

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA
APLICADAS À FARMÁCIA

ANGÉLICA HOLLUNDER KLIPPEL

**Estudo do envolvimento de eIF5A na resposta ao estresse de retículo
endoplasmático em *Saccharomyces cerevisiae***

Araraquara
2017

ANGÉLICA HOLLUNDER KLIPPEL

**Estudo do envolvimento de eIF5A na resposta ao estresse de retículo
endoplasmático em *Saccharomyces cerevisiae***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêutica da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP, como requisito parcial para obtenção do título de Mestra em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Área de concentração: Biologia Molecular

Orientador: Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini

Coorientador: Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli

Araraquara
2017

Ficha Catalográfica

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

K138e

Klippel, Angélica Hollunder

Estudo do envolvimento de eIF5A na resposta ao estresse de retículo endoplasmático em *Saccharomyces cerevisiae* / Angélica Hollunder Klippel. – Araraquara, 2017.
135 f. : il.

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

Orientador: Sandro Roberto Valentini.

Coorientador: Cleslei Fernando Zanelli.

1. Ribossomo. 2. Via secretória. 3. *Unfolded Protein Response*. 4. DTT. 5. Tunicamicina.
6. *Synthetic Genetic Array*. I. Valentini, Sandro Roberto, orient. II. Zanelli, Cleslei Fernando,
coorient. III. Título.

CAPES: 40300005

ANGÉLICA HOLLUNDER KLIPPEL

**Análise da relação funcional entre eIF5A e o fator de transcrição Hac1 na levedura
*Saccharomyces cerevisiae***

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

Araraquara, 04 de setembro de 2017.

BANCA EXAMINADORA



CLESLEI FERNANDO ZANELLI



MÁRIO HENRIQUE BENGTON

CARLA COLUMBANO DE OLIVEIRA
(Membro participante por videoconferência)

Dedico este trabalho aos meus pais (Deoclério e Tereza) e irmãos/irmão do coração (Andréia, Valéria e Luciano) pelo apoio, carinho, ensinamentos e pela compreensão nos muitos momentos importantes em que estava ausente por causa das obrigações acadêmicas. Sem vocês não seria nada!!!

AGRADECIMENTOS

A Deus, que direciona meus passos e me dá forças para seguir em frente.

À minha família e amigos, por estarem presentes nos momentos felizes e principalmente nos não tão felizes.

Aos mestres que, ao longo de toda a minha formação, colaboraram para a construção dos meus conhecimentos.

Ao orientador deste trabalho, Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini, pela oportunidade de realizar esse projeto.

Um agradecimento especial ao Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli, que me coorientou com muito empenho e proporcionou inúmeros momentos de discussão e reflexão que foram essenciais para a execução desse trabalho.

Às professoras, Dra. Valéria Valente e Dra. Tatiana Maria de Souza, pela participação e contribuição no exame geral de qualificação.

A todos os colegas de trabalho e amigos do “lab” BiomolVZ, pela parceria que foi além dos experimentos e reuniões científicas. Em especial, gostaria de agradecer à Bianca e à Keylla pelo suporte no momento mais difícil.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Processo nº 2015/0728-5), CAPES, CNPq, PADC, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara e *Donnelly Centre (CCBR) /University of Toronto* pelo apoio financeiro e institucional, que foi essencial para a realização desse trabalho.

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

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara, em especial às funcionárias da pós-graduação e da biblioteca, sempre prontas para ajudar no que foi preciso.

“Perfer et obdura; dolor hic tibi proderit olim. ”

Ovid

RESUMO

O fator de tradução de eucariotos 5A (eIF5A) é altamente conservado em arqueas e eucariotos e sofre uma modificação pós-traducional única e essencial chamada hipusinação. Embora tenha sido sugerida inicialmente uma função para eIF5A no início da tradução, foi na etapa de alongação que sua função foi melhor demonstrada. Estudos prévios mostraram que eIF5A tem algum papel na translocação de proteínas pela via co-traducional e que mutantes desse fator possuem níveis aumentados de proteínas envolvidas com o estresse de retículo endoplasmático (RE). Desta forma, nesse trabalho, foi estudada a correlação entre eIF5A e a via de resposta ao estresse de RE (*Unfolded Protein Response* - UPR). Considerando que o fator de transcrição Hac1 é um elemento essencial da via UPR em *Saccharomyces cerevisiae*, foi inicialmente verificado se eIF5A afetava o *splicing* citoplasmático do mRNA de *HAC1*, o qual é dependente da ativação de Ire1, um sensor de proteínas desenoveladas no interior do RE. Para isto, foi realizada a quantificação dos níveis de mRNA maduro e imaturo de *HAC1* por meio de ensaios de qPCR e RT-PCR semiquantitativa, análises estas que não revelaram qualquer diferença de comportamento do mutante *hyp2-3* de eIF5A em relação ao selvagem. Por outro lado, diferentes mutantes de eIF5A mostraram sensibilidade a DTT e resistência a tunicamicina, um comportamento ainda não descrito na literatura e que difere de mutantes da via de SRP (via co-traducional de translocação de proteínas para o RE). Além disso, este comportamento de mutantes de eIF5A não foi modificado pela superexpressão dos componentes de SRP. Ainda, o fenótipo de mutantes de eIF5A frente ao DTT e à tunicamicina difere daquele de linhagens que apresentam nocaute de proteínas ribossomais, nocaute de um fator de biogênese de ribossomo ou de um mutante dominante-negativo de eEF2 (*translation elongation factor 2*). Assim, estes resultados sugerem que a sensibilidade ao DTT e a resistência à tunicamicina, com a diminuição da função de eIF5A, não esteja diretamente relacionada com a via de SRP ou a um defeito geral na tradução. Também foi demonstrado que o fenótipo de resistência a tunicamicina dos mutantes de eIF5A não depende de Ire1 ou Hac1. Para entender melhor estes fenótipos dos mutantes de eIF5A, foi realizada uma determinação do perfil proteômico (utilizando a estratégia de *Synthetic Genetic Array* e a coleção GFP de *S. cerevisiae*) do mutante *hyp2-3* na presença de DTT, tunicamicina ou na condição controle sem tratamento. A análise destes resultados revelou proteínas que estão diminuídas no mutante *hyp2-3* em relação ao selvagem e que podem contribuir para explicar os fenótipos observados. Por fim, a análise deste perfil proteômico, assim como de outros dados obtidos nesse trabalho, não sugerem uma pré-ativação de UPR perante a diminuição da função de eIF5A em *S. cerevisiae*, como observado em um trabalho recente com células HeLa.

