shown). However, comparing *dys1-1*, *asc1Δ* and *pkc1Δ* with their respective wild type controls revealed that the *dys1-1* and the *asc1Δ* mutants were much less sensitive to all three compounds than the *pkc1Δ* mutant (Figure 6A and 6B). The *asc1Δ* mutant did not show any sensitivity to caspofungin.

These results demonstrate a broader sensitivity of the *pkc1Δ* mutant compared with the *dys1-1* and *asc1Δ* mutants, potentially reflecting a more direct role for Pkc1 in several pathways involved in cell wall maintenance, while Asc1 and the hypusine-containing eIF5A protein might impact the cell membrane and cell wall integrity in a more specific manner through the control of gene expression at the translational level.

Genetic Interaction between *DYS1* and *ASC1* is Dependent on Asc1 Binding to the Ribosome

The association of Asc1 with the 40S ribosomal subunit has been well established, and its association with the ribosome is required for translation-associated functions [34–36]. That is, the absence of Asc1 in the cell causes phenotypes associated with the process of protein synthesis, and *ASC1* point mutations generate Asc1 protein with reduced ribosome binding and also exhibit these phenotypes [34,35]. However, ribosome binding is not required for Asc1 function as a G-protein β-subunit in glucose sensing, as the mutant *asc1^{R38D,K40E}*, which shows reduced binding to the 40S subunit, is not defective in haploid invasive growth [34].

To confirm that the functional link between hypusine-containing eIF5A and Asc1 is associated with translation, we characterized the genetic interaction between the *dys1-1* mutant and the mutants *asc1^{R38D,K40E}* and *asc1^{D109Y}*, which generate Asc1 proteins defective in binding to the 40S ribosomal subunit [34,35]. As shown in Figure 7, *dys1-1* was synthetically lethal with both *asc1^{R38D,K40E}* and *asc1^{D109Y}* mutants, phenocopying the data of synthetic lethality observed between *dys1-1* and *asc1Δ* (Figure 4B). Unfortunately, there is no *ASC1* point mutant that specifically shows defects in the glucose-sensing pathway.

This result suggests that the functions of Asc1 associated with protein synthesis are necessary in the absence of wild type levels of hypusine-containing eIF5A in the cell and further supports the idea that functions of Asc1 and eIF5A in mRNAs the translation are required for cell viability.

Discussion

The functional characterization of the putative translation factor eIF5A has primarily been conducted in the model organism *S. cerevisiae* [37,38]. Although several conditional mutants of eIF5A have previously been isolated and used in different studies, no conditional mutant for the gene encoding the enzyme Dys1, which is responsible for deoxyhypusine formation in eIF5A, has been described so far. As hypusine modification is essential for the function and ribosome binding of eIF5A, the use of a conditional mutant of *DYS1* might provide insight into the aspects specifically associated with the loss of the hypusine residue in eIF5A, instead of using the depletion of eIF5A in the cell. Herein, we describe the generation of a conditional *dys1-1* mutant to further characterize the role of eIF5A and the hypusine residue in the maintenance of cell integrity.

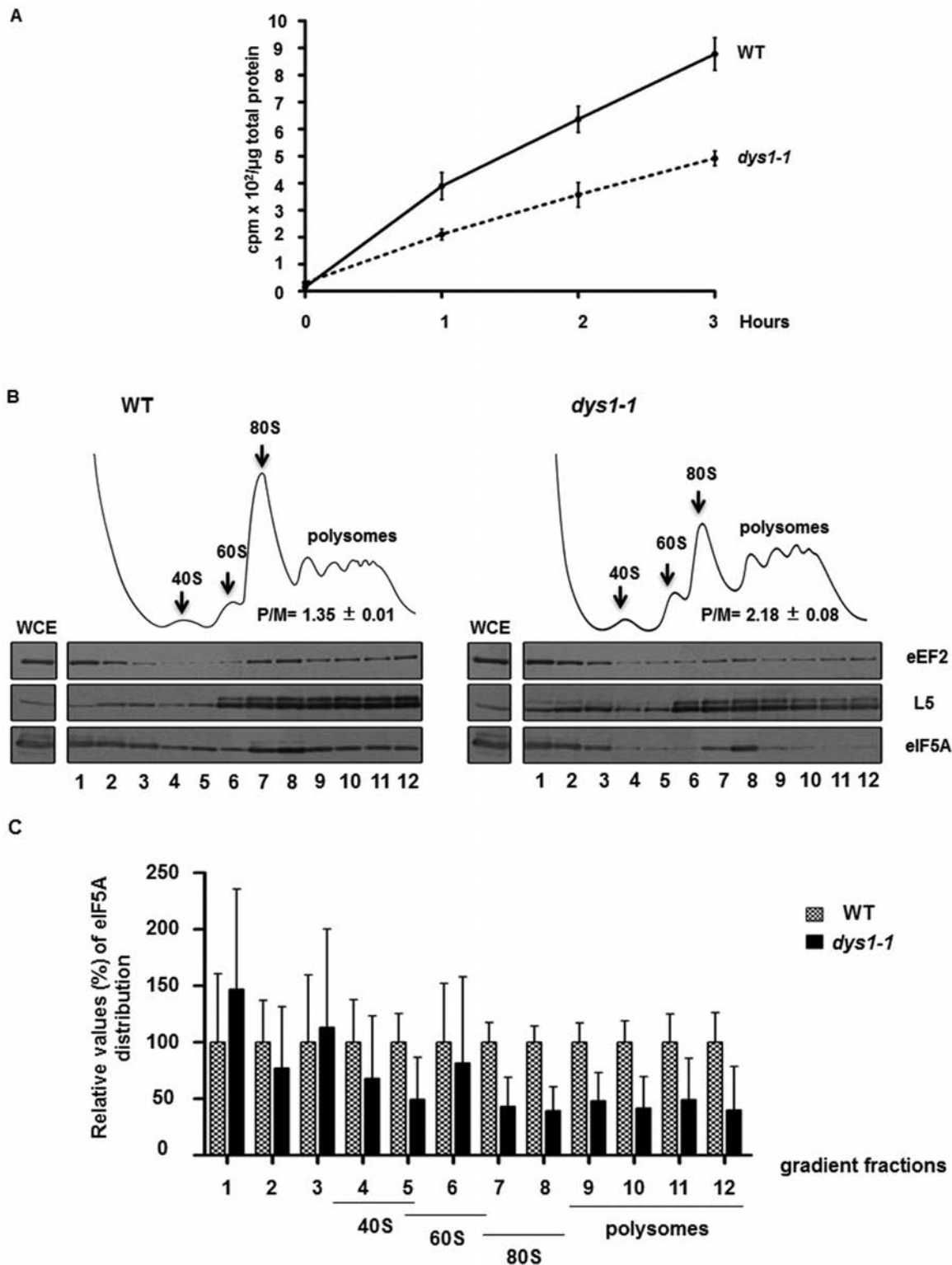


Figure 3. The reduction in hypusine formation in *dys1-1* mutant results in a reduction in total protein synthesis, and the polysome profile is characteristic of translation elongation defects. (A) The indicated strains were grown to mid-log phase, as in Figure 1B and radiolabeled [³H]leucine was added to the medium. The incorporation of [³H]leucine into total proteins was measured as described in the Materials and Methods. (B) Whole cell extracts (WCE) of the indicated strains were fractionated through centrifugation in a sucrose density gradient. Optical scans (OD_{254nm}) of the gradients are shown. The areas of the 80S and polysome peaks were compared to calculate the P/M ratio. The polysome profile fractions and the WCE were collected and blotted against the indicated antibodies. (C) Quantification of the ribosome-bound eIF5A relative to the amount of ribosomes (normalized by ribosomal protein L5) in the polysome profile fractions. The values obtained with the wild type strain were considered as 100% and those obtained with mutant strains were expressed as percentages of the wild type in the bar graphs.

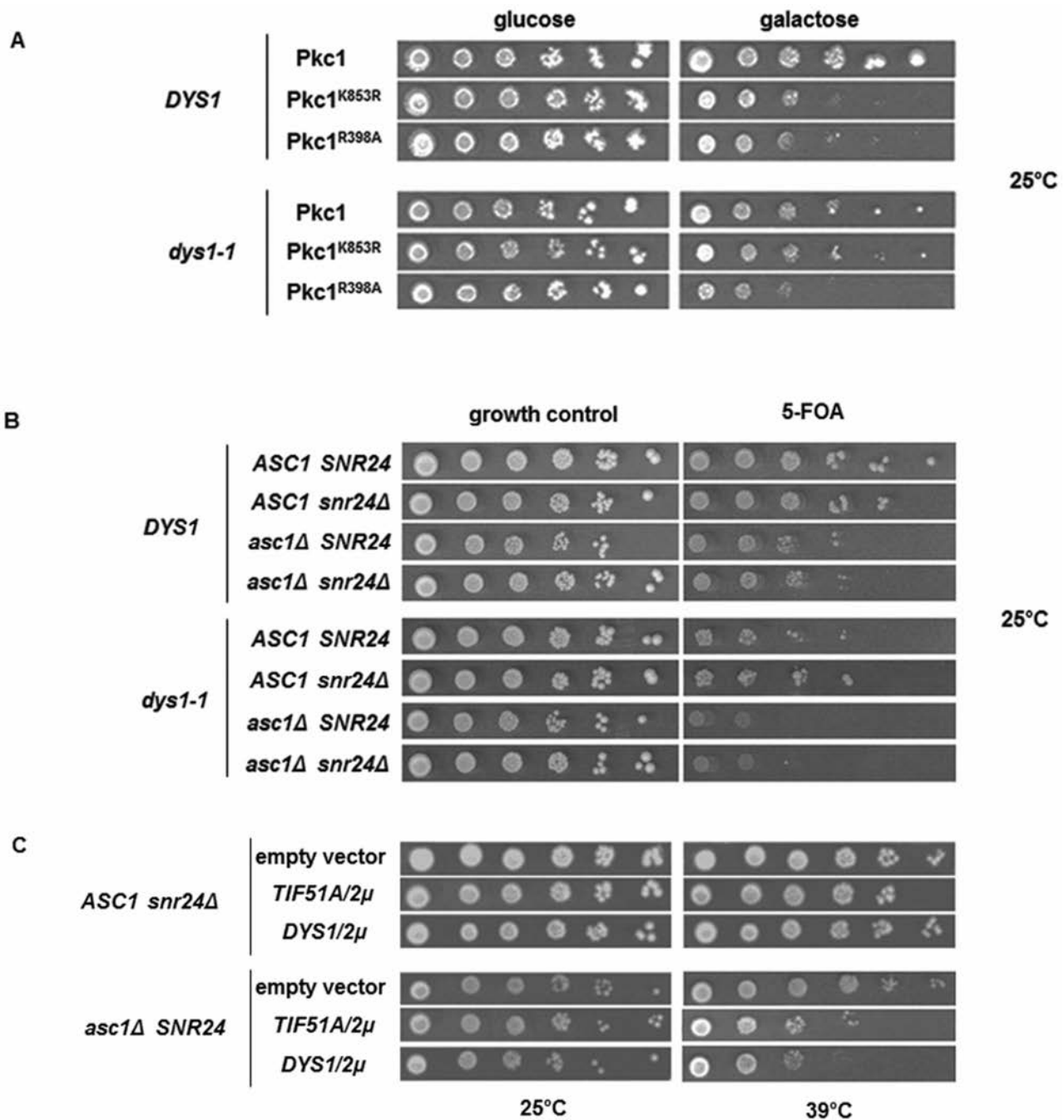


Figure 4. Dys1 and eIF5A genetically interact with Pkc1 and Asc1. (A) The wild type and mutant strains harboring wild type, inactive or constitutively active forms of Pkc1 protein under a galactose-inducible promoter were plated onto SC-ura medium containing 1 M sorbitol plus glucose (growth control) and plus galactose (inducible condition) and grown at 25°C for 3 days. (B) The indicated strains were plated onto medium not containing or containing 5-FOA and grown at 25°C for 3 days for plasmid shuffle. (C) The indicated strains harboring the empty vector, *TIF51A* or *DYS1* high-copy plasmids (2μ) were grown at the permissive and restrictive conditions for 3 days.
doi:10.1371/journal.pone.0060140.g004

The *dys1-1* mutant shows a marked reduction of Dys1 protein levels and a consequent reduction of hypusine-containing eIF5A. Therefore, *dys1-1* is an interesting mutant to study the function of the hypusine residue in eIF5A and compare the effects of hypusine depletion versus total eIF5A depletion in the cell. Although eIF5A is an abundant protein, our data suggest that hypusine content less than half of that of wild type (~40%) in the *dys1-1* mutant is not sufficient to promote protein synthesis optimally and, therefore,

results in severe growth defects. On the other hand, it could be suggested that non-hypusinated eIF5A has a deleterious effect on protein synthesis. However, the non-hypusinated eIF5A^{K51R} protein does not bind to the translational machinery or any other proteins in general [17,39] and, hence, could not compete with hypusine-containing eIF5A. Also, overexpression of the eIF5A^{K51R} mutant had no deleterious effect on growth of a wild type yeast strain (Figure S3). In addition, the conditional mutant

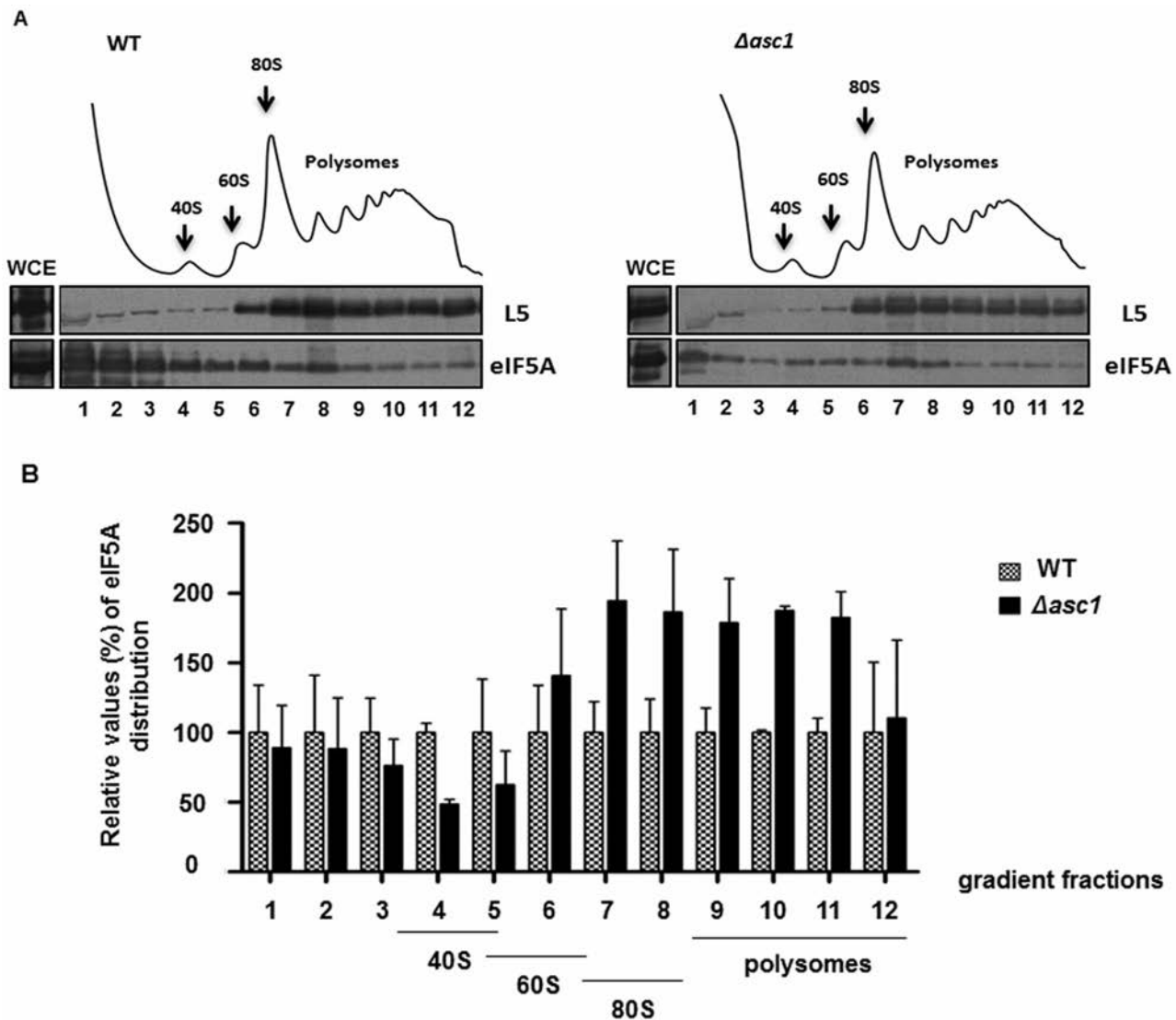


Figure 5. Absence of Asc1 increases association of eIF5A to polysome profile fractions. (A) Whole cell extracts (WCE) of the indicated strains were fractionated through centrifugation in a sucrose density gradient. Optical scans (OD_{254nm}) of the gradients are shown. The polysome profile fractions and the WCE were collected and blotted against the indicated antibodies. (B) Quantification of the ribosome-bound eIF5A relative to the amount of ribosomes (normalized by ribosomal protein L5) in the polysome profile fractions. The values obtained with the wild type strain were considered as 100% and those obtained with mutant strains were expressed as percentages of the wild type in the bar graphs. doi:10.1371/journal.pone.0060140.g005

eIF5A^{K56A}, which shows a reduced content of hypusinated eIF5A to approximately 60% of that of the wild type, also shows a growth defect already at the permissive temperature [26].

In addition to exhibiting defects associated with protein synthesis and translation machinery, the *dys1-1* mutant showed complete dependence on an osmotic stabilizer (1 M sorbitol) for growth, which is a well-known phenotype for mutants of the Pkc1 cell wall integrity pathway, such as the *pkc1Δ* mutant [27]. A similar phenotype has also been observed for temperature-sensitive eIF5A mutants, which are suppressed using an osmotic stabilizer at the restrictive temperature [5,26]. Nevertheless, while the *pkc1Δ* mutant requires an osmotic stabilizer due to lysis of a large fraction of cells in liquid culture (approximately 80%) and exhibits hypersensitivity to zymolyase treatment, the *dys1-1* mutant shows only a modest amount of cell lysis in the absence of osmotic stabilizer (less than 20%) and a minor sensitivity to zymolyase treatment compared with the wild type control. These results

suggest that cell lysis does not influence the severe growth defect phenotype of the *dys1-1* mutant, even in the presence of the osmotic stabilizer. Therefore, we suggest that, although eIF5A is functionally associated with Pkc1 signaling [5], the consequence of depleting the hypusine modification in eIF5A does not completely mimic the lack of Pkc1 function in the cell.