Palavras-chave: Ribossomo. Via secretória. *Unfolded Protein Response*. DTT. Tunicamicina. *Synthetic Genetic Array*.

ABSTRACT

The eukaryotic translation factor 5A (eIF5A) is highly conserved in archaea and eukaryotes and undergoes a unique and essential post-translational modification called hypusination. Although a function for eIF5A was initially suggested at the initiation of translation, it was in the elongation step that its function was best demonstrated. Previous studies have shown that eIF5A has a role in protein translocation by the co-translational pathway and that mutants of this factor have increased levels of proteins involved with endoplasmic reticulum (ER) stress. Therefore, in this work, the correlation of eIF5A with the stress response pathway of ER (the Unfolded Protein Response - UPR) was studied. Considering that the Hac1 transcription factor is an essential element of the UPR pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, it was first verified whether eIF5A affects the cytoplasmic *splicing* of the *HAC1* mRNA, which is dependent on the activation of Ire1, a sensor of unfolded proteins in the RE. To test it, we did the quantification of the mature and immature mRNA levels of *HAC1* by means of qPCR and semi-quantitative RT-PCR assays, which did not reveal any difference in the behavior of the eIF5A mutant *hyp2-3* in comparison to the wild-type. On the other hand, different mutants of eIF5A show sensitivity to DTT and resistance to tunicamycin, a behavior not yet described in the literature and that differs from mutants of the SRP pathway (co-translocation pathway for RE) and also this behavior of eIF5A mutants was not modified by overexpression of SRP. In addition, the eIF5A mutant phenotype in DTT and tunicamycin differs from that of knockout strains of ribosomal proteins, knockout of a ribosome biogenesis factor or a dominant-negative mutant of eEF2 (translation elongation factor 2). Thus, these results suggest that the sensitivity to DTT and resistance to tunicamycin upon decreased eIF5A function is not an effect related to the SRP pathway or a general translation defect. Furthermore, the tunicamycin resistance phenotype of the eIF5A mutants has been shown to be Ire1 or Hac1 independent. To better understand these UPR-related eIF5A phenotypes, we determined the proteome profile (using the Synthetic Genetic Array strategy and the *S. cerevisiae* GFP collection) of the *hyp2-3* mutant on treatment with DTT, tunicamycin or in the untreated control condition. Analysis of these results revealed proteins that are decreased in *hyp2-3* when compared to the wild-type and that could contribute to explain the phenotypes observed for this mutant. Finally, analysis of this proteomic profile and other data from this study do not suggest a pre-activation of UPR with the decrease of eIF5A function, as observed in a recent work using HeLa cells.

Keywords: Ribosome. Secretory Pathway. Unfolded Protein Response. DTT. Tunicamycin. Synthetic Genetic Array.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema do mecanismo de elongação e terminação da tradução.	17
Figura 2. Alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos de eIF5A de diferentes organismos.	18
Figura 3. Via da biossíntese do resíduo de hipusina no precursor de eIF5A.	19
Figura 4. eIF5A alivia o <i>stalling</i> dos ribossomos em vários <i>motifs</i> peptídicos além das poliprolinas.	21
Figura 5. Papel expandido para eIF5A na tradução.	21
Figura 6. Representação esquemática da translocação de proteínas para o retículo endoplasmático.	23
Figura 7. Mecanismo de ação dos três principais braços da via UPR em eucariotos superiores.	25
Figura 8. Ativação da via UPR por Hac1 em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	26
Figura 9. Organização da placa 1 da coleção GFP.	40
Figura 10. Esquema ilustrativo da metodologia <i>Synthetic Genetic Array</i> (SGA).	42
Figura 11. Exemplo de bloco do <i>GenePix</i> para delimitar a obtenção de fluorescência de cada colônia.	45
Figura 12. Etapas utilizadas para a análise dos dados de fluorescência.	47
Figura 13. Análise de integridade do RNA purificado de <i>S. cerevisiae</i> .	54
Figura 14. Regiões de anelamento dos <i>primers</i> desenhados para o mRNA de <i>HAC1</i> .	55
Figura 15. Taxa de <i>splicing</i> do mRNA de <i>HAC1</i> nas linhagem selvagem e mutante de eIF5A na ausência ou presença de 32 mM de DTT.	57
Figura 16. <i>Primers</i> utilizados para a amplificação de <i>HAC1</i> maduro ou imaturo.	58
Figura 17. Detecção do <i>splicing</i> de <i>HAC1</i> por RT-PCR.	59
Figura 18. Mutantes de eIF5A apresentam sensibilidade distinta a drogas indutoras de estresse de RE.	60
Figura 19. Teste de sensibilidade de mutantes de SRP a drogas indutoras de estresse de RE.	61
Figura 20. Superexpressão dos componentes do complexo SRP.	62