We also show that the *dys1-1* mutant is resistant to the toxic effects of the overexpression of the inactive Pkc1^{K853R} mutant, which is consistent with a previous result obtained for the *tif51A-1* mutant [5]. This genetic interaction further supports the hypothesis that eIF5A and Pkc1 function in different cellular pathways to maintain cell integrity. Because the *asc1Δ* mutant also showed resistance to the toxic effects of the overexpression of the inactive Pkc1^{K853R} mutant [29], we analyzed the functional correlation between eIF5A, Dys1 and Asc1. Interestingly, both eIF5A and Asc1 have previously been associated with the translation of specific mRNAs necessary for correct bud formation

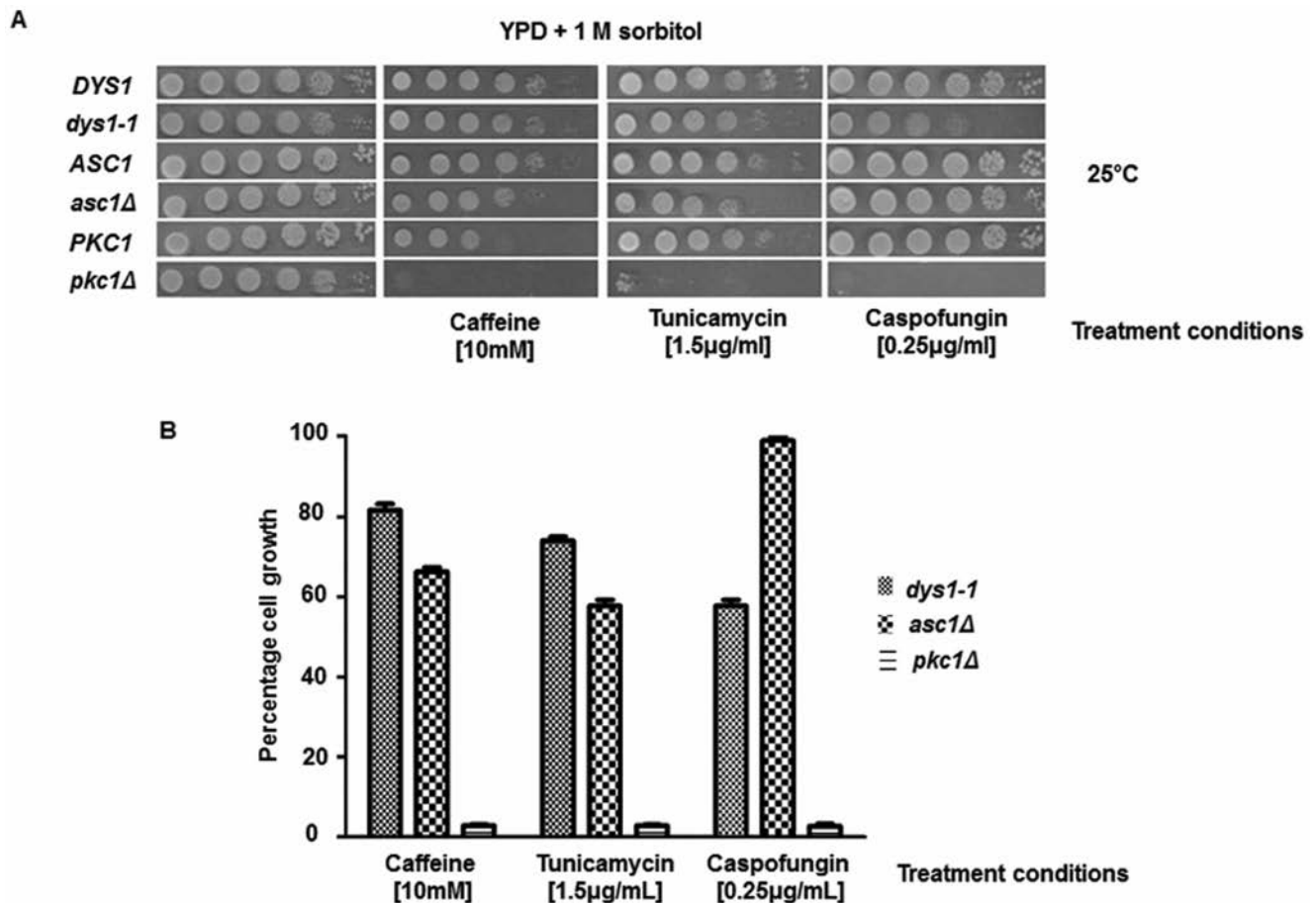


Figure 6. The *Dys1*, *Asc1* and *Pkc1* mutants showed a distinguished sensitivity to compounds affecting cytoplasmic membrane and cell wall integrity. (A) The strains were plated onto medium supplemented with the indicated drugs and grown at 25°C for 3 days. (B) The growth was measured relative to each respective isogenic wild type strain (100%).
doi:10.1371/journal.pone.0060140.g006

during cell cycle progression or bud site localization, respectively [29,40].

The synthetic genetic interaction revealed between the *dys1-1* and *asc1Δ* mutants suggest that these factors are functionally

linked. Moreover, the overexpression of either *TIF51A* or *DYS1* causes cell toxicity in the absence of *ASC1* and eIF5A binding to the translating ribosomes is enhanced in the absence of *Asc1*. Taken together, these genetic interactions suggest that a precise

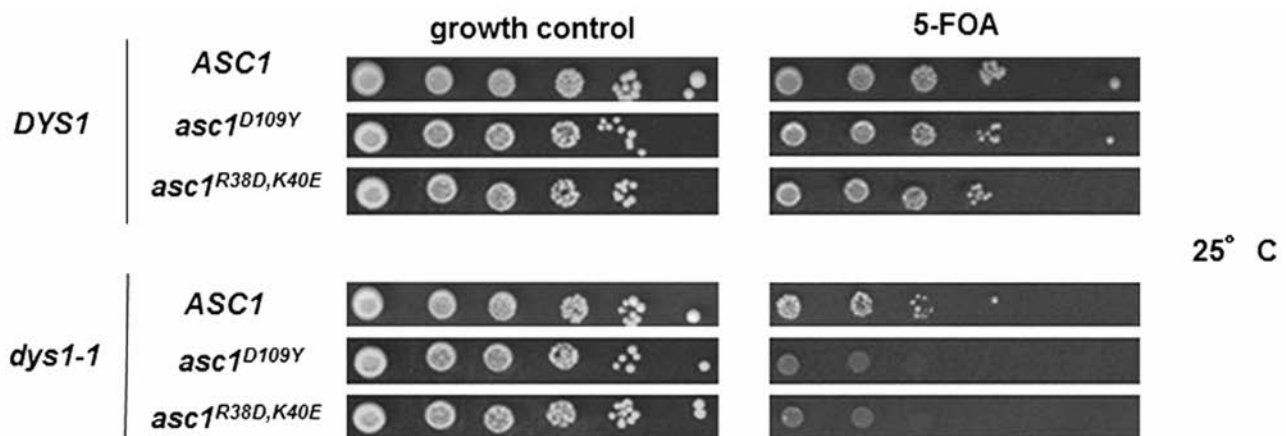


Figure 7. Genetic interaction between *Dys1* and *Asc1* is related to *Asc1* binding to the 40S ribosome subunit. The indicated strains were plated onto medium not containing or containing 5-FOA and grown at 25°C for 3 days for plasmid shuffle.
doi:10.1371/journal.pone.0060140.g007

balance between hypusine-containing eIF5A and Asc1 is necessary for the correct expression of cell integrity-related genes at the translational level. In addition, *dys1-1* and *asc1Δ* mutants tend to show a similar pattern of sensitivity to compounds that interfere with cell integrity and are less sensitive than the *pkc1Δ* mutant. These results further support a closer functional link between eIF5A and Asc1 compared with Pkc1. Furthermore, the genetic interaction between eIF5A/Dys1 and Asc1 is associated with the ability of Asc1 to bind to the 40S ribosomal subunit, confirming that these proteins are associated through their respective functions in translation.

The increased eIF5A binding to translating ribosomes in the absence of Asc1 may favor translation of a group of mRNAs different from those mRNAs recently demonstrated to be regulated by Asc1 [41]. The precise mechanism whereby eIF5A can differentially affect translation of specific mRNAs and which mRNAs are more dramatically influenced by eIF5A function in translation are currently being addressed in our laboratory and further efforts will be necessary to address these questions. Interestingly, the structural homologue of eIF5A in eubacteria, EF-P, has recently been demonstrated to affect membrane integrity, cell response to environmental stresses, virulence and motility [42–47]. Also, EF-P more drastically affects the translation of poly-proline tract-containing proteins [48,49]. However, the precise mRNAs that are translated less in the absence of EF-P to lead to the observed phenotypes are not yet determined. Whether eIF5A also affects translation of proteins harboring consecutive proline residues is also under investigation.

Finally, Asc1 has been implicated in the maintenance of cell wall integrity near bud sites [29], which likely occurs after bud emergence during the G1 phase of the cell cycle. Hypusine-containing eIF5A has also been implicated in cell cycle progression during G1 [40,50] for the positive control of the expression of cell integrity mRNAs, which might also occur in a cell cycle-related manner. The suggestion that eIF5A is more associated with Asc1 than to Pkc1 could explain the discrete cell lysis phenotype observed during the depletion of hypusine modification in eIF5A in the *dys1-1* mutant, and because Pkc1 is important for cell wall integrity during the entire cell cycle, Pkc1 mutants display a major cell lysis defect in the absence of an osmotic stabilizer.

Materials and Methods

Yeast Strains, Plasmids and Standard Procedures

The yeast strains are listed in Table 1. The plasmids used in this study include pRS314 (*TRP1/CEN*), pRS316 (*URA3/CEN*), pRS426 (*URA3/2μ*), pRS424 (*TRP1/2μ*), pSV223 (Gal1 promoter - *PKC1/URA3/2μ*), pSV224 (Gal1 promoter - *PKC1^{K353R}/URA3/2μ*), pSV225 (Gal1 promoter - *PKC1^{R398A}/URA3/2μ*). The procedures for cell growth and genetic manipulations were performed according to standard protocols [51].

Isolation of Conditional *DYS1* Mutants

The *DYS1* mutants were generated using site-directed mutagenesis in which a plasmid vector (pRS314) containing *DYS1* from the W3O3 wild type strain was used as a template. To generate the mutations, site-directed mutagenesis was performed on selected conserved residues in Dys1 using the QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The presence of the specific mutations was confirmed through DNA sequencing. The plasmid constructs containing different mutated *DYS1* alleles were introduced into the SVL452 strain and plated onto SC media supplemented with 5-fluoroorotic acid (5-FOA) to negatively select cells that did not

contain the *URA3* plasmid (plasmid shuffle). The resulting Dys1 mutant strains, which complemented the absence of wild type allele, did not exhibit a temperature-sensitive phenotype. Subsequently, the mutated alleles that did not complement the *dys1Δ* strain were reintroduced into the SVL452 strain and plasmid shuffle was performed in the presence of an osmotic stabilizer (1 M sorbitol), as sorbitol suppresses the thermosensitivity of eIF5A mutants [5].

Western Blot Analysis

To determine specific protein levels in the strains used in this study, the cells were grown to mid-log phase under permissive conditions and subsequently lysed in protein extraction buffer (20 mM Tris/HCl, pH 7.5; 2 mM dithiothreitol; 2 mM EDTA and 5 μg.mL⁻¹ of pepstatin, leupeptin, aprotinin and chymostatin). Total protein was resolved using SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose. The proteins of interest were detected through immunoblotting with specific antibodies using a chemiluminescence detection system.

In vivo Hypusine Synthesis

Yeast strains carrying the wild type or *dys1-1* allele were grown to mid-log phase (OD_{600nm} = 0.5) at 25°C in 5 mL of YPD medium. The cultures were diluted and [³H]spermidine (PerkinElmer, MA, USA) was added to the medium to a final concentration of 7 μCi.mL⁻¹. The cultures were subsequently incubated at 25°C, grown to the log phase (OD_{600nm} = 1.0), harvested at 4°C and frozen at -80°C. The yeast extracts containing radiolabeled eIF5A were subjected to eIF5A immunoprecipitation, as previously described [52]. The cell pellet was resuspended and subjected to SDS-PAGE analysis. The polyacrylamide gel was stained with Coomassie Blue and total eIF5A was observed. To analyze the levels hypusine-containing eIF5A, the polyacrylamide gel was incubated with Amplify (Amersham Bioscience), dried and exposed to an autoradiography film. The quantification was performed using the Image Scanner III and Image Quant TL software (GE Healthcare Life Sciences) and the data were expressed as the percentage relative to the wild type (100%).

Protein Synthesis Assay

Yeast strains carrying the wild type or *dys1-1* allele were grown to mid-log phase (OD_{600nm} = 0.5) at 25°C in 10 mL of YPD medium. [³H]leucine (PerkinElmer, MA, USA) was added to the medium to a final concentration of 2 μCi.mL⁻¹. The cultures were subsequently incubated at 25°C, and 1.5 mL aliquots from the cultures were collected at 1, 2 and 3 h after the addition of [³H]leucine, harvested at 4°C and frozen at -80°C. All frozen cell pellets were resuspended in 15% cold trichloroacetic acid solution and incubated on ice for 15 min. The samples were heated at 72°C for 30 min and subsequently incubated on ice for 15 min. Trichloroacetic acid precipitates were collected using centrifugation (15,000 g, 4°C, 10 min) and washed four times with 10% trichloroacetic acid to remove free [³H]leucine. The final washed pellets were resuspended in 100 μL of 0.2 M NaOH, and 50 μL aliquots were used to determine the radioactivity incorporated during protein synthesis in a Beckman Scintillation Counter (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). The total protein concentration was determined using the BCA protein assay (Thermo Scientific, IL, USA), with 5 μL aliquots of each sample. The amount of total protein synthesis was calculated for each sample as c.p.m.μg⁻¹ total cell protein.

Table 1. Yeast strains used in this study.

Strain	Genotype	Source
SVL82 (W3O3)	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100 ssd1-d</i>	Pamela Silver
SVL95	<i>MATa leu2 trp1 ura3 his4 can1 pkc1::LEU2</i>	Anne McBride
SVL132	<i>MATa leu2 ura3 his3 tif51A::HIS3 [TIF51A/URA3/CEN - pSV138]</i>	Lab Collection
VZL272 (BY4741)	<i>MATa leu2 ura3 his3 met15</i>	Anita Corbett
SVL452	<i>MATa leu2 trp1 ura3 his3 dys1::HIS3 [DYS1/URA3/CEN - pSV526]</i>	This study
SVL453	<i>MATa leu2 trp1 ura3 his3 dys1::HIS3 [DYS1/URA3/CEN - pSV526]</i>	This study
SVL613	<i>MATa leu2 trp1 ura3 his3 dys1::HIS3 [DYS1/TRP1/CEN - pSV520]</i>	This study
SVL 614	<i>MATa leu2 trp1 ura3 his3 dys1::HIS3 [dys1^{W75R,T118A,A147T}/TRP1/CEN - pSV730]</i>	This study
VZL1133	<i>MATa ura3 his3 leu2 met15 asc1::kanMX4</i>	Knockout Collection
VZL1134	<i>MATa ura3 his3 leu2 trp1 met15 asc1::kanMX4 dys1::HIS3 [DYS1/URA3/CEN - pSV526]</i>	This study
VZL1173 (EG123)	<i>MATa leu2 trp1 ura3 his4 can1</i>	Arava Yoav
VZL1178	<i>MATa ura3 his3 trp1 leu2 met15 asc1::kanMX4 tif51A::HIS3 [TIF51A/URA3/CEN - pSV138]</i>	This study

doi:10.1371/journal.pone.0060140.t001

Polysome Profiling using Formaldehyde

The cells from the 100 mL cultures were grown to mid-log phase ($OD_{600nm} = 0.6$) and cross-linked with 1% formaldehyde for 1 h in an ice bath. The extracts were used for each sucrose gradient. Briefly, 15 A_{260nm} units of cell lysates were layered onto 10–50% sucrose gradients and centrifuged for 3 h at 39,000 rpm at 4°C in a Beckman SW41-Ti rotor. The gradients were subsequently fractionated through upward displacement with 60% (w/v) sucrose using a gradient fractionator connected to a Control Unit UV-1 monitor (Amersham Pharmacia Biotech) for the continuous measurement of the absorbance at 254 nm. The polysomal profile fractions were quantified using NIH Image J software. The polysome profile sucrose gradient fractions were collected, and the proteins were precipitated with acetone and subjected to western blot analysis. Quantification of eIF5A associated to ribosomes was performed as before [36]. Briefly, western blot signals of all the fractions were quantified using ImageScanner III (GE Healthcare, Life Sciences) and normalized to 60S ribosomal protein L5 levels, and the mean eIF5A/60S ratio was determined from at least three replicate experiments. The values obtained for the indicated yeast strains were then plotted in percentages relative to wild type.

Growth Analysis

Solid medium. The strains of interest were grown at the permissive condition and equal amounts of the cultures were subsequently harvested. Ten-fold serial dilutions were plated onto specific media (supplemented or not with different compounds) and grown at the indicated temperatures for 3 or 4 days. **Liquid medium (growth curve).** The strains of interest were grown at the permissive condition to mid-log phase and subsequently diluted 10^7 cells/mL⁻¹. At this time, the cells were counted to monitor the time course of growth.

Synthetic Lethality

The double knockouts were generated by standard crossing and sporulation methods. Spores of interest were selected in the presence of geneticin (*asc1Δ::kanMX4*) and absence of histidine and uracil (*dys1Δ::HIS3* harboring *DYS1/URA3/CEN*). The strains were then transformed with *dys1-1/TRP1/CEN* or *DYS1/TRP1/CEN* plasmids and with other plasmids containing the genes indicated in the respective figures. After transformation, a plasmid

shuffle [53], allowed exchange of the *DYS1/URA3/CEN* for the *dys1-1/TRP1/CEN* or *DYS1/TRP1/CEN* plasmids. Briefly, the plasmid shuffle assay was used to select the strains that, due to natural plasmid loss, do not harbor the *URA3* plasmid after growth in media containing uracil. The selection against the *URA3* plasmid is due to the toxic effect of 5-fluoro-orotic acid (5-FOA) in cells that harbor a *URA3* gene, since the 5-FOA is converted into a highly toxic metabolite (5-fluorouracil) by the *URA3* gene product.

Drug Sensitivity Assay

The indicated strains were grown and manipulated as described in Growth analysis for solid medium, plated in the presence of the indicated compounds and grown at 25°C for 3 days. The quantification of cell growth was performed by visual analysis of the plates, considering the growth of the strains in the serially diluted spots, normalized to their respective isogenic wild type strains, assuming growth of wild type strains as 100%. All the growth analyses were performed with 3 different colonies of each strain and repeated 3 times.

Supporting Information

Figure S1 The *dys1-1* mutant grows only in the presence of *ASC1*. The indicated strains harboring *DYS1*, *dys1-1* or empty vector were transformed with *ASC1* (without *SNR24*), *SNR24* alone, the entire *ASC1* gene (*ASC1+ SNR24*) or the empty vector and plated onto medium not containing or containing 5-FOA and grown at 25°C for 3 days for plasmid shuffle. (TIF)

Figure S2 High-copy *ASC1* did not suppress the *dys1-1* and *tif51A-1* growth defects. The *dys1-1* and *tif51A-1* mutants harboring *ASC1* in high-copy plasmid (2 μ) were grown at permissive and restrictive conditions for 3 days. (TIF)

Figure S3 Overexpression of eIF5A^{K51R} does not affect growth of wild type cells. Serial dilutions of wild type SVL272 transformed with vector pYES2, pSV975 (pYES2-*TIF51A*) and pSV976 (pYES2-*tif51A^{K51R}*) were plated onto SC-ura supplemented with 2% glucose (growth control) or galactose (to induce heterologous eIF5A expression) and incubated at permissive temperature for 2 days.

(TIF)

Figure S4 Polysome profiling of *dys1-1* mutant after treatment with cycloheximide reveals the same defect found following formaldehyde crosslinking. Whole cell extracts (WCE) of the indicated strains, after treatment with cycloheximide, were fractionated through centrifugation in a sucrose density gradient. Optical scans (OD_{254nm}) of the gradients are shown. The areas of the 80S and polysome peaks were compared to calculate the P/M ratio.

(TIF)

Method S1 Polysome profiling using cycloheximide. The cells from 200-mL cultures were grown to mid-log phase and treated with 10 µg/mL of cycloheximide for 5 min. The extracts were used for each sucrose gradient. Briefly, 20 A_{260nm} units of cell lysates were layered onto 7–47% sucrose gradients containing 10 µg/mL of cycloheximide and centrifuged for 3 h at

39,000 rpm at 4°C in a Beckman SW41-Ti rotor. The analysis of the gradients, collections of the fractions and quantification were performed as in the protocol for polysome profiling using crosslinking.

(DOC)

Acknowledgments

The authors thank Anne McBride for critical reading of this manuscript and valuable suggestions.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CFZ SRV. Performed the experiments: FCG DR WdSS. Analyzed the data: FCG DR CFZ. Contributed reagents/materials/analysis tools: FCG DR WdSS. Wrote the paper: FCG DR CFZ SRV.

References

- Acker MG, Koltitz SE, Mitchell SF, Nanda JS, Lorsch JR (2007) Reconstitution of yeast translation initiation. *Methods Enzymol* 430: 111–145.
- Kang HA, Hershey JW (1994) Effect of initiation factor eIF-5A depletion on protein synthesis and proliferation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 269: 3934–3940.
- Zuk D, Jacobson A (1998) A single amino acid substitution in yeast eIF-5A results in mRNA stabilization. *Embo Journal* 17: 2914–2925.
- Park MH, Lee YB, Joe YA (1997) Hypusine is essential for eukaryotic cell proliferation. *Biological Signals* 6: 115–123.
- Valentini SR, Casolari JM, Oliveira CC, Silver PA, McBride AE (2002) Genetic interactions of yeast eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) reveal connections to poly(A)-binding protein and protein kinase C signaling. *Genetics* 160: 393–405.
- Gregio AP, Cano VP, Avaca JS, Valentini SR, Zanelli CF (2009) eIF5A has a function in the elongation step of translation in yeast. *Biochem Biophys Res Commun* 380: 785–790.
- Peltz SW, Donahue JL, Jacobson A (1992) A mutation in the tRNA nucleotidyltransferase gene promotes stabilization of mRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 12: 5778–5784.
- Ruhl M, Himmelsbach M, Bahr GM, Hammerschmidt F, Jaksche H, et al. (1993) Eukaryotic initiation factor 5A is a cellular target of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain mediating transactivation. *J Cell Biol* 123: 1309–1320.
- Bevec D, Jaksche H, Ofi M, Wohl T, Himmelsbach M, et al. (1996) Inhibition of HIV-1 replication in lymphocytes by mutants of the Rev cofactor eIF-5A. *Science* 271: 1858–1860.
- Rosorius O, Reichart B, Kratzer F, Heger P, Dabauvalle MC, et al. (1999) Nuclear pore localization and nucleocytoplasmic transport of eIF-5A: evidence for direct interaction with the export receptor CRM1. *J Cell Sci* 112 (Pt 14): 2369–2380.
- Henderson BR, Percipalle P (1997) 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* 274: 693–707.
- Shi XP, Yin KC, Waxman L (1997) 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* 6: 143–149.
- Lipowsky G, Bischoff FR, Schwarzmaier P, Kraft R, Kostka S, et al. (2000) Exportin 4: a mediator of a novel nuclear export pathway in higher eukaryotes. *Embo J* 19: 4362–4371.
- Jao DL, Yu Chen K (2002) Subcellular localization of the hypusine-containing eukaryotic initiation factor 5A by immunofluorescent staining and green fluorescent protein tagging. *J Cell Biochem* 86: 590–600.
- Henderson A, Hershey JW (2011) Eukaryotic translation initiation factor (eIF) 5A stimulates protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 6415–6419.
- Jao DLE, Chen KY (2006) Tandem affinity purification revealed the hypusine-dependent binding of eukaryotic initiation factor 5A to the translating 80S ribosomal complex. *Journal of Cellular Biochemistry* 97: 583–598.
- Zanelli CF, Maragno AL, Gregio AP, Komili S, Pandolfi JR, et al. (2006) eIF5A binds to translational machinery components and affects translation in yeast. *Biochem Biophys Res Commun* 348: 1358–1366.
- Dias CA, Gregio AP, Rossi D, Galvão FC, Watanabe TF, et al. (2011) eIF5A interacts functionally with eEF2. *Amino Acids*.
- Saini P, Eyler DE, Green R, Dever TE (2009) Hypusine-containing protein eIF5A promotes translation elongation. *Nature* 459: 118–121.
- Kim KK, Hung LW, Yokota H, Kim R, Kim SH (1998) Crystal structures of eukaryotic translation initiation factor 5A from *Methanococcus jannaschii* at 1.8 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 10419–10424.
- Peat TS, Newman J, Waldo GS, Berendzen J, Terwilliger TC (1998) Structure of translation initiation factor 5A from *Pyrobaculum aerophilum* at 1.75 Å resolution. *Structure* 6: 1207–1214.
- Tong Y, Park I, Hong BS, Nedyalkova L, Tempel W, et al. (2009) Crystal structure of human eIF5A1: insight into functional similarity of human eIF5A1 and eIF5A2. *Proteins* 75: 1040–1045.
- Yao M, Ohsawa A, Kikukawa S, Tanaka I, Kimura M (2003) Crystal structure of hyperthermophilic archaeal initiation factor 5A: A homologue of eukaryotic initiation factor 5A (eIF-5A). *Journal of Biochemistry* 133: 75–81.
- Park MH (2006) The Post-Translational Synthesis of a Polyamine-Derived Amino Acid, Hypusine, in the Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A (eIF5A). *J Biochem (Tokyo)* 139: 161–169.
- Thompson GM, Cano VSP, Valentini SR (2003) Mapping eIF5A binding sites for Dys1 and Lia1: in vivo evidence for regulation of eIF5A hypusination. *Febs Letters* 555: 464–468.
- Dias CA, Cano VS, Rangel SM, Apponi LH, Frigieri MC, et al. (2008) Structural modeling and mutational analysis of yeast eukaryotic translation initiation factor 5A reveal new critical residues and reinforce its involvement in protein synthesis. *Febs J* 275: 1874–1888.
- Levin DE (2011) Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. *Genetics* 189: 1145–1175.
- Krause SA, Gray JV (2002) The protein kinase C pathway is required for viability in quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Biol* 12: 588–593.
- Melamed D, Bar-Ziv L, Truzman Y, Arava Y (2010) Asc1 supports cell-wall integrity near bud sites by a Pkc1 independent mechanism. *PLoS One* 5: e11389.
- Gerbasi VR, Weaver CM, Hill S, Friedman DB, Link AJ (2004) Yeast Asc1p and mammalian RACK1 are functionally orthologous core 40S ribosomal proteins that repress gene expression. *Mol Cell Biol* 24: 8276–8287.
- Zeller CE, Parnell SC, Dohlman HG (2007) The RACK1 ortholog Asc1 functions as a G-protein beta subunit coupled to glucose responsiveness in yeast. *J Biol Chem* 282: 25168–25176.
- Chantrel Y, Gaisne M, Lions C, Verdère J (1998) The transcriptional regulator Hap1p (Cyp1p) is essential for anaerobic or heme-deficient growth of *Saccharomyces cerevisiae*: Genetic and molecular characterization of an extragenic suppressor that encodes a WD repeat protein. *Genetics* 148: 559–569.
- Kiss-László Z, Henry Y, Bachelier JP, Caizergues-Ferrer M, Kiss T (1996) Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: a novel function for small nucleolar RNAs. *Cell* 85: 1077–1088.
- Coyle SM, Gilbert WV, Doudna JA (2009) Direct link between RACK1 function and localization at the ribosome in vivo. *Mol Cell Biol* 29: 1626–1634.
- Kuroha K, Akamatsu M, Dimitrova L, Ito T, Kato Y, et al. (2010) Receptor for activated C kinase 1 stimulates nascent polypeptide-dependent translation arrest. *EMBO Rep* 11: 956–961.
- Kouba T, Rutkai E, Karásková M, Valášek L (2012) The eIF3c/NIP1 PCI domain interacts with RNA and RACK1/ASC1 and promotes assembly of translation preinitiation complexes. *Nucleic Acids Res* 40: 2683–2699.
- Park MH, Nishimura K, Zanelli CF, Valentini SR (2010) Functional significance of eIF5A and its hypusine modification in eukaryotes. *Amino Acids* 38: 491–500.
- Dever TE, Green R (2012) The elongation, termination, and recycling phases of translation in eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4.
- Jao DL, Chen KY (2006) Tandem affinity purification revealed the hypusine-dependent binding of eukaryotic initiation factor 5A to the translating 80S ribosomal complex. *J Cell Biochem* 97: 583–598.
- Zanelli CF, Valentini SR (2005) Pkc1 acts through Zds1 and Gic1 to suppress growth and cell polarity defects of a yeast eIF5A mutant. *Genetics* 171: 1571–1581.

41. Rachfall N, Schmitt K, Bandau S, Smolinski N, Ehrenreich A, et al. (2013) RACK1/Asc1p, a Ribosomal Node in Cellular Signaling. *Mol Cell Proteomics* 12: 87–105.
42. Bearson SM, Bearson BL, Brunelle BW, Sharma VK, Lee IS (2011) A mutation in the *poxA* gene of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium alters protein production, elevates susceptibility to environmental challenges, and decreases swine colonization. *Foodborne Pathog Dis* 8: 725–732.
43. Kaniga K, Compton MS, Curtiss R, Sundaram P (1998) Molecular and functional characterization of *Salmonella enterica* serovar typhimurium *poxA* gene: effect on attenuation of virulence and protection. *Infect Immun* 66: 5599–5606.
44. Navarre WW, Zou SB, Roy H, Xie JL, Savchenko A, et al. (2010) *PoxA*, *yjeK*, and elongation factor P coordinately modulate virulence and drug resistance in *Salmonella enterica*. *Mol Cell* 39: 209–221.
45. Peng WT, Banta LM, Charles TC, Nester EW (2001) The *chvH* locus of *Agrobacterium* encodes a homologue of an elongation factor involved in protein synthesis. *J Bacteriol* 183: 36–45.
46. Zou SB, Roy H, Ibba M, Navarre WW (2011) Elongation factor P mediates a novel post-transcriptional regulatory pathway critical for bacterial virulence. *Virulence* 2: 147–151.
47. Zou SB, Hersch SJ, Roy H, Wiggers JB, Leung AS, et al. (2012) Loss of elongation factor P disrupts bacterial outer membrane integrity. *J Bacteriol* 194: 413–425.
48. Ude S, Lassak J, Starosta AL, Kraxenberger T, Wilson DN, et al. (2013) Translation elongation factor EF-P alleviates ribosome stalling at polyproline stretches. *Science* 339: 82–85.
49. Doerfel LK, Wohlgemuth I, Kothe C, Peske F, Urlaub H, et al. (2013) EF-P is essential for rapid synthesis of proteins containing consecutive proline residues. *Science* 339: 85–88.
50. Yu L, Peña Castillo L, Mnaimneh S, Hughes TR, Brown GW (2006) A survey of essential gene function in the yeast cell division cycle. *Mol Biol Cell* 17: 4736–4747.
51. Guthrie C, Fink GRE (1991) *Guide to Yeast Genetics*. Academic Press, New York, NY.
52. Kang HA, Schwelberger HG, Hershey JW (1993) Translation initiation factor eIF-5A, the hypusine-containing protein, is phosphorylated on serine in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 268: 14750–14756.
53. Lorsh J (2007). *Methods in enzymology*. In: Bumjun Lee, Tsuyoshi Udagawa, Chingakham Ranjit Singh, and Katsura Asano. *Yeast Phenotypic Assays on Translational Control*. 105–137.

Supplementary Material and Methods and Figure legends

Polysome profiling using cycloheximide

The cells from 200-mL cultures were grown to mid-log phase and treated with 10 µg/mL of cycloheximide for 5 min. The extracts were used for each sucrose gradient. Briefly, 20 A_{260nm} units of cell lysates were layered onto 7-47% sucrose gradients containing 10 µg/mL of cycloheximide and centrifuged for 3 h at 39,000 rpm at 4°C in a Beckman SW41-Ti rotor. The analysis of the gradients, collections of the fractions and quantification were performed as in the protocol for polysome profiling using crosslinking.

Supplementary Figure S1. The *dys1-1* mutant grows only in the presence of *ASC1*. The indicated strains harboring *DYS1*, *dys1-1* or empty vector were transformed with *ASC1* (without *SNR24*), *SNR24* alone, the entire *ASC1* gene (*ASC1* + *SNR24*) or the empty vector and plated onto medium not containing or containing 5-FOA and grown at 25°C for 3 days for plasmid shuffle.

Supplementary Figure S2. High-copy *ASC1* did not suppress the *dys1-1* and *tif51A-1* growth defects. The *dys1-1* and *tif51A-1* mutants harboring *ASC1* in high-copy plasmid (2µ) were grown at permissive and restrictive conditions for 3 days.

Supplementary Figure S3. Overexpression of eIF5A^{K51R} does not affect growth of wild type cells. Serial dilutions of wild type SVL272 transformed with vector pYES2, pSV975 (pYES2-*TIF51A*) and pSV976 (pYES2-*tif51A*^{K51R}) were plated onto SC-ura supplemented with 2% glucose (growth control) or galactose (to induce heterologous eIF5A expression) and incubated at permissive temperature for 2 days.

Supplementary Figure S4. Polysome profiling of *dys1-1* mutant after treatment with cycloheximide reveals the same defect found following formaldehyde crosslinking. Whole cell extracts (WCE) of the indicated

strains, after treatment with cycloheximide, were fractionated through centrifugation in a sucrose density gradient. Optical scans (OD_{254nm}) of the gradients are shown. The areas of the 80S and polysome peaks were compared to calculate the P/M ratio.

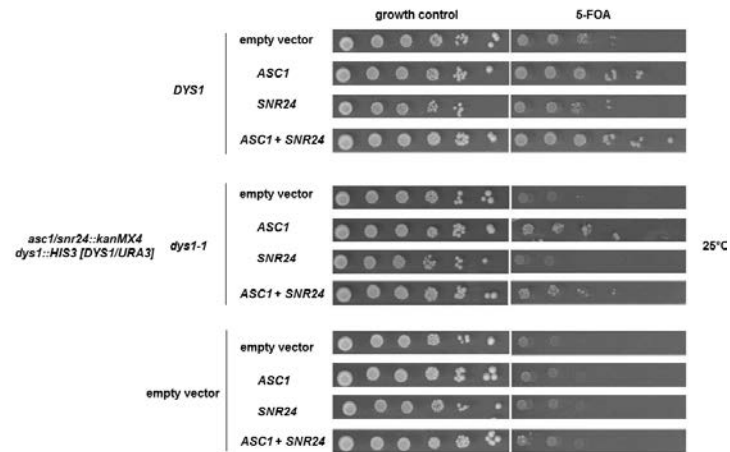


Figure S1

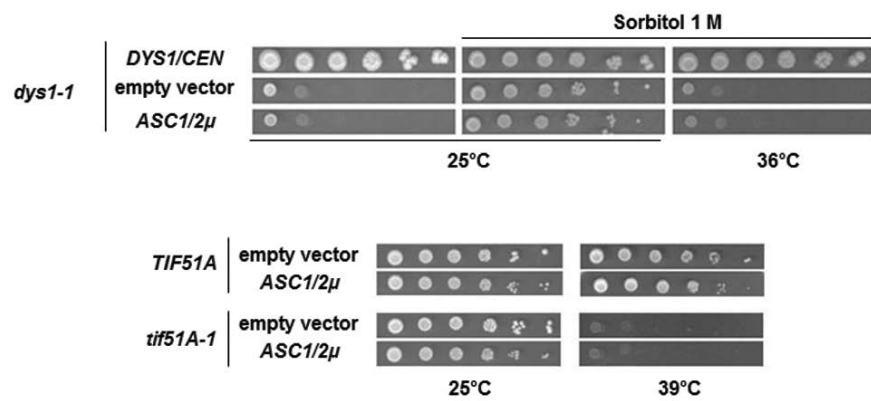


Figure S2

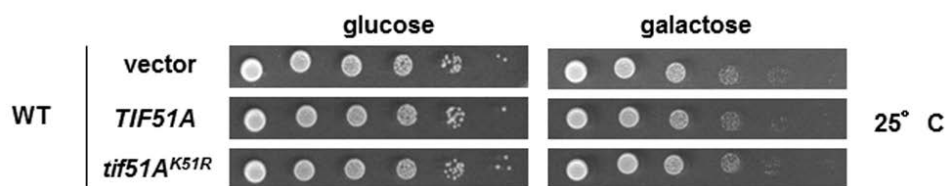


Figure S3

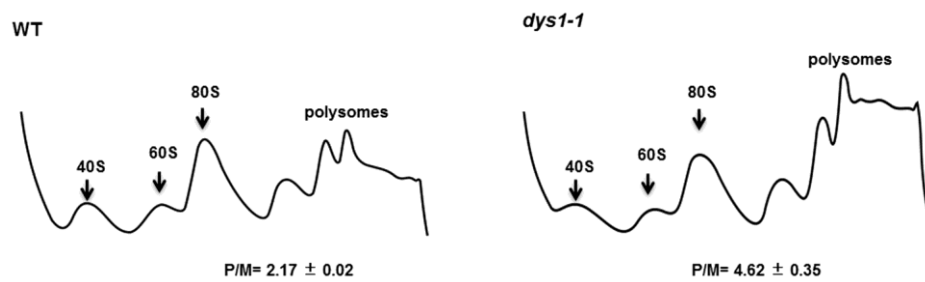


Figure S4

eIF5A has a function in the cotranslational translocation of proteins into the ER

Danuza Rossi · Fabio Carrilho Galvão · Hermano Martins Bellato ·
Paulo E. G. Boldrin · Brenda J. Andrews · Sandro Roberto Valentini ·
Cleslei Fernando Zanelli

Received: 6 May 2013 / Accepted: 1 November 2013 / Published online: 5 December 2013
© Springer-Verlag Wien 2013

Abstract The putative eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) is a highly conserved and essential protein present in all organisms except bacteria. To be activated, eIF5A requires the conversion of a specific residue of lysine into hypusine. This hypusine modification occurs posttranslationally in two enzymatic steps, and the polyamine spermidine is the substrate. Despite having an essential function in translation elongation, the critical role played by eIF5A remains unclear. In addition to demonstrating genetic interactions with translation factors, eIF5A mutants genetically interact with mutations in *YPT1*, which encodes an essential protein involved in endoplasmic reticulum (ER)-to-Golgi vesicle transport. In this study, we investigated the correlation between the function of eIF5A in translation and secretion in yeast. The results of *in vivo* translocation assays and genetic interaction analyses suggest a specific role for eIF5A in the cotranslational translocation of proteins into the ER, but not in the posttranslational pathway. Additionally, we observed that a block in eIF5A activation up-regulates stress-induced chaperones, which also occurs when SRP function is lost. Finally, loss of eIF5A function affects binding of the ribosome-nascent chain complex to SRP. These results link eIF5A function in translation with a role of SRP in the cell

and may help explain the dual effects of eIF5A in differential and general translation.