Figura 21. Análise de interação genética entre os mutantes de eIF5A e nocautes de <i>HAC1</i> ($\Delta hac1$) ou <i>Ire1</i> ($\Delta ire1$).	63
Figura 22. Mutante de eIF5A apresenta comportamento distinto de linhagens com deleção de proteínas ribossomais na presença de drogas indutoras de estresse de RE.	65
Figura 23. Comportamento da linhagem selvagem transformada com o mutante dominante negativo de eEF2 ($eft2^{H699K}$) na presença de drogas indutoras de estresse de RE.	66
Figura 24. Análise de interação genética entre o mutante eEF2 ($eft2^{H699K}$) e nocautes para <i>Hac1</i> ($\Delta hac1$) ou <i>Ire1</i> ($\Delta ire1$).	67
Figura 25. Resultado do escaneamento de uma placa da coleção GFP com o <i>background</i> selvagem e mutante de eIF5A (<i>hyp2-3</i>).	69
Figura 26. Amostra dos resultados da sobreposição das imagens de fluorescência de GFP e RFP obtidos após escaneamento no <i>Typhoon</i> .	70
Figura 27. Semelhança entre o comportamento dos controles em diferentes placas.	71
Figura 28. Correlação linear entre as replicatas nas diferentes condições de estudo.	72
Figura 29. Resultado da análise de GO para a condição de tratamento com DTT.	78
Figura 30. Resultado da análise de GO para a condição de tratamento com tunicamicina.	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Linhagens de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas neste trabalho.	31
Tabela 2. Plasmídeos utilizados neste trabalho	32
Tabela 3. Sequências dos <i>primers</i> utilizados nas análises de qPCR.	34
Tabela 4. Quantificação das amostras de RNA em triplicata utilizadas nas análises de qPCR.	53
Tabela 5. Concentração e eficiência dos pares de <i>primers</i> nas reações de qPCR para o gene em estudo.	56
Tabela 6. Correspondências entre os termos de GO enriquecidos da lista de alvos de UPR em comparação com as proteínas com níveis aumentados na linhagem selvagem após o tratamento com DTT.	74
Tabela 7. Correspondências entre os termos de GO enriquecidos da lista de alvos de UPR em comparação com as proteínas com níveis aumentados na linhagem selvagem após o tratamento com tunicamicina.	75
Tabela 8. Número de <i>hits</i> identificadas na análise proteômica de GFP/RFP.	77
Tabela 9. Correspondências entre os genes descritos na literatura cujo nocaute gera resistência a tunicamicina ou sensibilidade a DTT com os <i>hits</i> desse trabalho.	80

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	porcentagem
°C	graus Celsius
µg	micrograma
µL	microlitro
µM	micromolar
cDNA	DNA complementar ao mRNA
Ct	<i>cycle threshold</i>
clonNAT	nourseotricina
C-terminal	carboxi-terminal
D.O. _{600nm}	densidade óptica a 600nm
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP)
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
eIF5A	<i>eukaryotic translation initiation factor 5A</i>
FDR	<i>false discovery rate</i>
g	grama
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GO	<i>gene ontology</i>
h	hora
kb	kilobase
kDa	quilodalton
L	litro
LB	meio Luria-Bertani
LiAC	acetato de lítio
M	molar
m/v	relação massa/volume
mg	miligrama
MgSO ₄	sulfato de magnésio
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
mRNA	RNA mensageiro

ng	nanograma
nm	nanômetros
N-terminal	amino-terminal
pb	pares de base
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEG	polietilenoglicol
pg	picograma
pH	potencial hidrogeniônico
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i>
qsp	quantidade suficiente para
RE	retículo endoplasmático
RFP	<i>red fluorescent protein</i>
RNA	ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribossomal
RT-PCR	<i>reverse transcription polimerase chain reaction</i>
s	segundo
SC	meio sintético completo para levedura
SDS	dodecil sulfato de sódio
SGA	<i>synthetic genetic array</i>
SGD	<i>Saccharomyces genome databank</i>
SRP	<i>signal recognition particle</i>
S-SPO	<i>super-sporulation media</i>
TE	tampão Tris-EDTA
Tris	tris-hidroximetilaminometano (trizma base)
tRNA	RNA transportador
tRNAi ^{Met}	tRNA iniciador de metionina
UPR	<i>unfolded protein response</i>
UV	ultravioleta
V	volt
v/v	relação volume/volume
xg	aceleração gravitacional
YPD	<i>yeast extract, peptone, dextrose</i> (meio rico para levedura)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVOS.....	28
2.1. Objetivo Geral	28
2.2. Objetivos Específicos	28
2.2.1. Análise dos níveis de mRNA de Hac1 em um mutante de eIF5A por PCR quantitativa em tempo real (qPCR)	28
2.2.2. Análise de interação genética de Hac1 e Ire1 com mutantes de eIF5A	28
2.2.3. Perfil proteômico celular utilizando a coleção de ORFs-GFP de <i>S. cerevisiae</i> e <i>Synthetic Genetic Array</i> (SGA)	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1. Materiais	30
3.2. Métodos	32
3.2.1. Análise dos níveis de mRNA de Hac1 em um mutante de eIF5A por PCR quantitativa em tempo real (qPCR)	32
3.2.1.1. Extração de RNA de <i>S. cerevisiae</i> para validação e otimização dos <i>primers</i>	32
3.2.1.2. Tratamento com DNase I.....	33
3.2.1.3. Transcrição Reversa	33
3.2.1.4. Desenho, otimização e validação dos <i>primers</i> para qPCR	33
3.2.1.5. Avaliação da eficiência das reações de qPCR	35
3.2.1.6. Análises de qPCR	35
3.2.2. Detecção do <i>splicing</i> de <i>HAC1</i> por RT-PCR	36
3.2.3. Cruzamento, esporulação e seleção de haploides de interesse para o teste de sensibilidade a drogas indutoras de estresse de RE	37
3.2.4. Teste de sensibilidade a drogas indutoras de estresse de RE após diluição seriada.....	38
3.2.5. Transformação de leveduras	38
3.2.6. Determinação do perfil proteômico celular utilizando a coleção ORFs-GFP e <i>Synthetic Genetic Array</i> (SGA)	39
3.2.6.1. <i>Synthetic Genetic Array</i> (SGA)	40
3.2.6.2. Medida da fluorescência e aquisição de imagens das placas.....	43
3.2.6.3. Extração de dados de tamanho de colônia pelo SGA Tools.....	44
3.2.6.4. Extração de dados de fluorescência através do GenePix.....	44
3.2.6.5. Análise dos dados de crescimento celular	45
3.2.6.6. Análise dos dados de fluorescência	46
3.2.6.7. Análise de Ontologia Genética	51
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1. Análise da influência de eIF5A no <i>splicing</i> de <i>HAC1</i>	52