Keywords Translation elongation · Hypusine · eIF5A · Cotranslational translocation · Endoplasmic reticulum

Abbreviations

eIF5A	Eukaryotic translation initiation factor 5A
<i>TIF51A</i>	Gene encoding eIF5A in yeast
eEF2	Eukaryotic translation elongation factor 2
<i>EFT2</i>	Gene encoding eEF2 in yeast
eEF1A	Eukaryotic translation elongation factor 1A
EF-P	Elongation factor P
SRP	Signal recognition particle
ER	Endoplasmic reticulum
RNC	Ribosome-nascent chain
CPY	Carboxypeptidase Y
DPAP B	Dipeptidyl aminopeptidase B

Introduction

The putative eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) is a highly conserved and essential protein that is present in archaea and eukaryotes but not in bacteria (Schnier et al. 1991; Chen and Liu 1997). It was initially purified from the ribosomes of reticulocyte lysates, and eIF5A was also shown to stimulate the synthesis of methionyl-puromycin *in vitro* (Benne and Hershey 1978). However, a controversy has existed for years about whether eIF5A plays a direct role in translation. Meanwhile, several other functions have been attributed to eIF5A,

D. Rossi · F. C. Galvão · H. M. Bellato ·
P. E. G. Boldrin · S. R. Valentini · C. F. Zanelli (✉)
Department of Biological Sciences, School of Pharmaceutical
Sciences, Univ Estadual Paulista, UNESP, Araraquara, SP,
Brazil
e-mail: zanellicf@fcar.unesp.br

F. C. Galvão · B. J. Andrews
Department of Molecular Genetics, Donnelly Center for
Cellular and Biomolecular Research, University of Toronto,
Toronto, Canada

including roles in cell cycle progression, nucleocytoplasmic transport, mRNA degradation and apoptosis (Zanelli and Valentini 2007; Park et al. 2010; Marra et al. 2007). Nevertheless, it was recently demonstrated that eIF5A physically interacts with the 80S ribosome, as well as with translation elongation factors eEF1A and eEF2. In addition, eIF5A co-fractionates with monosomes and polysomes in a translation-dependent manner (Jao and Chen 2006; Zanelli et al. 2006). Mutants of eIF5A show an accumulation of polysomes instead of polysome run-off, and they cause an increase in the average time required for ribosomes to transit along mRNAs (Gregio et al. 2009; Saini et al. 2009). Moreover, eIF5A interacts functionally with elongation factor eEF2 (Dias et al. 2012). These results not only support the notion that eIF5A plays a direct role in translation but also suggest that its role is specifically in translation elongation rather than translation initiation.

eIF5A is activated by a unique posttranslational modification, in which a specific lysine residue (K51 in yeast) is converted into hypusine over two steps: first, the enzyme deoxyhypusine synthase (Dys1 in yeast) transfers an aminobutyl moiety from the polyamine spermidine to the amino group of the specific lysine residue, forming deoxyhypusine; then, addition of a hydroxyl group is catalyzed by the deoxyhypusine hydroxylase (Lia1 in yeast) (Park et al. 2010).

Although bacteria do not have an eIF5A orthologue, they have instead the elongation factor P (EF-P), which shares important structural features with eIF5A (Park et al. 2010; Dias et al. 2013). EF-P does not contain a hypusine residue; however, in a subset of bacterial species, EF-P does undergo a posttranslational modification which involves the addition of a β -lysine to a specific lysine residue, corresponding to the hypusine modification site in eIF5A (Navarre et al. 2010; Yanagisawa et al. 2010; Bailly and de Crécy-Lagard 2010; Roy et al. 2011; Park et al. 2012). This EF-P modification, called β -lysylation, is analogous to the hypusine modification of eIF5A and is important for the function of EF-P in the translation and cell growth of *E. coli* (Yanagisawa et al. 2010; Park et al. 2012).

The budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* has been used as a model system to study eIF5A, and several genetic interactions have already been identified (Valentini et al. 2002; Zanelli and Valentini 2005; Frigieri et al. 2007, 2008; Dias et al. 2012). One interesting genetic interaction is synthetic lethality caused by mutation of both eIF5A and Ypt1 (Frigieri et al. 2008), a protein essential for the fusion of endoplasmic reticulum (ER) vesicles to the Golgi (Segev 2001). Although we demonstrated that eIF5A does not work directly in the vesicle trafficking, this factor is associated to ribosomes bound to membranes, implying a

function for eIF5A in translation at the ER (Frigieri et al. 2008).

To better understand the link between eIF5A and the secretory pathway, in this study, we analyzed the involvement of eIF5A in the translocation of proteins into the ER. We demonstrate that eIF5A is important for the cotranslational translocation of proteins into the ER, but not for the posttranslational translocation pathway. Additionally, genetic analyses revealed that interactions only occur between eIF5A and factors essential for the cotranslational translocation pathway. Interestingly, when hypusine formation and eIF5A activation are blocked, we observed up-regulation of the expression of stress-induced chaperones, a phenotype also seen in mutants with loss of function of the cotranslational translocation pathway and the consequent accumulation of unfolded proteins in the cytosol. Finally, we show that eIF5A function is important for the ribosome-nascent chain (RNC) complex to bind the signal recognition particle (SRP). Collectively, these

Table 1 The yeast strains used in this study

Strain	Genotype	Source
SVL14	<i>MATa ade2 his3 leu2 trp1 ura3 can1 tif51A-1</i> (P83S)	Lab collection (Valentini et al. 2002)
SVL82	<i>MATa ade2 his3 leu2 trp1 ura3 can1</i>	Lab collection
SVL613	<i>MATa leu2 trp1 ura3 his3 dys1::HIS3 [DYS1/TRP1/CEN]</i> (pSV520)	Lab collection
SVL614	<i>MATa leu2 trp1 ura3 his3 dys1::HIS3 [dys1-1 (W75R, T118A, A147T)/TRP1/CEN]</i> (pSV730)	Lab collection (Galvão et al. 2013)
VZL1021	<i>MATa ura3 leu2 his3 trp1 ade2 sec61-101</i>	Davis Ng
VZL1246	<i>MATa ura3 leu2 his3 trp1 ade2 can1 rpl25::HIS3 [RPL25-GFP/LEU2/CEN]</i>	Martin Pool
VZL1248	<i>MATa ura3 ade2 trp1 leu2 his3 sec65-1</i>	Martin Pool
VZL1257	<i>MATa his3 leu2 ura3 tif51A-1::natMX4 can1 lyp1</i>	Lab collection
VZL1292	<i>MATa ade2 his3 leu2 trp1 ura3 can1 [eft2^{H699K}/2μTRP1]</i> (pVZ1370)	Lab collection
Y07842 ^a	<i>MATa his3 leu2 ura3 sec61-2::kanMX4</i>	Brenda Andrews
Y07900 ^a	<i>MATa his3 leu2 ura3 sec62-ts::kanMX4</i>	Brenda Andrews
Y11000 ^a	<i>MATa his3 leu2 ura3 sec65-1::kanMX4</i>	Brenda Andrews
1623 ^a	<i>MATa his3 leu2 ura3</i>	Brenda Andrews

^a Li et al. (2011)

Table 2 The plasmids used in this study

Plasmid	Description	Source
pSV59	<i>CEN, LEU2</i>	Lab collection
pSV60	<i>CEN, URA3</i>	Lab collection
pSV65	<i>2μ, URA3</i>	Lab collection
pSV107	<i>TIF51A, 2μ, URA3</i>	Lab collection
pSV138	<i>TIF51A, CEN, URA3</i>	Lab collection
pSV146	<i>TIF51A, CEN, LEU2</i>	Lab collection
pSV364	<i>2μ, URA3</i>	Lab collection
pSV374	<i>2μ, LEU2</i>	Lab collection
pVZ1064	<i>SSCPY-URA3, HIS3, CEN</i>	Davis Ng
pVZ1110	<i>GAL1-DAP2-6xHis, 2μ, URA3</i>	Open biosystems/Lab collection
pVZ1359	<i>SEC65, SRP21, SRP72, 2μ, URA3</i>	Colin J. Stirling
pVZ1360	<i>SCR1, SRP14, SRP54, SRP68, 2μ, LEU2</i>	Colin J. Stirling
pVZ1370	<i>eft2^{H699K}, 2μ, TRP1</i>	Lab collection

results reveal a close connection and specific interaction between eIF5A and the translocation of proteins into the ER via the cotranslational pathway.

Materials and methods

Yeast strains, plasmids and standard procedures

The yeast strains and plasmids used in this study are listed in Tables 1 and 2, respectively. The procedures for cell growth and genetic manipulations were performed according to standard protocols (Guthrie and Fink 1991).

Western blot analysis

Yeast strains were grown to mid-log phase and were subsequently lysed in protein extraction buffer (20 mM Tris-HCl, at pH 7.5, 2 mM dithiothreitol, 2 mM EDTA and 5 μg/mL each of pepstatin, leupeptin, aprotinin and chymostatin). Total protein extracts were resolved by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The proteins of interest were detected through immunoblotting, using specific antibodies and the chemiluminescence detection system.

Growth analysis and temperature sensitivity assay

Yeast strains were grown under permissive conditions, and equal amounts of the cultures were subsequently harvested. Tenfold serial dilutions were plated onto specific media and grown at the indicated temperatures for 3 days.

Synthetic genetic interactions

Strains carrying double knockout alleles or mutations were generated by standard crossing and sporulation methods. Spores of interest were grown in the presence of nourseothricin (*tif51A-1::natMX4*) and geneticin to select for other mutant genes (*kanMX4* marker). The strains were then transformed with a plasmid encoding *TIF51A* or an empty vector. Briefly, the plasmid shuffle assay (Lorsch 2007) was used to select the strains that, due to natural plasmid loss, did not harbor the *TIF51A/URA3* plasmid after being grown in media containing uracil. This selection allows for an analysis of the gene interactions both with and without a copy of the wild-type gene in an isogenic background.

Subcellular fractionation

The subcellular fractionation of the lysed cells was based on previously described protocols (Frey et al. 2001; Dalley et al. 2008). The pellet of cells was prepared according to the western blot protocol, including a treatment with 0.1 mg/mL cycloheximide for 5 min just before lysis. The lysates were cleared of cellular debris by centrifugation at 1,200×g for 10 min, and the membranes were pelleted by centrifugation at 18,000×g for 20 min. The pellet was solubilized by the addition of 1.5 % (weight/volume) CHAPS in the presence of 500 mM KOAc. Insoluble materials were removed by high-speed centrifugation. The resulting supernatant was centrifuged for 1 h at 256,000×g to generate a ribosome-enriched pellet and a postribosomal supernatant. The total protein extract (T), postribosomal supernatant (S) and ribosomal-enriched pellet (P) were each analyzed by western blot. The western blot signals of the samples were quantified using ImageScanner III and IQ Tools (GE Healthcare Life Sciences). The values of the pellet fractions, normalized by their respective total fractions, were plotted in percentages relative to the wild type (assuming wild type = 1.0) using Microsoft Excel software (Microsoft, Redmond, Washington, USA).

Results and discussion

A mutant of eIF5A shows a cotranslational translocation defect, which is not due to impaired general translation elongation

Considering the involvement of eIF5A in elongation and its functional connection to the secretory pathway (Frigieri et al. 2008; Gregio et al. 2009), we hypothesized that eIF5A might act during ER-associated protein synthesis.

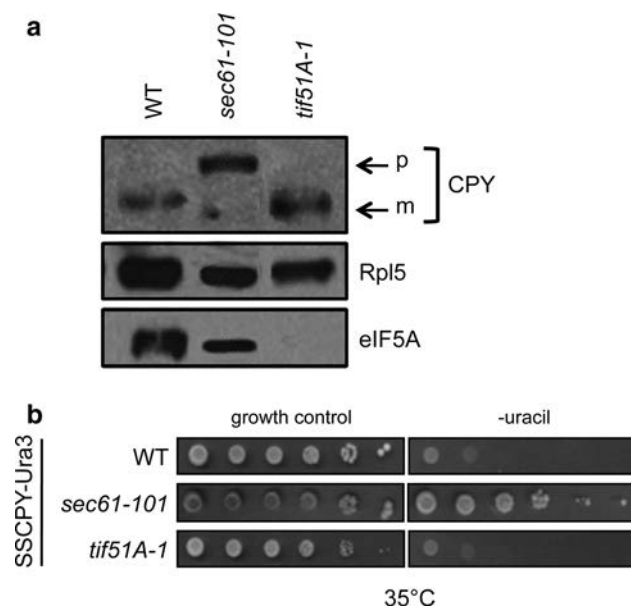


Fig. 1 eIF5A does not play a role in the posttranslational translocation of proteins into the ER. **a** The in vivo translocation of the endogenous CPY protein. The wild-type (SVL82), *sec61-101* (VZL1021) and *tif51A-1* (SVL14) strains were grown to mid-log phase at 25 °C and then shifted to the restrictive temperature (37 °C) during 3 h. Ten micrograms of total protein extract from each strain were immunoblotted with anti-CPY to detect the precursor (pCPY = 69 kDa) and the mature (mCPY = 61 kDa) forms of the protein. Anti-Rpl5 was used as a loading control. Anti-eIF5A was used to detect the protein mutant depletion under restrictive growth conditions. **b** Tenfold serial dilutions of the same strains harboring the reporter SSCPY-Ura3 (pVZ1064) were plated onto SC-histidine (growth control) and SC-uracil to test the ability to grow due to the cytoplasmic accumulation of SSCPY-Ura3. Both plates were incubated at semi-permissive temperature (35 °C) for 3 days

To test this possibility, we used a *tif51A-1* mutant strain, which has depleted eIF5A (Valentini et al. 2002), and reporters of protein translocation into the ER (Ng et al. 1996). Because the mechanisms governing the cotranslational and posttranslational pathways of protein translocation into the ER differ significantly, in particular the factors associated with the translational machinery, we tested reporters specific to both pathways (Ng et al. 1996).

We first investigated the posttranslational pathway using the vacuolar carboxypeptidase Y (CPY) as a reporter. The targeting of CPY to the ER occurs in a SRP-independent manner (Ng et al. 1996). CPY maturation occurs normally in wild-type cells but is abnormal in cells that exhibit a general translocation defect, such as *sec61* mutants (Stirling et al. 1992; Ng et al. 1996). As shown in Fig. 1a, the wild-type strain showed correct sorting of CPY, which undergoes proteolysis to yield its vacuolar mature form (61 kDa), consequently decreasing its molecular weight. As in the wild type, the *tif51A-1* mutant also exhibits only the mature form of CPY. On the other hand, the *sec61-101* mutant exhibits an accumulation of the precursor form of

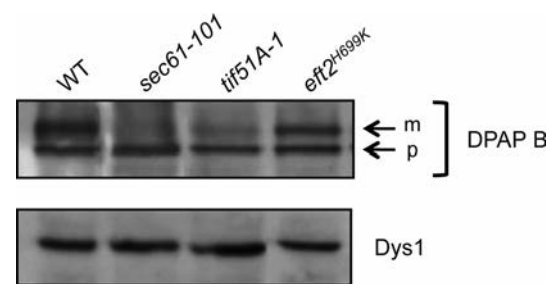


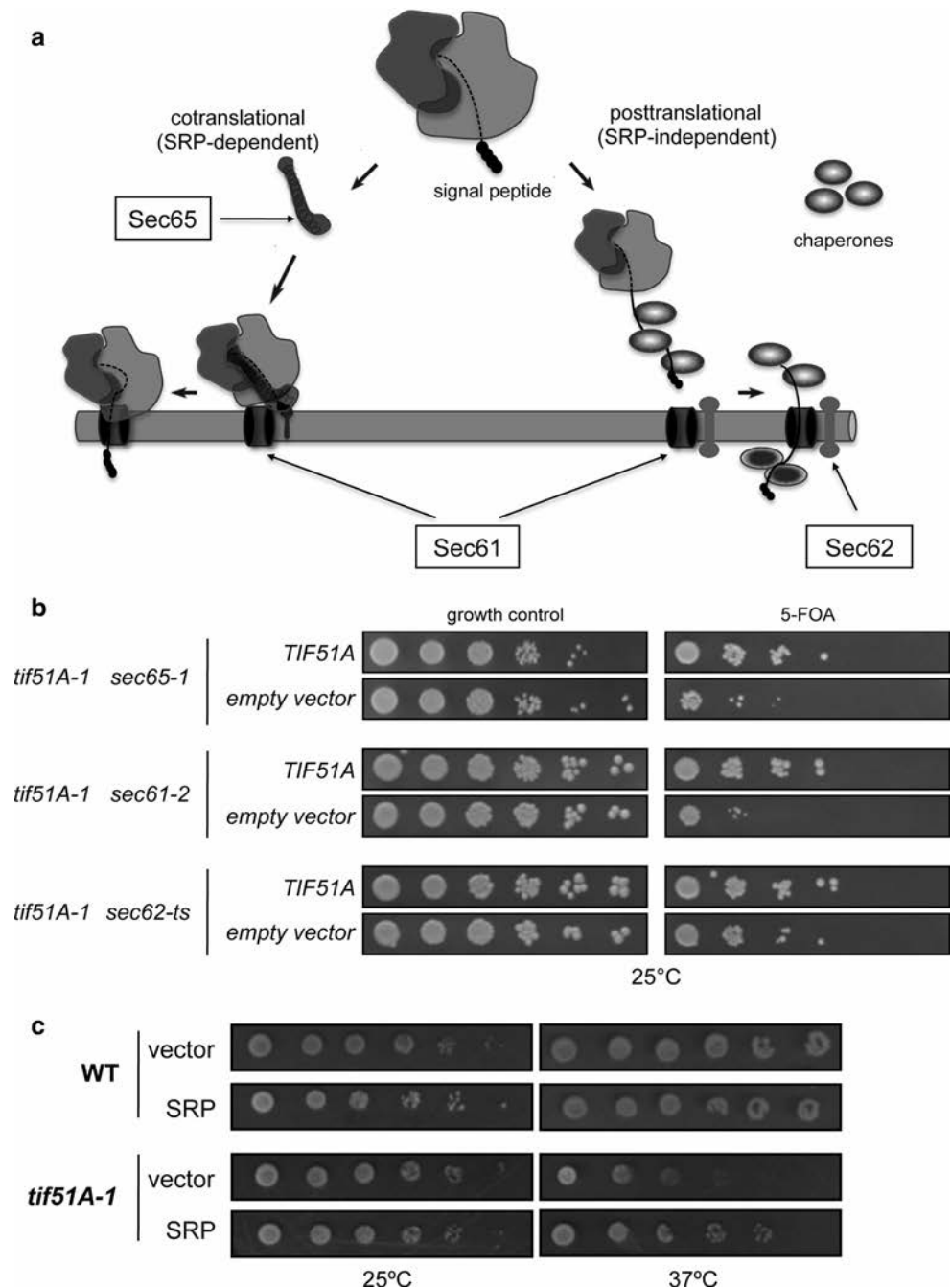
Fig. 2 eIF5A, but not eEF2, plays a role in the cotranslational translocation of proteins into the ER. The wild-type (SVL82), *sec61-101* (VZL1021), *tif51A-1* (SVL14) and *eef2^{H699K}* (SVL1292) strains, all carrying the reporter DPAP B plasmid (pVZ1110), were grown to mid-log phase at the permissive temperature (25 °C). The expression of the reporter DPAP B was induced by the addition of 2 % galactose for 3 h. For SVL14, SVL82 and VZL1021, DPAP B induction time was coincident to the shift time at the restrictive temperature, 3 h at 37 °C. The dominant-negative *eef2^{H699K}* was grown at 25 °C as translation elongation defect already occurs at this condition (Ortiz and Kinzy 2005). The total protein extract was immunoblotted using anti-6×His (DPAP B) to detect both the precursor (pDPAP B = 93 kDa) and the mature (mDPAP B = 120 kDa) forms of DPAP B. Dys1 was used as a loading control

CPY (69 kDa). These results agree with previous evidence, which indicated that different eIF5A mutants did not display defects in CPY maturation (Frigieri et al. 2008).

To extend our analysis of the potential link between eIF5A and ER-associated protein synthesis, we used a second reporter. The signal sequence of CPY was fused to the N-terminus of the entire *URA3* ORF (SSCPY-Ura3), leading to the production of the fusion protein SSCPY-Ura3, which is artificially targeted to the ER exclusively via the posttranslational pathway (Ng et al. 1996). In a wild-type strain, SSCPY-Ura3 is efficiently targeted to the ER and this fusion protein cannot complement an *ura3* strain because it lacks access to its natural cytosolic substrate. In contrast, cells with a defect in the posttranslational pathway accumulate SSCPY-Ura3 in the cytoplasm and can grow in medium without uracil. The results generated using this reporter are shown in Fig. 1b. In contrast to the *sec61-101* mutant, the eIF5A mutant *tif51A-1* expressing an SSCPY-Ura3 reporter cannot grow in the absence of uracil, indicating that the posttranslational translocation pathway is intact in these cells. These results demonstrate that eIF5A does not play a role in the posttranslational translocation of proteins into the ER.

Next, we asked whether eIF5A is necessary for the cotranslational translocation pathway. We used the vacuolar dipeptidyl aminopeptidase B (DPAP B) as a reporter because this protein is exclusively translocated via the cotranslational SRP-dependent pathway (Ng et al. 1996). In the wild-type strain, DPAP B is targeted to the ER and undergoes several N-glycosylations, which increase its molecular weight from 93 to 120 kDa (Fig. 2). In contrast,

Fig. 3 Genetic interactions occur specifically between eIF5A and cotranslational translocation factors. **a** A simplified scheme for protein translocation into the ER via the cotranslational (SRP-dependent) and the posttranslational (SRP-independent) pathways. The proteins in the black boxes, Sec65, Sec61 and Sec62, were assayed. **b** The genetic interactions between *tif51A-1* and either *sec65-1*, *sec61-2* or *sec62-ts*. The indicated double mutant strains harboring *TIF51A* (pSV138 or pSV146) or the empty vector (pSV59 or pSV60) were plated onto SC-leu,-ura (growth control) and SC+5-FOA media and grown at the permissive temperature (25 °C) for 3 days. **c** Rescue of the temperature-sensitive phenotype of the *tif51A-1* by overexpression of the SRP complex. Tenfold serial dilutions of the wild-type (SVL82) and *tif51A-1* (SVL14) strains, either harboring all of the SRP complex components (pVZ1359+pVZ1360) or harboring empty vectors (pSV364+pSV374), were plated onto SC-leu,-ura and grown at both the permissive (25 °C) and the restrictive temperatures (37 °C) for 3 days



in the *sec61-101* mutant, the targeting of DPAP B to the ER is inefficient, and no mature form of the protein is observed (Fig. 2). The eIF5A mutant *tif51A-1* showed a defect in maturation of DPAP B, comparable to that seen in the *sec61-101* mutant (Fig. 2). Considering that the CPY targeting is correct in the *tif51A-1* mutant, these results suggest that eIF5A function is necessary specifically for the cotranslational translocation of proteins into the ER.

Since cotranslational translocation is coordinated with the elongation step of protein synthesis (Mason et al. 2000; Brodsky 1998) and because eIF5A mutants show a general

defect in translation elongation, we next tested whether another translation elongation mutant might also display a defect in the cotranslational translocation pathway. We used DPAP B to assess the translocation abilities of a strain harboring the elongation factor 2 (eEF2) dominant-negative mutant *eft2^{H699K}*. The protein eEF2 is a canonical translation elongation factor, and the *eft2^{H699K}* mutant strain exhibits impaired elongation of polypeptides during protein synthesis, a phenotype shared with eIF5A mutants (Dias et al. 2008, 2012; Gregio et al. 2009). As observed in the right-most lane of Fig. 2, similarly to wild-type cell,

DPAP B is correctly targeted to the ER in the *eft2^{H699K}* mutant. This result strongly suggests that the involvement of eIF5A in the cotranslational translocation pathway is specific and not merely a consequence of a general block in the elongation step of protein synthesis.

eIF5A interacts genetically only with factors in the cotranslational translocation pathway

To confirm the functional relevance of eIF5A for the cellular secretory pathway, we searched for genetic interactions between eIF5A and translocation factors. As depicted in Fig. 3a, we chose the genes of factors that are essential for the cotranslational translocation pathway (*SEC65*) or for the posttranslational pathway (*SEC62*) and the primary translocon component (*SEC61*), which is essential for both pathways.

We first tested the effect of combining mutants of the translocation factors described above and the eIF5A mutant *tif51A-1* in a single haploid strain. Interestingly, we observed a growth defect at the permissive temperature (25 °C) in the double mutant strains carrying *tif51A-1* and either *sec65-1* or *sec61-2* (empty vector), but no defect was noticed in the double mutant *tif51A-1 sec62-ts* (empty vector), when compared to the wild type (*TIF51A*). This genetic assay shows a synthetic sick genetic interaction only between *tif51A-1* and the mutants affecting the cotranslational pathway, *sec65-1* and *sec61-2* (Fig. 3b).

In cotranslational targeting, binding of SRP to the signal peptide is a limiting step. Because of this fact, and because of the greater quantity of ribosomes in a cell than SRPs (Ogg and Walter 1995), we next tested whether an overexpression of genes coding for all SRP components would rescue the growth defect of the *tif51A-1* mutant at the restrictive temperature. As shown in Fig. 3c, the overexpression of SRP does cause a partial rescue of the growth defect.

Together, these results further support the idea that the function of eIF5A is important for the cotranslational targeting of proteins to the ER.

Blocking eIF5A activation increases the levels of stress-induced chaperones

The functional correlations between eIF5A and the cotranslational pathway described herein are very similar to those reported for Rpl25-GFP. The ribosomal protein L25 (Rpl25) is an important mediator of the ribosome interaction with SRP (Halic et al. 2004, 2006), and a strain expressing an Rpl25-GFP fusion protein has defects in the cotranslational translocation but not in the posttranslational pathway (Dalley et al. 2008). In addition, some stress-induced chaperones are up-regulated in the Rpl25-GFP

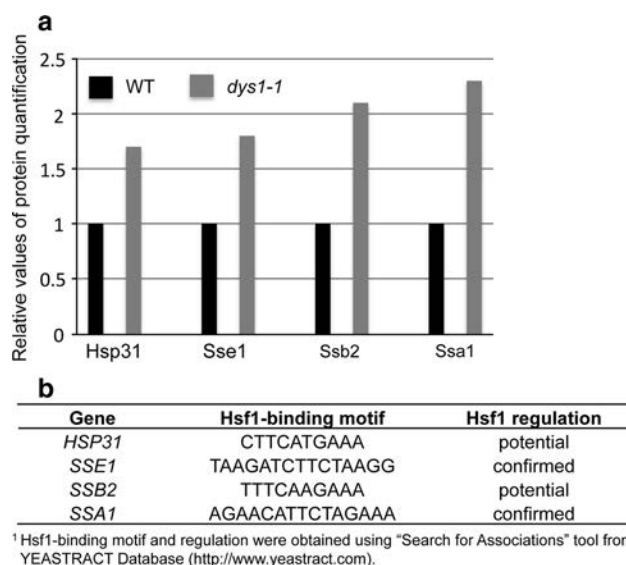
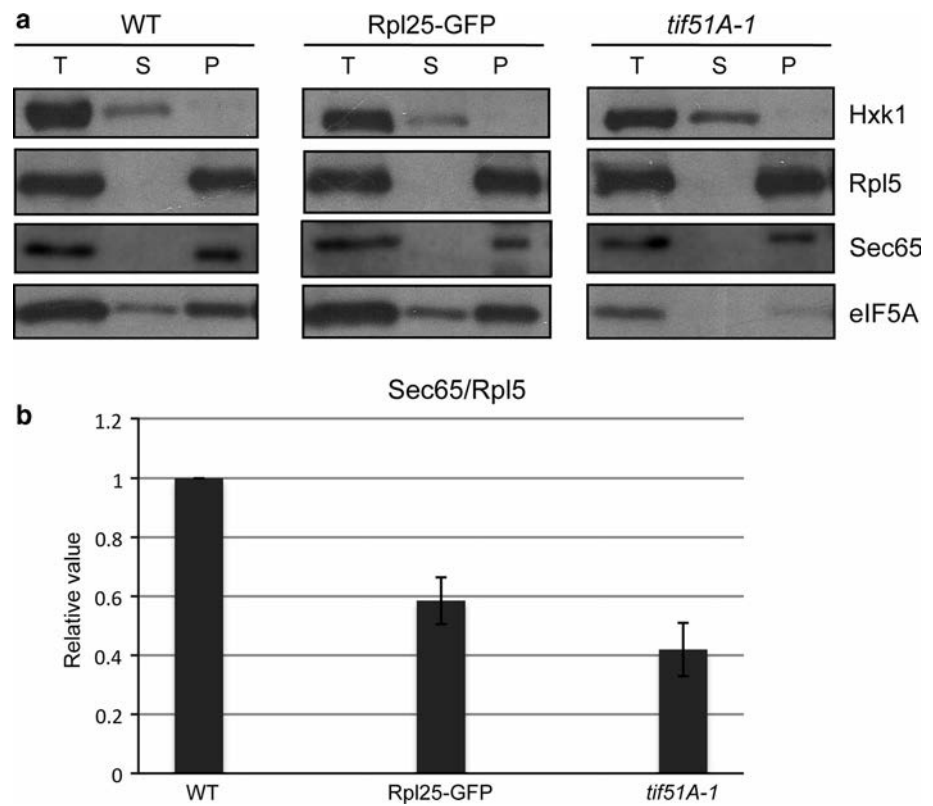


Fig. 4 Loss of eIF5A function causes the up-regulation of stress-induced chaperones. **a** Differentially expressed chaperones identified by mass spectrometry in 2D-DIGE proteomic maps of *dys1-1* mutant (SVL614) compared to its isogenic wild-type strain (SVL613) after growth at 25 °C. Each bar represents relative staining intensities of chaperones Hsp31, Sse1, Ssb2 and Ssa1 from 2D-gels of biological triplicates (data not shown). **b** The genes encoding the same up-regulated chaperones are transcriptionally regulated by the transcription factor Hsf1, according to the confirmed or potential motifs indicated (YEASTRACT Database)

strain (Dalley et al. 2008), a phenotype reminiscent of SRP dysfunction in the cell (Arnold and Wittup 1994; Mutka and Walter 2001). To verify if the loss of function of eIF5A also triggers an up-regulation of stress-induced chaperones, we looked for these proteins in 2D gel-based proteomic maps of eIF5A-defective mutants (data not shown). However, the eIF5A mutants described so far need a temperature shift to exhibit the defect in eIF5A function, which also induces heat-shock responses and alters the expression of chaperones, compromising this analysis. Instead, we used the deoxyhypusine synthase mutant *dys1-1*, which shows a 60 % reduction in hypusine-containing eIF5A at permissive temperature. Besides, even under permissive growth condition (25 °C), the *dys1-1* mutant shows defects of translation (total protein synthesis and polysome profile) that are identical to the eIF5A mutants at their restrictive temperature (Galvão et al. 2013).

Among the five chaperones identified in our 2D-DIGE experiments, we found that the stress-induced chaperones Hsp31, Sse1, Ssb2 and Ssa1 were up-regulated in the *dys1-1* mutant when compared to the wild type (Fig. 4a). Stress-induced chaperones become up-regulated in response to the accumulation of unfolded proteins in the cytosol, and the Hsf1 transcription factor is determinant for their induction (Sorger 1991; Albanèse et al. 2006). Figure 4b shows the information on Hsf1 regulation as well as the Hsf1-binding

Fig. 5 eIF5A is important to the binding of the ribosome-nascent chain complex to SRP. **a** The wild-type (SVL82), Rpl25-GFP (VZL1246) and *tif51A-1* (SVL14) strains were grown to mid-log phase at the permissive temperature (25 °C) and then shifted to 37 °C for 3 h. The total extract (T), supernatant (S) and pellet (P) from a 256,000×g centrifugation were immunoblotted against Hxk1, Rpl5, Sec65 and eIF5A using specific polyclonal antibodies. **b** The quantification of the Sec65 present in the ribosome-enriched fraction (P) normalized by the ribosomal protein Rpl5. The graph represents the relative values of Sec65/Rpl5 obtained from independent replicates, assuming the wild-type strain to have a value of 1



motifs that are present in the promoters of the genes coding for Hsp31, Sse1, Ssb2 and Ssa1. Therefore, our results examining stress-induced chaperones in the eIF5A mutant are also very similar to those observed for the Rpl25-GFP strain (Dalley et al. 2008) and SRP mutants (Arnold and Wittrup 1994; Mutka and Walter 2001), and they again support the concept that eIF5A functions during the cotranslational targeting of proteins to the ER.

eIF5A is important for the binding of SRP to the ribosome-nascent chain complex

Because eIF5A binds to ribosomes and has an essential function during translation elongation (Zanelli et al. 2006; Jao and Chen 2006; Gregio et al. 2009; Saini et al. 2009), we also tested whether eIF5A depletion interferes with the binding of ribosome to SRP. We used a strategy of ultracentrifugation to purify the ribosomes, which allows for the co-purification of bound SRP (Frey et al. 2001; Dalley et al. 2008). For this experiment, we also included Rpl25-GFP, which has decreased association of ribosomes with SRPs (Dalley et al. 2008). Therefore, the total cell extracts (T) were separated into postribosomal supernatants (S) and ribosomal pellet fractions (P) by ultracentrifugation. The quantity of purified complexes was detected by blotting the ribosomal protein L5 (Rpl5) and the SRP subunit Sec65. Samples were also blotted for the cytosolic hexokinase

Hxk1 and eIF5A. As shown in Fig. 5a, all pellet fractions (P) contained ribosomes (Rpl5) and SRP (Sec65) complexes, which were absent in the supernatant fractions (S). On the other hand, Hxk1 was present only in the S fractions, as expected. The depletion of eIF5A in the *tif51A-1* mutant was also seen in all fractions, compared to the wild-type strain (Fig. 5a). Because the presence of Sec65 in the P fractions is dependent on ribosome precipitation, we quantified and normalized the amount of Sec65 relative to Rpl5 (Fig. 5b). In comparison to the wild-type strain, we observed the known defect in the Rpl25-GFP strain in the binding of RNCs to SRPs (Dalley et al. 2008). Similarly, the eIF5A mutant *tif51A-1* demonstrated a decreased association between ribosomes and SRPs.

These results are consistent with the defects observed in the cotranslational translocation pathway of eIF5A mutants and with the genetic interactions between eIF5A and cotranslational translocation factors. Furthermore, our data suggest that the primary function of eIF5A in the translocation of proteins during translation is the efficiency of binding of SRP to elongating ribosomes.

To our knowledge, this is the first study showing that a translation factor has been directly linked with the function of SRP in targeting the RNC to the ER. Additionally, this discovered link between the function of eIF5A in the ribosome and SRP binding to the RNC supports the hypothesis that eIF5A acts differentially in the translation

of a specific subset of mRNAs, although the loss of eIF5A function ultimately induces general defects in translation elongation (Zanelli and Valentini 2007; Park et al. 2010).

It is important to note that the eIF5A structural homolog EF-P has recently been shown to function preferentially in the translation of proteins containing poly-proline tracts and other amino acid motifs, such as YIRYIR (Ude et al. 2013; Doerfel et al. 2013; Hersch et al. 2013). However, not all of the proteins containing these motifs are decreased in a *Salmonella* strain deficient in EF-P, suggesting that the role EF-P plays in the translation of specific proteins is more complex than was initially determined by an analysis of poly-proline tracts (Hersch et al. 2013). Interestingly, several proteins identified as more dependent on EF-P for their translation are related to membrane integrity and motility (Bullwinkle et al. 2012; Hersch et al. 2013), which require a number of proteins that are translocated in an SRP-dependent manner (Zhang et al. 2012). It remains to be determined whether eIF5A also affects translation in an amino acid tract-dependent manner similarly to EF-P and whether this is correlated with SRP-dependent translation.

Acknowledgments We are grateful to Colin Stirling (University of Newcastle, Newcastle, United Kingdom), Martin Pool (Faculty of Life Sciences, University of Manchester, Manchester, United Kingdom) and Davis Ng (Biological Science, National University of Singapore, Singapore) for their generous gifts of strains, plasmids, and antibodies. This work was supported by grants to S R V and C F Z from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and PADC from the Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP. We also thank the FAPESP for fellowships awarded to most of the authors.

Conflict of interest We declare that we have no conflict of interest.

References

- Albanèse V, Yam AY, Baughman J, Parnot C, Frydman J (2006) Systems analyses reveal two chaperone networks with distinct functions in eukaryotic cells. *Cell* 124(1):75–88. doi:[10.1016/j.cell.2005.11.039](https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.11.039)
- Arnold CE, Wittrup KD (1994) The stress response to loss of signal recognition particle function in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 269(48):30412–30418
- Bailly M, de Crécy-Lagard V (2010) Predicting the pathway involved in post-translational modification of elongation factor P in a subset of bacterial species. *Biol Direct* 5:3. doi:[10.1186/1745-6150-5-3](https://doi.org/10.1186/1745-6150-5-3)
- Benne R, Hershey JW (1978) The mechanism of action of protein synthesis initiation factors from rabbit reticulocytes. *J Biol Chem* 253(9):3078–3087
- Brodsky JL (1998) Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. *Int Rev Cytol* 178:277–328
- Bullwinkle TJ, Zou SB, Rajkovic A, Hersch SJ, Elgamal S, Robinson N, Smil D, Bolshan Y, Navarre WW, Ibba M (2012) (R)- β -lysine modified elongation factor P functions in translation elongation. *J Biol Chem*. doi:[10.1074/jbc.M112.438879](https://doi.org/10.1074/jbc.M112.438879)
- Chen KY, Liu AY (1997) Biochemistry and function of hypusine formation on eukaryotic initiation factor 5A. *Biol Signals* 6(3):105–109
- Dalley JA, Selkirk A, Pool MR (2008) Access to ribosomal protein Rpl25p by the signal recognition particle is required for efficient cotranslational translocation. *Mol Biol Cell* 19(7):2876–2884
- Dias CA, Cano VS, Rangel SM, Apponi LH, Frigieri MC, Muniz JR, Garcia W, Park MH, Garratt RC, Zanelli CF, Valentini SR (2008) Structural modeling and mutational analysis of yeast eukaryotic translation initiation factor 5A reveal new critical residues and reinforce its involvement in protein synthesis. *FEBS J* 275(8):1874–1888
- Dias CA, Gregio AP, Rossi D, Galvão FC, Watanabe TF, Park MH, Valentini SR, Zanelli CF (2012) eIF5A interacts functionally with eEF2. *Amino Acids* 42(2–3):697–702. doi:[10.1007/s00726-011-0985-0](https://doi.org/10.1007/s00726-011-0985-0)
- Dias CA, Garcia W, Zanelli CF, Valentini SR (2013) eIF5A dimerizes not only in vitro but also in vivo and its molecular envelope is similar to the EF-P monomer. *Amino Acids* 44(2):631–644. doi:[10.1007/s00726-012-1387-7](https://doi.org/10.1007/s00726-012-1387-7)
- Doerfel LK, Wohlgemuth I, Kothe C, Peske F, Urlaub H, Rodnina MV (2013) EF-P is essential for rapid synthesis of proteins containing consecutive proline residues. *Science* 339(6115):85–88. doi:[10.1126/science.1229017](https://doi.org/10.1126/science.1229017)
- Frey S, Pool M, Seedorf M (2001) Scp160p, an RNA-binding, polysome-associated protein, localizes to the endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae* in a microtubule-dependent manner. *J Biol Chem* 276(19):15905–15912
- Frigieri MC, Thompson GM, Pandolfi JR, Zanelli CF, Valentini SR (2007) Use of a synthetic lethal screen to identify genes related to TIF51A in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genet Mol Res* 6(1):152–165
- Frigieri MC, Joao Luiz MV, Apponi LH, Zanelli CF, Valentini SR (2008) Synthetic lethality between eIF5A and Ypt1 reveals a connection between translation and the secretory pathway in yeast. *Mol Genet Genomics* 280(3):211–221
- Galvão FC, Rossi D, Silveira Wa S, Valentini SR, Zanelli CF (2013) The deoxyhypusine synthase mutant dys1-1 reveals the association of eIF5A and Asc1 with cell wall integrity. *PLoS One* 8(4):e60140. doi:[10.1371/journal.pone.0060140](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060140)
- Gregio AP, Cano VP, Avaca JS, Valentini SR, Zanelli CF (2009) eIF5A has a function in the elongation step of translation in yeast. *Biochem Biophys Res Commun* 380(4):785–790
- Guthrie C, Fink GR (1991) Guide to yeast genetics. Academic Press, New York
- Halic M, Becker T, Pool MR, Spahn CM, Grassucci RA, Frank J, Beckmann R (2004) Structure of the signal recognition particle interacting with the elongation-arrested ribosome. *Nature* 427(6977):808–814. doi:[10.1038/nature02342](https://doi.org/10.1038/nature02342)
- Halic M, Gartmann M, Schlenker O, Mielke T, Pool MR, Sinning I, Beckmann R (2006) Signal recognition particle receptor exposes the ribosomal translocon binding site. *Science* 312(5774):745–747
- Hersch SJ, Wang M, Zou SB, Moon KM, Foster LJ, Ibba M, Navarre WW (2013) Divergent protein motifs direct elongation factor P-mediated translational regulation in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*. *MBio* 4(2):e00180–13. doi:[10.1128/mBio.00180-13](https://doi.org/10.1128/mBio.00180-13)
- Jao DL, Chen KY (2006) Tandem affinity purification revealed the hypusine-dependent binding of eukaryotic initiation factor 5A to the translating 80S ribosomal complex. *J Cell Biochem* 97(3):583–598
- Li Z, Vizeacoumar FJ, Bahr S, Li J, Warringer J, Vizeacoumar FS, Min R, Vandersluis B, Bellay J, Devit M, Fleming JA, Stephens