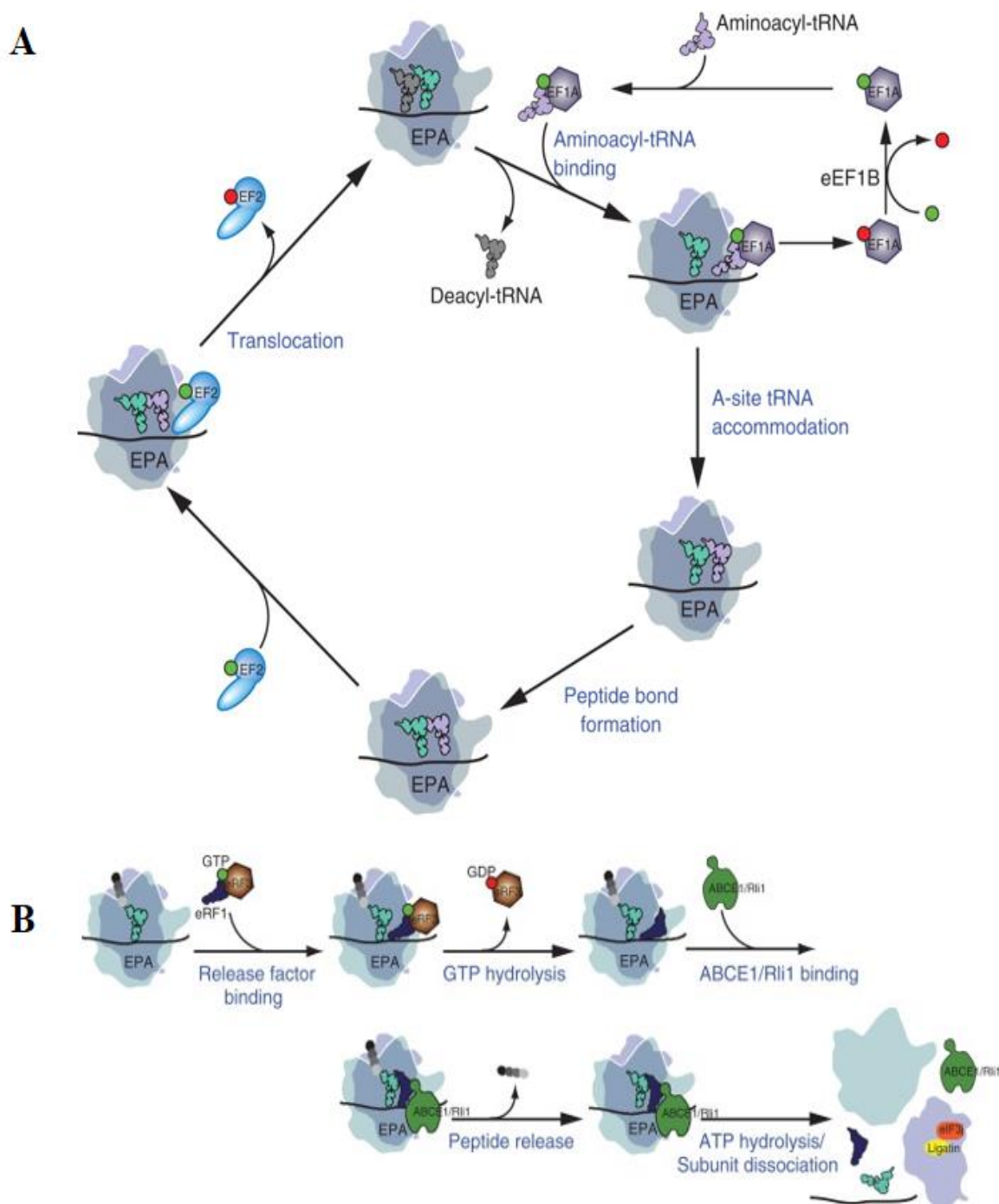
4.1.1. Análise dos níveis de mRNA de Hac1 em um mutante de eIF5A por PCR quantitativa em tempo real (qPCR)	52
4.1.1.1. Obtenção do cDNA para validação e otimização dos <i>primers</i>	52
4.1.1.2. Desenho, otimização e validação dos <i>primers</i> para qPCR	55
4.1.1.3. Análise de qPCR.....	56
4.1.2. Detecção do <i>splicing</i> de <i>HAC1</i> por RT-PCR	58
4.2. Teste de sensibilidade a drogas indutoras de estresse de RE	60
4.3. Análise do perfil proteômico do mutante <i>hyp2-3</i> em resposta ao DTT e a tunicamicina.....	68
4.3.1. Rastreamento com a coleção de ORFs-GFP de <i>S. cerevisiae</i>	68
4.3.2. Análise do efeito do tratamento com DTT e tunicamicina no selvagem.....	73
4.3.3. Análise geral dos hits gerados pelo rastreamento com drogas indutoras de estresse de RE	76
4.3.4. Avaliação da ocorrência de pré-ativação de UPR em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	82
5. CONCLUSÕES	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
ANEXO1	94
ANEXO 2	97
ANEXO 3	107
ANEXO 4	109

1. INTRODUÇÃO

Tradicionalmente, a síntese proteica em eucariotos é dividida em três etapas: início, alongação e término. Resumidamente, na etapa de início, o ribossomo é posicionado no códon de início com o Met-tRNA^{Met} iniciador posicionado no sítio P através da ação de uma série de proteínas denominadas fatores de iniciação de tradução eucarióticos (eIFs). Durante a fase de alongação (Figura 1), fatores de alongação eucarióticos (eEFs) facilitam a entrega de aminoacil-tRNAs ao ribossomo, bem como a translocação deste ao longo do mRNA. Quando o ribossomo alcança um códon de parada, os fatores de liberação eucarióticos (eRFs) liberam a cadeia polipeptídica juntamente com as subunidades 40S e 60S (MATEYAK; KINZY, 2017).