- A, Haase J, Lin ZY, Baryshnikova A, Lu H, Yan Z, Jin K, Barker S, Datti A, Giaever G, Nislow C, Bulawa C, Myers CL, Costanzo M, Gingras AC, Zhang Z, Blomberg A, Bloom K, Andrews B, Boone C (2011) Systematic exploration of essential yeast gene function with temperature-sensitive mutants. *Nat Biotechnol* 29(4):361–367. doi:[10.1038/nbt.1832](https://doi.org/10.1038/nbt.1832)
- Lorsch J (ed) (2007) Translation Initiation: Extract systems and molecular genetics In: *Methods in enzymology*, vol 429. Elsevier, San Diego, CA
- Marra M, Agostinelli E, Tempera G, Lombardi A, Meo G, Budillon A, Abbruzzese A, Giuberti G, Caraglia M (2007) Anticancer drugs and hyperthermia enhance cytotoxicity induced by polyamine enzymatic oxidation products. *Amino Acids* 33(2):273–281
- Mason N, Ciuffo LF, Brown JD (2000) Elongation arrest is a physiologically important function of signal recognition particle. *EMBO J* 19(15):4164–4174
- Mutka SC, Walter P (2001) Multifaceted physiological response allows yeast to adapt to the loss of the signal recognition particle-dependent protein-targeting pathway. *Mol Biol Cell* 12(3):577–588
- Navarre WW, Zou SB, Roy H, Xie JL, Savchenko A, Singer A, Edvokimova E, Prost LR, Kumar R, Ibba M, Fang FC (2010) PoxA, yjeK, and elongation factor P coordinately modulate virulence and drug resistance in *Salmonella enterica*. *Mol Cell* 39(2):209–221. doi:[10.1016/j.molcel.2010.06.021](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.06.021)
- Ng DT, Brown JD, Walter P (1996) Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol* 134(2):269–278
- Ogg SC, Walter P (1995) SRP samples nascent chains for the presence of signal sequences by interacting with ribosomes at a discrete step during translation elongation. *Cell* 81(7):1075–1084
- Ortiz PA, Kinzy TG (2005) Dominant-negative mutant phenotypes and the regulation of translation elongation factor 2 levels in yeast. *Nucleic Acids Res* 33(18):5740–5748
- Park MH, Nishimura K, Zanelli CF, Valentini SR (2010) Functional significance of eIF5A and its hypusine modification in eukaryotes. *Amino Acids* 38(2):491–500. doi:[10.1007/s00726-009-0408-7](https://doi.org/10.1007/s00726-009-0408-7)
- Park JH, Johansson HE, Aoki H, Huang BX, Kim HY, Ganoza MC, Park MH (2012) Post-translational modification by β -lysylation is required for activity of *Escherichia coli* elongation factor P (EF-P). *J Biol Chem* 287(4):2579–2590. doi:[10.1074/jbc.M111.309633](https://doi.org/10.1074/jbc.M111.309633)
- Roy H, Zou SB, Bullwinkle TJ, Wolfe BS, Gilreath MS, Forsyth CJ, Navarre WW, Ibba M (2011) The tRNA synthetase paralog PoxA modifies elongation factor-P with (R)- β -lysine. *Nat Chem Biol* 7(10):667–669. doi:[10.1038/nchembio.632](https://doi.org/10.1038/nchembio.632)
- Saini P, Eyler DE, Green R, Dever TE (2009) Hypusine-containing protein eIF5A promotes translation elongation. *Nature* 459(7243):118–121
- Schnier J, Schwelberger HG, Smit-McBride Z, Kang HA, Hershey JW (1991) Translation initiation factor 5A and its hypusine modification are essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 11(6):3105–3114
- Segev N (2001) Ypt/rab gtpases: regulators of protein trafficking. *Sci STKE* 2001 (100):RE11
- Sorger PK (1991) Heat shock factor and the heat shock response. *Cell* 65(3):363–366
- Stirling CJ, Rothblatt J, Hosobuchi M, Deshaies R, Schekman R (1992) Protein translocation mutants defective in the insertion of integral membrane proteins into the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* 3(2):129–142
- Ude S, Lassak J, Starosta AL, Kraxenberger T, Wilson DN, Jung K (2013) Translation elongation factor EF-P alleviates ribosome stalling at polyproline stretches. *Science* 339(6115):82–85. doi:[10.1126/science.1228985](https://doi.org/10.1126/science.1228985)
- Valentini SR, Casolari JM, Oliveira CC, Silver PA, McBride AE (2002) Genetic interactions of yeast eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) reveal connections to poly (A)-binding protein and protein kinase C signaling. *Genetics* 160(2):393–405
- Yanagisawa T, Sumida T, Ishii R, Takemoto C, Yokoyama S (2010) A paralog of lysyl-tRNA synthetase aminoacylates a conserved lysine residue in translation elongation factor P. *Nat Struct Mol Biol* 17(9):1136–1143. doi:[10.1038/nsmb.1889](https://doi.org/10.1038/nsmb.1889)
- Zanelli CF, Valentini SR (2005) Pkc1 acts through Zds1 and Gic1 to suppress growth and cell polarity defects of a yeast eIF5A mutant. *Genetics* 171(4):1571–1581
- Zanelli CF, Valentini S (2007) Is there a role for eIF5A in translation? *Amino Acids* 33(2):351–358
- Zanelli CF, Maragno AL, Gregio AP, Komili S, Pandolfi JR, Mestriner CA, Lustri WR, Valentini SR (2006) eIF5A binds to translational machinery components and affects translation in yeast. *Biochem Biophys Res Commun* 348(4):1358–1366
- Zhang D, Sweredoski MJ, Graham RL, Hess S, Shan SO (2012) Novel proteomic tools reveal essential roles of SRP and importance of proper membrane protein biogenesis. *Mol Cell Proteomics* 11(2):M111.011585. doi:[10.1074/mcp.M111.011585](https://doi.org/10.1074/mcp.M111.011585)

III. Interações genéticas identificadas nos rastreamentos por SGA e sem enriquecimento na ontologia genética.

ORF	Array	<i>tif51A-1</i>	<i>tif51A-3</i>	<i>tif51A</i> ^{K56A}	<i>tif51A</i> ^{Q22H/L93F}	GO
YBL074C	AAR2	-0,22	0,00	-0,28	-0,46	C/E
YBR236C	ABD1	-0,41	-0,26	-0,37	-0,46	C
YER093C-A	AIM11	0,38	0,27	0,00	0,80	A
YHR198C	AIM18	0,00	0,37	0,33	0,29	A
YJL046W	AIM22	0,42	0,48	0,41	0,42	O
YBR110W	ALG1	0,26	0,00	-0,54	0,00	B/F
YGL065C	ALG2	0,25	0,46	0,00	0,27	B/F
YOL130W	ALR1	-0,87	-0,84	-0,62	0,00	O
YLR089C	ALT1	0,19	0,17	0,29	0,45	L
YJL084C	ALY2 *	0,00	0,00	0,00	0,20	O
YIL040W	APQ12	0,00	0,23	0,53	0,20	B/M
YML022W	APT1	0,20	-0,60	-0,40	-0,15	O
YCR048W	ARE1 *	0,00	-0,26	0,00	0,51	B
YDR173C	ARG82	-0,17	-0,17	-0,32	-0,23	B/L
YGR097W	ASK10 *	0,15	0,55	0,84	0,93	D
YLL042C	ATG10	0,00	0,00	0,00	0,23	G
YCR068W	ATG15 *	0,17	0,00	0,46	0,47	B
YHR036W	BRL1 (brl1-2221)	0,23	0,27	0,21	0,20	M
YHR036W	BRL1 (brl1-3231)	-0,16	-0,22	-0,32	-0,49	M
YPL178W	CBC2 *	0,00	-0,20	0,34	0,58	C/E
YPR025C	CCL1	-0,45	0,00	-0,35	-0,90	N
YLR110C	CCW12	0,00	-0,23	-0,40	-0,44	D
YOR074C	CDC21	-0,45	-1,00	-0,73	-1,02	O
YGL130W	CEG1	-0,17	-0,41	-0,31	-0,21	C
YNL052W	COX5A	0,00	0,00	0,65	0,40	O
YLR395C	COX8	0,29	0,56	0,54	0,66	O
YJR109C	CPA2	0,00	0,00	0,55	0,71	L
YNR010W	CSE2	-0,49	-0,47	-0,30	0,45	O
YMR025W	CSI1	0,00	-0,47	-0,29	0,49	D
YPR158W	CUR1	0,00	0,00	0,00	0,23	O
YGR278W	CWC22	-0,25	-0,23	-0,23	-0,41	C/E
YOR037W	CYC2	0,00	0,23	0,23	0,32	G/J
YIR023W	DAL81	-0,32	0,48	-0,32	0,33	D/L
YJL149W	DAS1	0,00	0,00	0,25	0,22	O
YFR012W	DCV1	0,00	0,00	0,25	0,28	A
YHR019C	DED81	-0,28	-0,44	-0,45	-0,50	L
YOR236W	DFR1	-0,16	-0,32	0,00	0,00	L
YMR316W	DIA1 *	0,00	0,00	0,00	0,27	O
YOR080W	DIA2	-0,22	-0,27	-0,16	0,00	O
YPR183W	DPM1	0,00	-0,17	-0,35	-0,47	B/F
YBR007C	DSF2 *	0,00	0,00	0,00	0,24	A
YGL043W	DST1	0,33	0,00	0,31	1,11	C/J
YMR299C	DYN3	0,00	0,00	0,00	-0,24	O

YHL043W	ECM34	0,00	0,00	0,18	0,21	A
YGR200C	ELP2	-0,23	-0,33	-0,38	-0,15	I/K
YPL101W	ELP4	-0,37	-0,37	-0,55	-0,26	I/K
YLL014W	EMC6	0,00	0,00	0,00	0,37	O
YLR065C	ENV10	0,00	0,15	0,00	0,18	O
YDR414C	ERD1 *	0,00	-0,30	-0,23	0,00	F
YMR202W	ERG2	0,00	0,00	0,00	0,24	B
YGL001C	ERG26	0,15	0,00	0,18	0,22	B
YML008C	ERG6	0,16	0,16	0,00	0,20	B
YHR190W	ERG9	0,20	0,26	0,00	0,20	B
YLR318W	EST2	0,29	0,96	0,61	0,65	O
YOR317W	FAA1 *	0,00	0,00	0,00	0,41	O
YIL134W	FLX1	0,24	0,20	0,22	0,30	O
YKR049C	FMP46	0,00	0,00	0,00	0,31	A
YPL141C	FRK1 *	0,00	0,00	0,00	0,23	N
YFL022C	FRS2	0,00	0,00	-0,22	-0,18	L
YOR183W	FYV12	0,00	0,00	0,24	0,15	A
YLR088W	GAA1	-0,17	0,00	0,00	-0,20	B
YLR459W	GAB1	-0,49	-0,42	-0,44	-0,67	B
YML006C	GIS4 *	-0,16	0,00	0,00	0,20	O
YMR281W	GPI12	0,36	0,34	0,32	0,48	B
YLL031C	GPI13	0,60	0,56	0,63	0,62	B
YDR434W	GPI17	0,23	0,00	0,00	0,23	B
YBR004C	GPI18	-0,27	-0,17	-0,82	-0,29	B
YDR437W	GPI19 (gpi19-2xh)	0,20	0,29	0,26	0,29	B
YDR437W	GPI19 (gpi19-ph)	-0,55	-0,56	-0,61	-0,51	B
YPL076W	GPI2	0,00	-0,42	0,38	0,00	B
YDR331W	GPI8	0,16	0,37	0,39	0,20	B
YFL027C	GYP8	0,00	0,00	0,00	0,24	O
YKL109W	HAP4	0,18	0,29	0,00	0,41	D
YDR044W	HEM13	0,83	0,69	0,53	0,15	O
YDR174W	HMO1	0,00	0,00	0,24	0,41	O
YNR055C	HOL1	0,00	0,00	0,00	0,38	O
YJR139C	HOM6	-0,23	-0,16	-0,30	-0,21	L
YIL110W	HPM1	0,00	0,21	0,00	0,17	O
YOL123W	HRP1	0,46	0,46	0,51	0,62	C
YOR020C	HSP10	-0,45	0,00	-0,46	-0,45	G/J
YDR258C	HSP78 *	0,00	0,00	-0,29	0,50	G
YGL168W	HUR1	0,00	0,00	0,26	0,27	O
YIR037W	HYR1	0,00	0,00	0,22	0,00	D
YBR157C	ICS2	0,00	0,00	0,45	0,50	A
YLR384C	IKI3 *	-0,42	-0,34	-0,42	0,00	I/K
YJL057C	IKS1	0,00	0,00	0,00	0,38	N
YJR118C	ILM1	-0,18	-0,32	-0,28	-0,17	G
YHR046C	INM1	0,00	0,30	0,49	0,71	F
YDR123C	INO2 *	0,19	0,35	0,47	0,51	B

YOL108C	INO4	0,31	0,42	0,69	1,14	B
YBR011C	IPP1	-0,25	-0,29	-0,30	-0,23	O
YOL081W	IRA2 *	0,55	1,03	0,90	0,89	D
YLR021W	IRC25	0,00	0,00	0,00	0,16	J
YJR097W	JJJ3	0,00	0,00	0,00	0,17	O
YGL016W	KAP122	-0,15	0,00	0,00	-0,19	M
YLR347C	KAP95	0,29	0,21	0,32	0,26	B/J/M
YJR054W	KCH1 *	-0,32	-0,89	-0,81	0,00	O
YIL125W	KGD1	0,60	0,00	0,00	0,31	O
YDL108W	KIN28 *	-0,19	0,00	-0,25	-0,30	C/N
YMR296C	LCB1	-0,74	-0,81	-0,62	-0,83	B
YDR062W	LCB2	0,21	0,58	0,35	0,21	B
YJL134W	LCB3	0,00	0,00	0,00	0,23	B
YDL146W	LDB17 *	0,00	0,00	0,00	0,25	O
YPL213W	LEA1	0,00	0,00	0,33	0,57	C/E
YLR451W	LEU3	0,00	0,00	0,35	0,67	L
YFL018C	LPD1	0,25	0,39	0,49	0,51	L
YDL087C	LUC7	0,00	0,00	-0,15	0,00	C/E
YIR034C	LYS1	0,29	0,88	0,31	0,33	L
YGL154C	LYS5	0,16	0,16	0,54	0,44	L
YGR292W	MAL12	0,00	0,15	0,39	0,84	F
YKL165C	MCD4	0,40	0,28	0,28	0,43	B
YDL054C	MCH1	0,00	0,00	-0,18	0,44	O
YOR306C	MCH5	0,00	-0,57	0,63	0,53	O
YKL150W	MCR1 *	0,15	0,00	-0,15	0,38	B/D
YOL009C	MDM12	0,00	0,21	0,26	0,22	G/J
YOL135C	MED7 *	-0,76	-0,30	0,76	0,75	O
YGR264C	MES1	0,37	0,16	0,00	0,16	L
YCL044C	MGR1 *	0,00	0,22	0,43	0,38	O
YKR016W	MIC60	0,00	0,15	0,28	0,41	G
YJR077C	MIR1	0,00	-0,19	0,76	0,65	O
YDR144C	MKC7	0,00	-0,21	0,00	0,00	O
YNL117W	MLS1	-0,19	-0,24	-0,26	-0,29	F
YGL257C	MNT2	0,00	0,00	0,00	0,22	F
YJR074W	MOG1 *	0,00	0,00	0,62	0,40	M
YMR070W	MOT3 *	0,00	0,00	0,28	0,25	B
YNL053W	MSG5	0,00	-0,23	-0,20	0,00	D/M/N
YLR116W	MSL5 *	-0,22	-0,20	0,00	0,00	C/E
YBR255W	MTC4	0,00	0,00	-0,34	0,00	A
YDR128W	MTC5	0,00	0,00	0,00	0,29	O
YHR151C	MTC6	0,00	0,00	-0,25	0,00	A
YPL190C	NAB3 *	0,00	0,00	0,00	-0,30	C/I
YDR162C	NBP2	0,00	0,00	-0,34	0,67	N
YLR195C	NMT1	-0,42	-0,31	-0,97	-0,87	O
YNL061W	NOP2	0,53	0,36	0,41	0,68	H/K
YNL091W	NST1	0,00	0,26	0,34	0,21	O