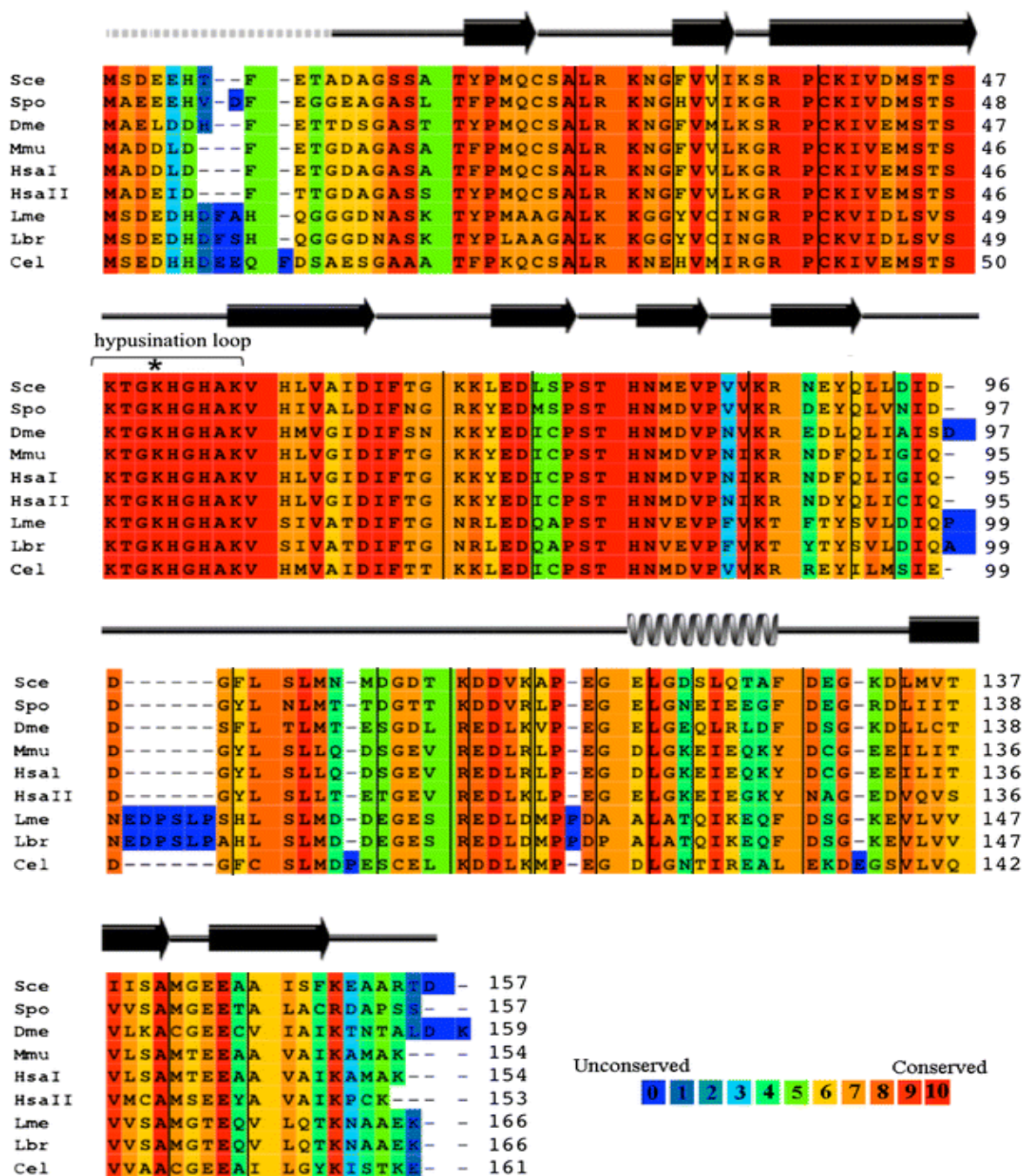
O processo de tradução, assim como outros processos básicos da expressão gênica, apresenta componentes conservados ao longo da evolução (OUZOUNIS; KYRPIDES, 1996; OLSEN; WOESE, 1997). O fator de tradução de eucariotos 5A (eIF5A – *eukaryotic translation initiation factor 5A*) corresponde a um exemplo desses fatores conservados evolutivamente (BENNE; HERSHEY, 1978) (Figura 2), estando este presente tanto em eucariotos quanto em arqueas, mas não em eubactérias (KLIER *et al.*, 1993; PARK *et al.*, 1993; PARK *et al.*, 1997), cujo homólogo estrutural e funcional é o fator de alongação P (EF-P) (BLAHA *et al.*, 2009; ROSSI; KUROSHU, *et al.*, 2014). Um exemplo dessa conservação evolutiva entre eucariotos é que a proteína eIF5A de *Saccharomyces cerevisiae* e as duas isoformas de humano compartilham mais de 60% de identidade (SCHNIER *et al.*, 1991; CHEN; LIU, 1997). Além disso, ambas isoformas de humanos são capazes de substituir a proteína de levedura, o que atesta que estas não são apenas conservadas em sua sequência, mas também funcionalmente (SCHWELBERGER *et al.*, 1993).