YBR188C	NTC20	0,00	0,00	-0,23	0,00	C/E
YPR091C	NVJ2 *	0,00	0,00	0,00	0,30	A
YKL055C	OAR1	0,00	-0,19	0,00	0,00	B
YDR067C	OCA6	0,00	0,00	0,14	0,29	A
YPR044C	OPI11	0,00	0,25	0,00	0,64	A
YKR035C	OPI8	0,00	-0,22	0,00	0,00	A
YKR003W	OSH6	0,00	0,00	0,00	0,31	B
YOR103C	OST2	-0,29	-0,25	-0,39	0,84	F
YOR085W	OST3	0,22	0,39	0,20	0,45	F/J
YOR269W	PAC1	0,00	0,00	0,00	-0,26	O
YKR002W	PAP1	0,00	0,23	0,21	0,68	C
YGL261C	PAU11	0,00	0,00	0,00	0,26	A
YNL003C	PET8	0,00	-0,18	0,61	1,05	O
YOL136C	PFK27	0,00	0,17	0,00	0,00	F
YNL158W	PGA1	0,00	-1,13	0,00	-0,31	B
YGR231C	PHB2	0,15	0,20	0,30	0,25	G
YBR106W	PHO88	0,00	0,31	1,16	0,89	O
YMR123W	PKR1	0,61	0,23	0,16	-0,39	J
YMR008C	PLB1	0,00	0,00	0,00	0,41	B
YGL167C	PMR1	0,00	0,00	0,26	0,17	O
YPL144W	POC4	0,20	0,00	0,21	0,77	J
YLL023C	POM33	0,19	0,00	0,00	0,80	J
YMR297W	PRC1	0,00	0,00	0,00	0,22	O
YJL001W	PRE3	0,00	-0,39	0,00	0,00	O
YMR268C	PRP24	0,34	0,00	0,11	0,23	C/E
YGR091W	PRP31	-1,07	-1,00	-1,07	-1,07	C/E
YGR075C	PRP38	-0,17	-0,58	-0,20	-0,23	C/E
YML046W	PRP39	0,00	0,00	-0,15	-0,18	C/E
YDR235W	PRP42	0,00	0,00	0,00	0,98	C/E
YKL116C	PRR1 *	0,00	0,00	0,00	0,31	D/N
YGR170W	PSD2 *	0,00	0,00	0,25	0,45	B
YDL006W	PTC1	-0,21	-0,44	-0,44	-0,36	D/E/G/I/N
YOR243C	PUS7	0,00	0,00	0,00	0,30	H/I/K
YHR037W	PUT2	0,00	-0,29	0,16	0,53	L
YOR347C	PYK2	0,00	0,25	-0,26	0,44	O
YDL103C	QRI1	-1,09	-1,09	-1,09	-1,09	O
YDR527W	RBA50	0,00	-0,18	0,00	0,00	O
YOL066C	RIB2	-0,48	-0,22	-0,35	0,41	I/K
YOR275C	RIM20	0,00	0,00	0,32	-0,20	O
YMR283C	RIT1	0,00	0,00	0,00	0,15	I/K
YPR065W	ROX1 *	0,25	0,28	0,58	0,37	O
YOR341W	RPA190	0,15	0,45	0,43	0,25	O
YIL021W	RPB3	-0,15	-0,21	-0,26	-0,15	O
YOR224C	RPB8	0,00	-0,19	0,00	0,00	O
YJL011C	RPC17	-0,90	0,27	-0,26	-0,90	O
YHR200W	RPN10	0,00	0,00	0,00	-0,20	O

YFR004W	RPN11	-0,50	-0,53	-0,59	-0,62	G/J
YDL147W	RPN5	-0,42	-0,18	-0,45	-0,46	O
YBL025W	RRN10	0,29	0,29	0,93	1,04	O
YHR069C	RRP4	0,00	0,00	-0,62	-0,62	H
YDL111C	RRP42	0,00	0,34	0,00	0,51	H
YER139C	RTR1	-0,15	-0,19	-0,21	0,00	O
YLR180W	SAM1	0,00	0,00	0,00	0,21	L
YHR083W	SAM35	-0,24	-0,86	-0,72	-0,63	G/J
YBL091C-A	SCS22	0,00	-0,15	-0,25	0,23	B
YMR272C	SCS7	0,00	0,00	-0,17	0,00	B
YLR022C	SDO1	0,15	0,32	0,56	0,40	O
YFL045C	SEC53	0,33	0,60	0,15	0,00	O
YOR140W	SFL1 *	0,00	0,23	0,15	0,00	O
YKR043C	SHB17	0,00	0,00	0,19	0,48	O
YMR216C	SKY1	-0,15	-0,21	-0,24	0,00	C/D/E/M/N
YDR088C	SLU7	-0,23	-0,24	-0,26	-0,16	C/E
YOR149C	SMP3	-0,24	-0,39	-0,57	-0,89	B
YDR510W	SMT3	-0,26	-0,32	-0,35	-0,52	O
YKL173W	SNU114	-1,07	-0,20	-0,63	-1,07	C/E
YDR240C	SNU56	0,16	-0,20	-0,18	-0,23	C/E
YGR013W	SNU71	-0,22	-0,17	-0,36	-0,32	C/E
YHR008C	SOD2	-0,18	-0,21	0,00	-0,18	D
YDR006C	SOK1 *	-0,46	0,37	0,00	0,53	O
YKL184W	SPE1	-0,27	-0,29	-0,16	-0,17	O
YER150W	SPI1	-0,17	0,00	0,00	0,32	O
YBR152W	SPP381	-0,16	0,00	0,00	0,00	C/E
YBR253W	SRB6	0,00	-0,41	-0,51	-0,31	O
YKR091W	SRL3 *	0,16	0,16	0,00	0,57	O
YPL106C	SSE1	-0,31	-0,24	0,00	-0,34	O
YLR452C	SST2	0,00	-0,57	-0,65	0,39	D
YMR019W	STB4	-0,20	0,00	0,00	0,38	A
YHR178W	STB5	-0,14	-0,27	-0,34	-0,22	D
YPR086W	SUA7	0,20	0,29	0,32	-0,25	O
YPR151C	SUE1	0,00	0,18	0,22	0,27	O
YNR004W	SWM2 *	0,00	-0,14	0,00	0,31	K
YOR179C	SYC1	0,39	0,52	0,75	0,72	O
YDR416W	SYF1	-0,24	0,28	0,00	0,00	C/E
YGR274C	TAF1	0,97	0,99	1,09	0,99	O
YML015C	TAF11	-0,46	-0,40	-0,32	0,00	O
YCR042C	TAF2	0,00	-0,53	-0,23	-0,53	O
YML114C	TAF8 *	-0,42	-0,17	-1,12	-0,55	O
YMR028W	TAP42	0,00	0,00	0,30	0,34	O
YPL180W	TCO89	0,00	-0,25	0,00	-0,19	F
YMR291W	TDA1	0,00	-0,99	0,00	-0,50	N
YKR062W	TFA2	0,90	1,18	0,65	0,46	O
YGR005C	TFG2	-0,63	0,00	-0,47	-0,63	O

YOR297C	TIM18	0,00	0,22	0,31	0,23	D/G
YDL217C	TIM22	-0,52	-0,60	-0,65	-0,53	G
YBR067C	TIP1	0,62	0,38	0,34	0,00	O
YPR074C	TKL1	0,00	0,00	0,00	0,15	O
YER113C	TMN3	0,00	0,00	0,00	-0,24	O
YKR010C	TOF2	0,00	0,00	0,00	0,34	O
YBR126C	TPS1	-0,25	-0,97	-0,21	0,00	D/F
YMR233W	TRI1	0,00	0,28	0,00	0,86	A
YOL124C	TRM11	0,00	0,00	0,00	-0,19	I/K
YER090W	TRP2	-0,22	-0,43	-0,31	-0,24	L
YMR304W	UBP15	0,00	-0,18	-0,36	0,00	O
YGR048W	UFD1	0,00	0,00	0,37	0,00	D
YDL190C	UFD2	-0,17	0,00	-0,27	0,00	D
YKL035W	UGP1 *	-0,32	-0,21	0,40	0,47	F
YLR193C	UPS1	0,38	0,31	0,35	0,29	B
YOR054C	VHS3	-0,16	0,00	0,00	0,28	O
YAR029W	YAR029W	0,00	0,00	0,35	0,60	A
YBL094C	YBL094C	0,00	-0,55	0,69	0,52	A
YCR090C	YCR090C	0,18	0,23	-0,16	0,35	A
YCR102C	YCR102C	0,15	0,00	0,36	0,58	D
YCR102W-A	YCR102W-A	0,00	0,00	0,00	0,25	A
YPL087W	YDC1	0,00	0,00	0,00	0,22	B
YDL119C	YDL119C	0,00	0,18	0,27	0,25	O
YDR094W	YDR094W	0,00	0,00	-0,70	0,63	A
YDR124W	YDR124W	0,00	-0,15	-0,18	1,00	A
YDR161W	YDR161W	0,00	-0,29	-0,17	0,00	D
YDR290W	YDR290W	0,00	-0,19	-0,17	0,00	A
YDR455C	YDR455C	0,57	0,00	-0,30	0,00	A
YER067C-A	YER067C-A	0,00	0,00	0,00	0,23	A
YFR020W	YFR020W	0,00	0,00	0,15	0,29	A
YGR050C	YGR050C	0,23	0,40	0,40	0,74	A
YGR125W	YGR125W	0,00	0,20	0,00	0,53	A
YHR125W	YHR125W	0,00	0,00	0,14	0,37	A
YIL141W	YIL141W	0,00	-0,30	0,00	0,00	A
YIL163C	YIL163C	0,20	0,00	0,00	0,00	A
YJR011C	YJR011C	0,27	0,31	0,24	1,15	A
YJR039W	YJR039W	0,00	0,00	0,00	0,26	A
YJR084W	YJR084W	0,15	-0,22	0,60	0,66	C/D/E
YJR120W	YJR120W	0,45	0,41	1,09	1,01	G
YJR124C	YJR124C	0,00	0,00	0,00	0,28	A
YLR012C	YLR012C	0,00	0,00	-0,28	0,00	A
YLR053C	YLR053C	0,00	-0,19	-0,27	0,32	A
YLR112W	YLR112W	0,17	0,17	0,25	0,30	A
YLR184W	YLR184W	-0,70	-0,46	0,00	0,69	A
YLR236C	YLR236C	0,00	0,16	0,14	0,51	A
YML038C	YMD8	0,32	0,21	0,31	0,29	O

YML009C-A	YML009C-A	0,00	-0,23	0,00	0,47	A
YML012C-A	YML012C-A	-0,40	-0,32	0,00	0,00	A
YMR031W-A	YMR031W-A	0,00	-0,15	-0,18	0,48	A
YMR193C-A	YMR193C-A	0,00	0,00	0,00	0,29	A
YMR317W	YMR317W	0,00	0,00	0,16	0,00	A
YNL013C	YNL013C	0,21	-0,21	0,00	0,62	A
YNL024C	YNL024C	0,00	0,17	0,00	0,00	A
YNL034W	YNL034W	0,00	0,00	0,00	0,18	A
YOR240W	YOR240W	0,00	0,00	0,00	0,18	O
YPL109C	YPL109C	0,00	0,00	-0,16	0,23	A
YOL092W	YPQ1 *	0,00	0,00	-0,16	0,27	O
YPR022C	YPR022C *	0,00	0,19	0,44	0,74	A
YPR050C	YPR050C	-0,19	0,14	0,33	0,70	A
YPR064W	YPR064W	0,00	0,16	0,45	0,24	A
YPR078C	YPR078C	0,00	0,00	0,30	0,00	A
YPR153W	YPR153W	0,00	0,00	0,00	0,24	A
YPR170C	YPR170C	0,00	0,00	0,00	0,26	A
YKL214C	YRA2	0,00	0,00	-0,25	0,46	M
YGR270W	YTA7 *	0,60	0,15	1,13	1,24	O
YJL139C	YUR1	0,00	-0,15	0,00	0,22	F
YGL255W	ZRT1	0,00	0,00	-0,20	0,36	O

Obs: Em *itálico/negrito* estão os genes pertencentes à coleção de mutantes sensíveis a temperatura. O asterisco indica os genes que codificam proteínas contendo sequências de poliprolina (PPP ou PPG).

A-Processo biológico desconhecido; **B**-Metabolismo de lipídeos; **C**-Processamento de mRNA; **D**-Resposta a compostos químicos; **E**-Splicing de RNA; **F**-Metabolismo de carboidratos; **G**-Organização mitocondrial; **H**-Processamento de rRNA; **I**-Processamento de tRNA; **J**-Biogênese de complexos protéicos; **K**-Modificação de RNA; **L**-Metabolismo de aminoácido; **M**-Transporte nuclear; **N**-Fosforilação de proteínas; **O**-Outros processos biológicos

Anexo IV. Interações genéticas identificadas nos rastreamentos por SGA e classificadas na ontologia genética “ciclo celular”.

ORF	Array	<i>tif51A-1</i>	<i>tif51A-3</i>	<i>tif51A</i> ^{K56A}	<i>tif51A</i> ^{Q22H/L93F}
YKL112W	<i>ABF1</i> *	-0,58	-0,35	-0,59	-0,46
YFL039C	<i>ACT1</i>	-1,01	-0,68	-0,67	-1,01
YLR028C	ADE16	0,00	0,00	0,29	0,30
YMR092C	AIP1	0,00	-0,24	0,00	0,00
YLR127C	<i>APC2</i>	-0,38	-0,66	-1,09	-0,60
YOR249C	<i>APC5</i> *	-0,66	-0,77	-0,60	-0,46
YKL013C	<i>ARC19</i>	0,00	1,19	0,58	0,73
YNR035C	<i>ARC35</i>	-0,28	-0,32	-0,21	-0,15
YBR234C	<i>ARC40</i>	-0,26	-0,23	-0,50	-0,37
YHR129C	ARP1	-0,23	-0,24	-0,33	-0,62
YDL029W	<i>ARP2</i>	0,18	0,67	0,31	0,34
YOR141C	ARP8 *	0,00	0,37	0,00	1,21
YKL052C	<i>ASK1</i>	-0,35	-0,38	-0,53	-0,40
YPR122W	AXL1 *	0,00	0,00	0,00	0,21
YPL255W	<i>BBP1</i>	0,00	-0,35	-0,35	0,00
YJR053W	BFA1 *	0,30	0,51	0,21	0,81
YCL029C	BIK1	0,00	0,00	-0,27	0,00
YDL074C	BRE1	-0,30	-0,27	-0,33	-0,17
YLR015W	BRE2	0,00	-0,30	0,00	0,00
YBL097W	<i>BRN1</i>	0,36	0,23	0,24	0,82
YJL188C	BUD19	0,22	0,00	0,55	0,90
YKL092C	BUD2	0,00	0,00	0,00	0,24
YCL014W	BUD3	0,00	0,00	0,00	0,36
YOR299W	BUD7	0,00	0,00	0,00	0,18
YGR140W	<i>CBF2</i> *	0,00	-0,63	-0,40	-0,22
YDR182W	<i>CDC1</i>	-0,52	-0,81	-0,78	-0,65
YCR002C	<i>CDC10</i>	-0,63	-1,20	-1,04	-1,15
YJR076C	<i>CDC11</i>	-0,43	-0,43	-0,43	-0,43
YFR028C	<i>CDC14 (cdc14-1)</i>	0,58	0,56	0,59	0,53
YFR028C	<i>CDC14 (cdc14-3)</i>	-0,48	-0,46	-0,77	-0,21
YAR019C	<i>CDC15</i>	-0,17	-0,20	-0,19	-0,26
YAL041W	<i>CDC24</i>	-0,71	-0,71	-0,71	-0,71
YLR310C	<i>CDC25</i>	0,29	0,32	1,19	1,23
YBL084C	<i>CDC27</i>	-0,29	-0,20	-0,20	0,00
YBR160W	<i>CDC28 (cdc28-1)</i>	-0,28	-0,25	0,00	-0,45
YBR160W	<i>CDC28 (cdc28-td)</i>	0,46	0,36	0,25	0,24
YLR314C	<i>CDC3</i>	-0,51	-0,53	-0,29	-0,71
YDR054C	<i>CDC34</i>	-0,31	-0,32	-0,50	-0,28
YDR168W	<i>CDC37</i>	-0,17	-0,27	-0,96	0,27
YDL126C	<i>CDC48</i> *	0,16	0,00	0,22	0,31
YDL017W	<i>CDC7</i>	0,27	-0,22	-0,31	0,00
YLR418C	CDC73 *	-0,23	-0,20	-0,29	0,43
YLR330W	CHS5	-0,14	-0,24	-0,30	-0,20
YMR198W	<i>CIK1</i>	0,96	0,74	0,75	0,80
YBR135W	<i>CKS1</i>	0,00	0,24	0,62	1,04
YBR109C	<i>CMD1</i>	-0,21	-0,19	-0,14	-0,15
YMR094W	<i>CTF13</i>	0,00	-0,26	-0,25	-0,20

YMR078C	CTF18 *	-0,19	-0,37	0,00	-0,30
YPR135W	CTF4	0,00	-0,21	-0,21	-0,14
YDL117W	CYK3	0,00	-0,30	0,00	0,00
YGR113W	DAM1	-1,03	-1,03	-1,03	-1,03
YGR092W	DBF2	-1,01	-0,89	-0,88	-0,88
YDR052C	DBF4 (dbf4-2) *	-0,39	-0,41	-0,29	-0,40
YDR052C	DBF4 (dbf4-4) *	0,43	0,28	0,36	0,15
YCL016C	DCC1	0,00	-0,16	-0,20	-0,28
YDR359C	EAF1 *	0,42	0,45	0,82	1,28
YKL160W	ELF1	0,00	0,00	0,00	-0,18
YKL048C	ELM1	-0,62	-0,71	-0,61	-0,41
YDR512C	EMI1	0,31	0,54	0,27	0,56
YLL038C	ENT4	0,00	0,00	0,00	0,22
YOR244W	ESA1 *	-0,43	-0,63	-0,22	-0,33
YJL157C	FAR1 *	-0,21	0,17	0,59	0,22
YER133W	GLC7	0,00	0,28	-1,10	0,00
YER174C	GRX4	-0,40	-0,63	-0,63	0,00
YBR010W	HHT1	0,00	0,00	0,19	0,27
YBL008W	HIR1	0,00	0,00	0,51	0,49
YOR038C	HIR2	0,00	0,00	0,00	0,41
YGL194C	HOS2	0,00	-0,19	-0,24	0,00
YPL204W	HRR25	0,29	0,37	0,17	0,37
YOR025W	HST3	-0,17	-0,18	-0,20	-0,16
YOL012C	HTZ1	0,00	0,00	0,00	-0,17
YKL189W	HYM1	0,00	0,00	0,24	0,36
YIL090W	ICE2	0,00	0,00	0,18	0,30
YIL026C	IRR1	-0,50	-0,58	-0,42	-0,89
YCL024W	KCC4	0,00	0,00	0,00	0,27
YGR238C	KEL2 *	0,00	0,00	0,00	0,27
YOR233W	KIN4	0,00	0,00	0,00	0,35
YDL003W	MCD1	-0,16	-0,21	-0,23	-0,25
YMR043W	MCM1	0,17	0,28	0,14	0,18
YPR019W	MCM4 *	0,00	-1,63	-1,23	-0,28
YLR274W	MCM5	-0,58	-0,46	0,47	0,88
YBR202W	MCM7	-0,25	-0,78	-0,78	-0,78
YDR461W	MFA1	0,56	0,29	1,05	0,59
YKL089W	MIF2	-0,28	-0,21	-0,23	-0,24
YKR095W	MLP1	0,00	0,00	0,00	0,39
YDR245W	MNN10 *	0,00	-0,27	-0,43	0,00
YFL034C-B	MOB2 (mob-26) *	0,52	0,70	0,50	0,79
YFL034C-B	MOB2 (mob-34) *	-0,16	-0,18	-0,19	-0,20
YDL028C	MPS1 *	-0,89	-0,73	-0,75	-0,67
YMR224C	MRE11	-0,22	-0,18	-0,18	0,00
YOL090W	MSH2	-0,17	-0,23	-0,19	0,81
YNR049C	MSO1 *	0,00	0,20	0,19	0,34
YDR208W	MSS4	0,14	1,35	1,23	0,72
YAL034W-A	MTW1	-0,58	-0,49	-0,24	-0,28
YOR298W	MUM3	0,00	0,00	0,00	0,19
YOR326W	MYO2	-0,23	-0,33	-0,24	-0,25
YML031W	NDC1	-0,46	-0,91	-1,24	0,00
YPL174C	NIP100	0,00	0,00	0,00	-0,34