Figura 1 - Esquema dos mecanismos de elongação e terminação da tradução.



(A) A elongação da tradução ocorre por intermédio do fator de elongação eEF1A, que carrega os tRNAs aminoacilados para o ribossomo, e do fator eEF2, que promove a translocação do ribossomo ao longo do mRNA. (B) Quando o códon de terminação é atingido, o fator de liberação eRF1 se liga no sítio A do ribossomo, o fator eRF3 estimula a hidrólise de GTP e a liberação da cadeia polipeptídica, juntamente com as subunidades 40S e 60S. **Fonte:** DEVER; GREEN, 2012.

Figura 2 - Alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos de eIF5A de diferentes organismos.

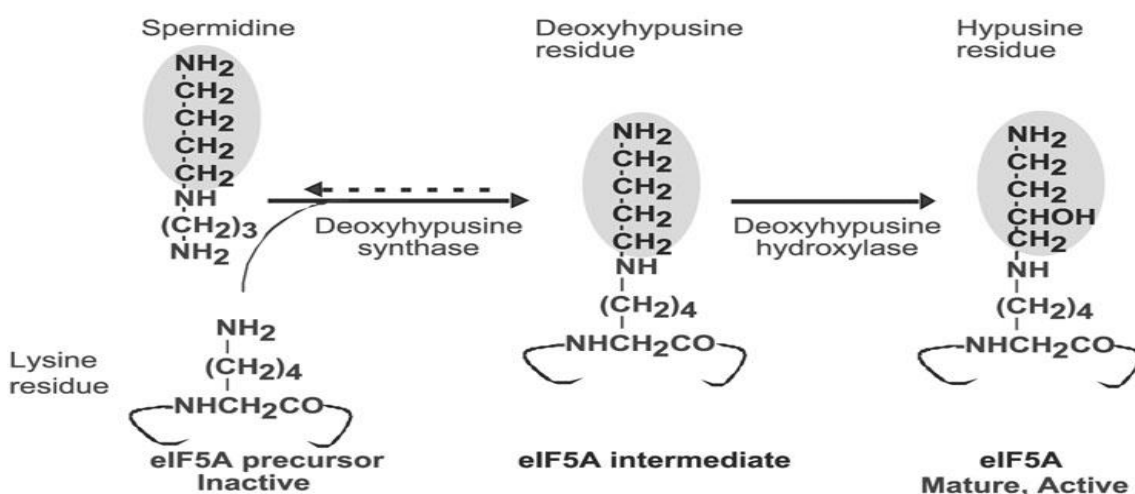


Sequências de aminoácidos da proteína eIF5A dos eucariotos *Saccharomyces cerevisiae* (Sce), *Schizosaccharomyces pombe* (Spo), *Drosophila melanogaster* (Dme), *Mus musculus* (Mmu), *Homo sapiens* (Hsa—isoformas I e II), *Leishmania mexicana* (Lme), *Leishmania braziliensis* (Lbr) e *Caenorhabditis elegans* (Cel), respectivamente. O grau de conservação entre os resíduos é representado por cores diferentes, conforme indicado pelo número (escala arbitrária) dentro das caixas coloridas. **Fonte:** BARBOSA *et al.*, 2016.

Em *Saccharomyces cerevisiae*, a proteína eIF5A possui 17 kDa e é codificada por dois genes homólogos *TIF51A* (*HYP2*) e *TIF51B* (*ANB1*), expressos em condições aeróbias e anaeróbias, respectivamente. Estas proteínas apresentam 90% de identidade e são intercambiáveis funcionalmente (SCHWELBERGER *et al.*, 1993). Sabe-se ainda que a expressão de pelo menos uma delas é essencial para a viabilidade celular (SCHNIER *et al.*, 1991; WOHL *et al.*, 1993; VALENTINI *et al.*, 2002).

Outro fato curioso sobre eIF5A é que este fator sofre uma modificação pós-traducional específica chamada hipusinação (Figura 3) (CHEN; LIU, 1997; PARK *et al.*, 1997), que ocorre através da transferência de um grupo aminobutil da espermidina para o grupo amino livre de uma lisina específica (K51 em *S. cerevisiae*; K50 em humano), pela desoxi-hipusina sintase (Dys1 em *S. cerevisiae*; DHPS em humano). Em seguida, a hidroxilação deste grupo pela desoxi-hipusina hidroxilase (Lia1 em *S. cerevisiae*; DOHH em humano) termina a maturação de eIF5A (PARK *et al.*, 2010). O alto grau de conservação dos resíduos flanqueadores do sítio de hipusinação de eIF5A nas diferentes espécies confirma a grande importância deste aminoácido incomum (MAGDOLEN *et al.*, 1994; CHEN; LIU, 1997). Além disso, ambas enzimas modificadoras de eIF5A são também conservadas evolutiva e funcionalmente (CHEN; LIU, 1997).

Figura 3 - Via da biossíntese do resíduo de hipusina no precursor de eIF5A.

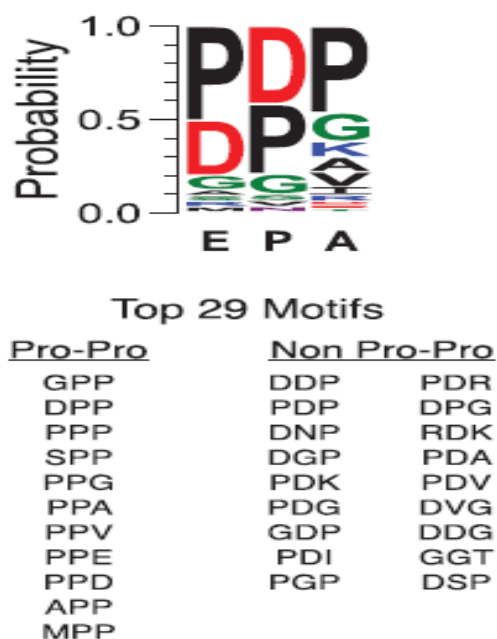


Esquema simplificado da modificação pós-traducional de eIF5A. A porção 4-aminobutil proveniente da poliamina espermidina (região sombreada) é transferida para o resíduo de lisina do precursor inativo de eIF5A, por meio da ação da enzima desoxi-hipusina sintase (Dys1 em *S. cerevisiae*). O intermediário resultante é posteriormente hidroxilado pela enzima desoxi-hipusina hidroxilase (Lia1 em *S. cerevisiae*). **Fonte:** PARK, 2006.

O homólogo estrutural de eIF5A em bactéria (EF-P) também possui efeito estimulatório na formação de ligações peptídicas (GLICK; GANOZA, 1975). Apesar de EF-P não ser totalmente essencial para a viabilidade celular (BULLWINKLE *et al.*, 2012), este também é capaz de estimular a síntese de metionil-puromicina *in vitro* e tem sua função alterada por inibidores da atividade peptidiltransferase do ribossomo (GANOZA *et al.*, 2002), assim como eIF5A (ZANELLI *et al.*, 2006; FRIGIERI *et al.*, 2008). Vale destacar ainda que foi sugerido que EF-P está envolvido no correto posicionamento do tRNA^{Met} iniciador, atuando na formação da primeira ligação peptídica (BLAHA *et al.*, 2009), e de outros tRNAs, como tRNA^{Pro} e tRNA^{Gly}, auxiliando assim na elongação de sequências específicas, ricas em prolina (PPP e PPG) (DOERFEL *et al.*, 2013; UDE *et al.*, 2013).

Resultados semelhantes foram observados para mutantes de eIF5A em *S. cerevisiae*, em que foi demonstrado que repórteres contendo PPP e proteínas com sequências extensas e/ou múltiplas de poliprolinas, como Bni1, Eap1, Ldb17 e Vrp1, têm sua tradução dependente de eIF5A e de hipusinação (GUTIERREZ *et al.*, 2013; MÉMIN *et al.*, 2014). Porém, um estudo mais recente mostrou que a depleção de eIF5A gera defeitos de elongação e de término da tradução global (PELECHANO; ALEPUZ, 2017; SCHULLER *et al.*, 2017), da seguinte forma: a) na elongação, esse fator alivia o *stalling* (atraso ou parada) dos ribossomos em vários *motifs* peptídicos além das poliprolinas (Figura 4), facilitando a formação de ligações peptídicas que seriam mais difíceis para serem formadas pelo centro peptidiltransferase do ribossomo; b) no término da tradução, eIF5A estimula a hidrólise da ligação peptidil-tRNA mediada por eRF1. Sendo assim, eIF5A foi inicialmente caracterizado como um fator de início de tradução, porém, após 40 anos de estudo sabe-se que ele se liga a ribossomos com o sítio E vazio (Figura 5), podendo assim participar do início, elongação e término da tradução. Esses papéis expandidos para eIF5A ajudariam a explicar sua natureza essencial e alta abundância em eucariotos (PELECHANO; ALEPUZ, 2017; SCHULLER *et al.*, 2017).

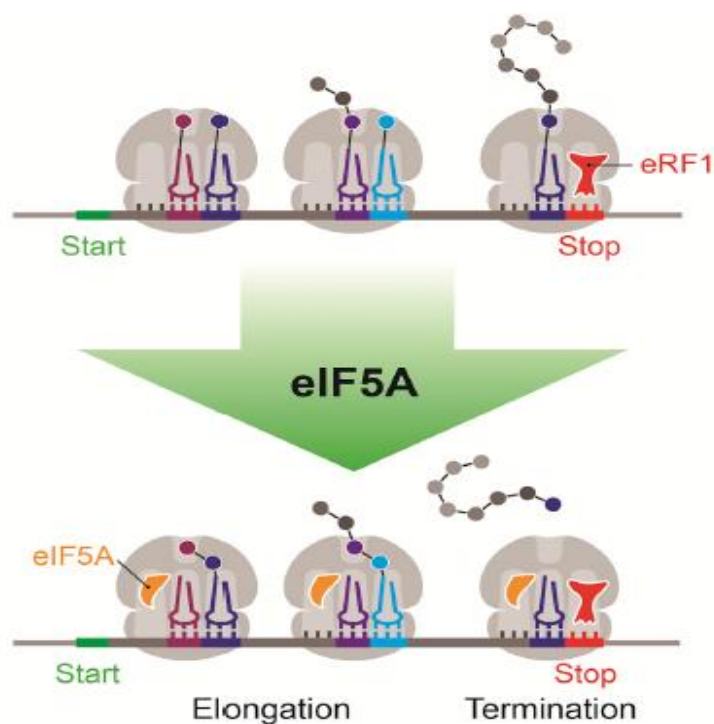
Figura 4 - eIF5A alivia o *stalling* dos ribossomos em vários *motifs* peptídicos além das poliprolinas.



29 principais *motifs* associados a pausa de ribossomos em células com depleção de eIF5A.

Fonte: SCHULLER *et al.*, 2017.

Figura 5 - Papel expandido para eIF5A na tradução.