YJR072C	NPA3	0,00	-0,65	-0,59	-0,36
YBR170C	NPL4	0,00	0,00	0,00	-0,43
YPL233W	NSL1	-0,28	-0,25	-0,28	-0,38
YDR150W	NUM1	0,00	0,00	0,00	-0,23
YGR179C	OKP1	0,00	0,00	0,00	0,34
YML065W	ORC1 *	0,28	0,29	0,26	0,25
YBR060C	ORC2 (orc2-1) *	-0,84	-0,84	-0,84	-0,84
YBR060C	ORC2 (orc2-4) *	0,32	0,26	0,26	0,22
YPR162C	ORC4	0,31	0,48	-0,58	0,34
YDR488C	PAC11	-0,21	0,00	-0,19	-0,25
YDR113C	PDS1	0,14	0,00	0,18	0,20
YMR076C	PDS5	0,00	-0,62	-0,68	-0,31
YGR058W	PEF1 *	0,19	0,23	0,25	0,18
YBR196C	<i>PGI1</i>	0,00	0,38	0,24	-0,28
YNL097C	PHO23	-0,21	-0,21	-0,23	-0,15
YBL105C	PKC1	-0,34	-0,40	-0,61	-0,40
YDL102W	POL3	-0,68	-0,64	-0,45	-0,60
YIR008C	PRI1	-0,34	-0,29	-0,40	-0,47
YKL045W	PRI2	-0,22	0,00	-0,66	-0,22
YPL022W	RAD1	0,37	-0,34	0,00	1,09
YBR267W	REI1	0,25	0,41	0,39	0,38
YAR007C	RFA1	-0,16	-0,36	-0,22	0,00
YOL094C	RFC4 *	-0,16	-1,04	-0,32	0,00
YGL045W	RIM8 *	-0,15	-0,18	0,17	-0,14
YMR063W	RIM9	0,00	-0,26	0,00	-0,19
YLR145W	<i>RMP1</i>	0,33	0,15	1,13	1,15
YGL048C	RPT6 *	-0,45	-0,42	-0,27	-0,49
YLR357W	RSC2	0,17	0,18	0,00	0,95
YKR008W	RSC4	0,00	0,45	0,38	0,00
YCR052W	RSC6	0,00	-0,34	0,00	-0,19
YFR037C	RSC8	0,21	0,18	0,35	-0,23
YGL244W	RTF1	-0,23	-0,27	-0,25	-0,16
YJL047C	RTT101	0,00	0,00	0,00	-0,14
YCR009C	RVS161	0,00	0,74	0,71	-0,21
YDR159W	SAC3	-0,27	-0,31	-0,40	0,00
YDR389W	SAC7	0,00	-0,19	0,00	0,00
YFR040W	SAP155	0,00	-0,18	0,16	0,00
YCR008W	SAT4	0,00	-0,16	0,00	0,38
YER147C	SCC4	0,00	-0,41	-0,40	-0,26
YDR469W	SDC1	0,42	0,00	0,00	-0,26
YIL084C	SDS3	-0,49	-0,34	-0,39	-0,42
YFL005W	SEC4	-0,25	-0,20	0,00	0,00
YKR029C	SET3	-0,16	-0,22	-0,22	0,15
YPR161C	SGV1 *	0,30	0,30	0,38	0,29
YBR258C	SHG1	0,00	-0,19	0,00	0,81
YLR079W	SIC1	-0,23	-0,26	-0,34	-0,42
YNL032W	SIW14	0,00	0,00	0,20	0,56
YHR030C	SLT2	-0,14	-0,14	-0,14	-0,14
YFL008W	SMC1	-0,22	-0,19	-0,33	-0,37
YJL074C	SMC3	-0,26	-0,42	-0,48	-0,42
YLR086W	SMC4	0,00	0,67	0,91	1,20

YGR229C	SMI1	0,00	-0,28	0,00	0,00
YHL025W	SNF6	0,00	-0,25	-0,18	0,22
YDR478W	<i>SNM1</i>	0,39	0,38	0,31	0,40
YCR033W	SNT1 *	-0,21	-0,22	-0,24	0,18
YGL127C	SOH1	0,56	0,88	0,76	0,20
YMR117C	SPC24	-0,16	-0,51	-0,83	-0,21
YKL042W	SPC42	0,26	0,31	0,42	0,39
YDR392W	SPT3	-0,15	0,00	0,71	1,32
YNL138W	SRV2 *	-0,67	-0,60	-0,46	-0,59
YMR183C	SSO2	-0,23	-0,41	-0,23	-0,21
YDR082W	STN1	-0,46	0,55	-0,55	-0,30
YLR045C	STU2	-0,33	-0,60	-0,45	-0,24
YGR002C	SWC4	-0,33	0,81	0,26	-0,19
YBR231C	SWC5	0,48	0,00	0,56	0,80
YDR145W	TAF12	-0,94	-0,81	-0,93	0,00
YBR198C	TAF5 (taf5-20) *	-0,48	-0,38	-0,47	-0,39
YBR198C	TAF5 (taf5-3) *	0,31	0,41	0,29	0,29
YPL128C	TBF1 *	0,00	-0,23	-0,17	-0,21
YOL006C	TOP1 *	0,00	-0,18	0,00	0,00
YKL203C	TOR2	0,21	0,23	0,30	0,25
YNL079C	TPM1	0,00	-0,23	-0,17	0,00
YFL037W	TUB2	0,42	0,89	0,44	0,00
YHR111W	UBA4 *	-0,24	-0,44	-0,39	-0,24
YDL064W	UBC9	0,00	-0,15	-0,31	0,00
YPL020C	ULP1	-0,19	-0,26	-0,21	-0,23
YDR207C	UME6 *	0,00	-0,24	-0,20	0,00
YDR325W	YCG1	0,00	-0,50	-0,20	0,00
YPL205C	YPL205C	0,00	0,00	0,21	0,17
YDR002W	YRB1	-0,20	-0,32	-0,30	-0,29
YGR211W	ZPR1	0,00	0,00	0,00	-0,26

Obs: Em itálico/negrito estão os genes pertencentes à coleção de mutantes sensíveis a temperatura. O asterisco indica os genes que codificam proteínas contendo sequências de poliprolina (PPP ou PPG).

Anexo V. Interações genéticas identificadas nos rastreamentos por SGA e classificadas na ontologia genética “reparo de DNA”.

ORF	Array	<i>tif51A-1</i>	<i>tif51A-3</i>	<i>tif51A</i> ^{K56A}	<i>tif51A</i> ^{Q22H/L93F}
YKL112W	<i>ABF1</i> *	-0,58	-0,35	-0,59	-0,46
YFL039C	<i>ACT1</i>	-1,01	-0,68	-0,67	-1,01
YOR141C	ARP8 *	0,00	0,37	0,00	1,21
YDL074C	BRE1	-0,30	-0,27	-0,33	-0,17
YDR182W	<i>CDC1</i>	-0,52	-0,81	-0,78	-0,65
YBR160W	<i>CDC28 (cdc28-1)</i>	-0,28	-0,25	0,00	-0,45
YBR160W	<i>CDC28 (cdc28-td)</i>	0,46	0,36	0,25	0,24
YDL017W	<i>CDC7</i>	0,27	-0,22	-0,31	0,00
YLR418C	CDC73 *	-0,23	-0,20	-0,29	0,43
YBR274W	CHK1	0,25	0,36	1,04	0,69
YOR061W	CKA2	0,00	0,00	0,23	0,41
YMR078C	CTF18 *	0,00	-0,29	-0,62	-0,35
YPR135W	CTF4	0,00	-0,21	-0,21	-0,14
YCL016C	DCC1	0,00	-0,16	-0,20	-0,28
YDR359C	EAF1 *	0,42	0,45	0,82	1,28
YOR244W	<i>ESA1</i> *	-0,43	-0,63	-0,22	-0,33
YER133W	<i>GLC7</i>	0,00	0,28	-1,10	0,00
YBR010W	HHT1	0,00	0,00	0,19	0,27
YPL204W	<i>HRR25</i>	0,29	0,37	0,17	0,37
YOR189W	IES4	0,00	-0,26	0,00	0,61
YKL032C	IXR1	-0,14	-0,30	-0,51	0,00
YMR043W	<i>MCM1</i>	0,17	0,28	0,14	0,18
YPR019W	<i>MCM4</i> *	0,00	-1,63	-1,23	-0,28
YLR274W	<i>MCM5</i>	-0,58	-0,46	0,47	0,88
YBR202W	<i>MCM7</i>	-0,25	-0,78	-0,78	-0,78
YNL085W	MKT1	-0,16	0,00	0,00	0,65
YMR224C	MRE11	-0,22	-0,18	-0,18	0,00
YOL090W	MSH2	-0,17	-0,23	-0,19	0,81
YDR288W	<i>NSE3</i>	0,28	0,00	1,04	0,51
YML023C	<i>NSE5</i>	-0,80	-0,94	-0,81	-0,90
YDR113C	<i>PDS1</i>	0,14	0,00	0,18	0,20
YMR076C	<i>PDS5</i>	0,00	-0,62	-0,68	-0,31
YKL045W	<i>PRI2</i>	-0,22	0,00	-0,66	-0,22
YPL022W	RAD1	0,37	-0,34	0,00	1,09
YMR201C	RAD14 *	0,33	0,39	0,66	0,91
YER171W	<i>RAD3</i>	-0,44	-0,40	0,00	-0,60
YER162C	RAD4	0,28	0,00	0,35	0,57
YAR007C	<i>RFA1</i>	-0,16	-0,36	-0,22	0,00
YOL094C	<i>RFC4</i> *	-0,16	-1,04	-0,32	0,00
YDL020C	RPN4	0,00	-0,17	0,00	-0,20
YDL140C	<i>RPO21</i> *	-0,38	-0,32	-0,23	-0,26
YOR259C	<i>RPT4</i> *	-0,18	-0,23	-0,27	0,00

YGL048C	<i>RPT6</i> *	-0,45	-0,42	-0,27	-0,49
YLR357W	RSC2	0,17	0,18	0,00	0,95
YFR037C	<i>RSC8</i>	0,21	0,18	0,35	-0,23
YGL244W	RTF1	-0,23	-0,27	-0,25	-0,16
YJL047C	RTT101	0,00	0,00	0,00	-0,14
YDR159W	SAC3	-0,27	-0,31	-0,40	0,00
YER147C	<i>SCC4</i>	0,00	-0,41	-0,40	-0,26
YDL013W	SLX5	0,17	0,00	0,00	0,18
YFL008W	<i>SMC1</i>	-0,22	-0,19	-0,33	-0,37
YJL074C	<i>SMC3</i>	-0,26	-0,42	-0,48	-0,42
YHL025W	SNF6	0,00	-0,25	-0,18	0,22
YGL127C	SOH1	0,56	0,88	0,76	0,20
YJL092W	SRS2	0,00	0,00	0,00	0,30
YIL143C	<i>SSL2</i>	-1,01	-1,01	-0,34	-0,82
YGR002C	<i>SWC4</i>	-0,33	0,81	0,26	-0,19
YDR311W	<i>TFB1</i>	0,19	1,05	0,66	0,58
YML028W	TSA1	0,00	-0,16	0,00	0,21

Obs: Em itálico/negrito estão os genes pertencentes à coleção de mutantes sensíveis a temperatura. O asterisco indica os genes que codificam proteínas contendo sequências de poliprolina (PPP ou PPG).

Anexo VI. Interações genéticas identificadas nos rastreamentos e classificadas na ontologia genética “tradução”.

ORF	Array	<i>tif51A-1</i>	<i>tif51A-3</i>	<i>tif51A</i> ^{K56A}	<i>tif51A</i> ^{Q22H/L93F}
YJR047C	ANB1	0,00	-0,23	-0,24	0,00
YDR101C	ARX1	0,00	0,00	0,45	0,60
YMR116C	ASC1	-0,27	-0,48	-0,44	-0,31
YPL048W	CAM1	0,00	-0,31	0,00	0,33
YGL029W	CGR1	0,44	0,22	0,25	0,68
YML129C	COX14	0,53	0,00	0,65	1,22
YKL139W	CTK1 *	-0,23	-0,20	-0,27	0,00
YFL001W	DEG1 *	0,00	0,00	0,00	0,25
YLR186W	EMG1	0,25	0,25	0,27	0,29
YDR339C	FCF1	0,24	0,15	0,30	0,21
YDL207W	GLE1	0,00	-0,24	0,00	-0,42
YNL075W	IMP4	0,46	0,22	0,36	0,39
YDR060W	MAK21	-0,26	-0,29	-0,26	-0,24
YKL009W	MRT4	0,00	-0,16	0,17	0,27
YPL226W	NEW1 *	0,36	0,90	0,51	1,05
YOL041C	NOP12	0,75	0,41	0,48	1,09
YDL148C	NOP14	0,39	0,29	0,34	0,26
YBR230C	OM14	0,00	0,00	0,00	0,47
YOR361C	PRT1	0,53	0,41	0,23	0,28
YHR189W	PTH1	0,72	1,38	0,18	0,57
YBR079C	RPG1 *	-0,16	-0,17	-0,32	-0,17
YNL069C	RPL16B *	-0,37	-0,27	-0,20	-0,21
YBL027W	RPL19B	-0,30	-0,45	-0,77	-0,42
YGL135W	RPL1B	-0,22	-0,16	-0,31	-0,16
YOR312C	RPL20B	0,00	-0,29	0,00	0,85
YIL148W	RPL40A	0,36	0,23	0,51	0,00
YHL033C	RPL8A	0,47	0,25	0,28	0,30
YLL045C	RPL8B	0,16	0,14	0,00	0,40
YNL067W	RPL9B	0,00	0,15	0,32	0,18
YDL081C	RPP1A	0,53	0,19	0,32	0,31
YLR048W	RPS0B	-0,21	-0,17	0,00	0,00
YOR293W	RPS10A	0,16	0,18	0,33	0,22
YDR025W	RPS11A	0,00	0,00	-0,17	-0,26
YLR441C	RPS1A	0,00	0,17	0,21	0,30
YML063W	RPS1B	0,00	0,00	0,00	0,22
YKR057W	RPS21A	0,00	0,00	0,18	0,24
YGR027C	RPS25A	-0,15	0,25	0,27	0,43
YDL061C	RPS29B	0,22	0,00	0,35	0,90
YOR182C	RPS30B	0,00	0,14	0,16	0,22
YPL090C	RPS6A	-0,19	-0,20	-0,19	-0,21
YBR181C	RPS6B	-0,20	-0,24	-0,23	-0,45
YBL072C	RPS8A	0,00	0,53	0,21	0,26

YOR294W	<i>RRS1</i>	1,29	1,13	1,15	1,17
YCL037C	SRO9	0,65	0,51	0,85	0,86
YDL229W	SSB1	0,00	-0,19	0,00	0,00
YDR293C	SSD1 *	-0,48	-0,20	-0,16	-0,36
YDR312W	<i>SSF2</i>	0,00	0,00	0,24	0,00
YBR143C	<i>SUP45</i>	0,00	-0,27	0,00	-0,34
YBR118W	<i>TEF2</i>	-0,22	-0,24	-0,36	-0,16
YPR016C	<i>TIF6</i>	0,26	0,50	0,33	0,00
YDR398W	<i>UTP5</i>	-0,21	0,25	-0,18	0,00
YDR449C	<i>UTP6</i>	0,40	0,26	0,34	0,29
YLR249W	<i>YEF3</i>	0,19	0,26	0,00	0,71
YOR272W	<i>YTM1</i>	0,00	-0,25	-0,43	-0,18

Obs: Em itálico/negrito estão os genes pertencentes à coleção de mutantes sensíveis a temperatura. O asterisco indica os genes que codificam proteínas contendo sequências de poliprolina (PPP ou PPG).

Anexo VII. Interações genéticas identificadas nos rastreamentos e classificadas na ontologia genética “tráfego vesicular/secreção”.

ORF	Array	<i>tif51A-1</i>	<i>tif51A-3</i>	<i>tif51A</i> ^{K56A}	<i>tif51A</i> ^{Q22H/L93F}
YDL192W	ARF1	0,29	0,32	0,31	0,29
YPR176C	BET2	0,00	0,45	0,38	0,34
YKR068C	BET3	-0,33	-0,23	-0,20	-0,43
YML077W	BET5	-0,66	-0,31	-0,87	-1,33
YLR078C	BOS1	-0,49	-0,20	-0,43	-0,52
YNR051C	BRE5 *	0,00	-0,24	-0,32	0,00
YGR120C	COG2	-0,91	-0,79	-0,50	-0,46
YNL041C	COG6	0,57	0,49	0,47	0,34
YGL005C	COG7	0,00	0,16	0,00	0,18
YBR036C	CSG2	0,00	0,00	-0,20	-0,35
YML067C	ERV41	0,00	0,00	0,00	0,37
YDL100C	GET3	0,41	0,00	0,15	0,78
YPL204W	HRR25	0,29	0,37	0,17	0,37
YIL048W	NEO1	-0,54	-0,33	-0,86	-0,79
YDL193W	NUS1 *	-0,16	0,00	-0,15	-0,51
YKL212W	SAC1	0,00	0,00	0,43	0,36
YDR164C	SEC1	-0,36	-0,43	-0,27	-0,28
YLR166C	SEC10	-0,20	-0,20	-0,23	-0,23
YNR026C	SEC12	0,23	0,23	0,58	0,23
YBL050W	SEC17	-0,44	-0,35	-0,49	-0,43
YDR498C	SEC20	-0,66	-0,45	-0,55	-0,59
YLR268W	SEC22	-0,42	-0,27	-0,23	-0,24
YDR238C	SEC26	-0,18	-0,27	0,00	-0,23
YDL195W	SEC31 *	-0,20	0,00	0,00	0,00
YLR440C	SEC39	-0,67	-0,65	-0,48	-0,73
YFL005W	SEC4	-0,25	-0,20	0,00	0,00
YDR166C	SEC5	0,00	-0,20	-0,24	-0,15
YPL094C	SEC62	0,00	0,00	0,17	0,23
YML105C	SEC65	-1,19	-0,42	-0,29	-1,19
YDR170C	SEC7 *	0,00	0,00	-0,64	-0,66
YPR055W	SEC8	0,97	0,88	0,93	1,05
YGR009C	SEC9 *	-1,04	-0,39	-0,27	0,34
YKL006C-A	SFT1	0,16	0,00	0,21	0,18
YOR327C	SNC2	-0,18	-0,19	0,00	0,23
YBR254C	TRS20	-0,90	-0,39	-0,40	-0,90
YGL212W	VAM7	0,44	0,38	0,78	1,14
YDR080W	VPS41	-0,35	-0,41	0,00	0,80
YJL029C	VPS53	0,14	-0,38	-0,26	-0,51
YDR486C	VPS60	0,86	0,88	0,52	0,00
YMR197C	VTI1	-0,53	-0,27	0,00	-0,53
YKL065C	YET1	0,00	0,00	0,00	0,28
YGR172C	YIP1 (yip1-4)	-0,31	-0,25	-0,22	-0,34
YGR172C	YIP1 (yip1-40)	0,29	0,32	0,45	0,25

Obs: Em itálico/negrito estão os genes pertencentes à coleção de mutantes sensíveis a temperatura. O asterisco indica os genes que codificam proteínas contendo sequências de poliprolina (PPP ou PPG).