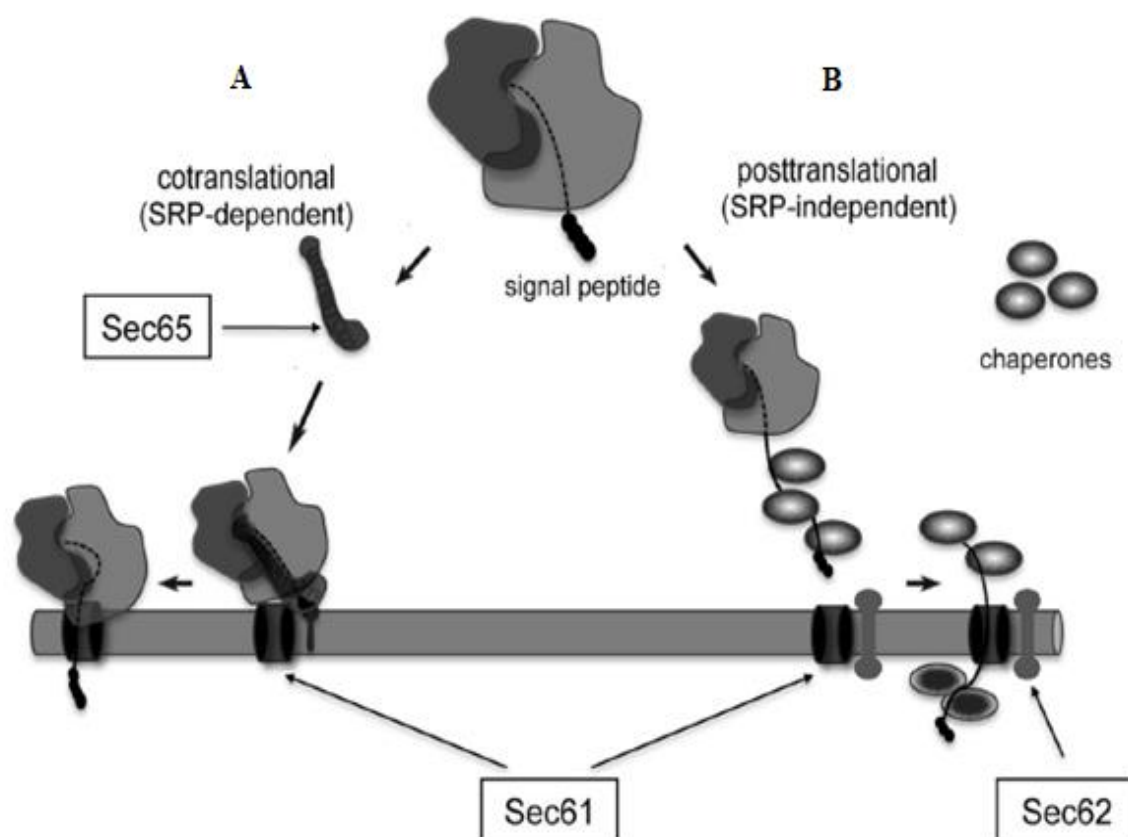
eIF5A se liga a ribossomos com o sítio E vazio, podendo assim participar do início, elongação e término da tradução. **Fonte:** SCHULLER *et al.*, 2017.

O interesse em pesquisas sobre eIF5A vem crescendo devido ao fato de que essa proteína é altamente expressa em diferentes tipos de câncer (MATHEWS; HERSHEY, 2015; NAKANISHI; CLEVELAND, 2016) e a evidências de um papel importante para eIF5A na modulação da replicação de vírus, principalmente do HIV-1 (OLSEN; CONNOR, 2017). Além disso, a depleção de eIF5A resulta em fenótipos pleiotrópicos, relacionados a múltiplos processos celulares, como, por exemplo, progressão do ciclo celular, apoptose, migração celular e metástase, translocação de proteínas pela via co-traducional e ativação da UPR (*Unfolded Protein Response*) (ZANELLI; VALENTINI, 2005; MARRA *et al.*, 2007; PARK *et al.*, 2010; ROSSI; GALVAO, *et al.*, 2014; FUJIMURA *et al.*, 2015; MATHEWS; HERSHEY, 2015; MANDAL *et al.*, 2016; NAKANISHI; CLEVELAND, 2016; STRNADEL *et al.*, 2017). No entanto, ainda não está claro se eIF5A atua de forma direta ou indireta, através da tradução, para afetar os processos citados.

Vale ressaltar ainda que já foram identificadas diversas interações genéticas com eIF5A utilizando-se *S. cerevisiae* como organismo modelo (VALENTINI *et al.*, 2002; ZANELLI; VALENTINI, 2005; FRIGIERI *et al.*, 2007; FRIGIERI *et al.*, 2008; DIAS *et al.*, 2012). Neste contexto, uma interação genética interessante, que correlacionou eIF5A com a via secretória, é a letalidade sintética causada pela mutação de ambos eIF5A e Ypt1 (FRIGIERI *et al.*, 2008), proteína esta essencial para a fusão de vesículas do retículo endoplasmático (RE) ao Golgi (SEGEV, 2001). Embora tenha sido demonstrado que eIF5A não atue diretamente no tráfego de vesículas, esse fator foi encontrado associado a ribossomos ligados a membranas, implicando assim em uma função para o mesmo na tradução no RE (FRIGIERI *et al.*, 2008). Além disso, considerando-se os dados manualmente curados e de larga escala sobre as interações genéticas de mutantes eIF5A, foram identificados vários genes envolvidos com a via secretória e membrana plasmática (<http://www.yeastgenome.org/locus/S000000760/interaction>).

Posteriormente, outro estudo do nosso grupo revelou que eIF5A afeta a translocação de proteínas para o RE apenas pela via co-traducional (Figura 6) (ROSSI; GALVÃO, *et al.*, 2014). Essas observações reforçam a hipótese de que eIF5A atue como um fator de tradução seletivo para um subgrupo específico de mRNAs (KANG; HERSHEY, 1994; PARK *et al.*, 1997), neste caso, os envolvidos com o processo de secreção e/ou estresse de RE.

Figura 6 - Representação esquemática da translocação de proteínas para o retículo endoplasmático.

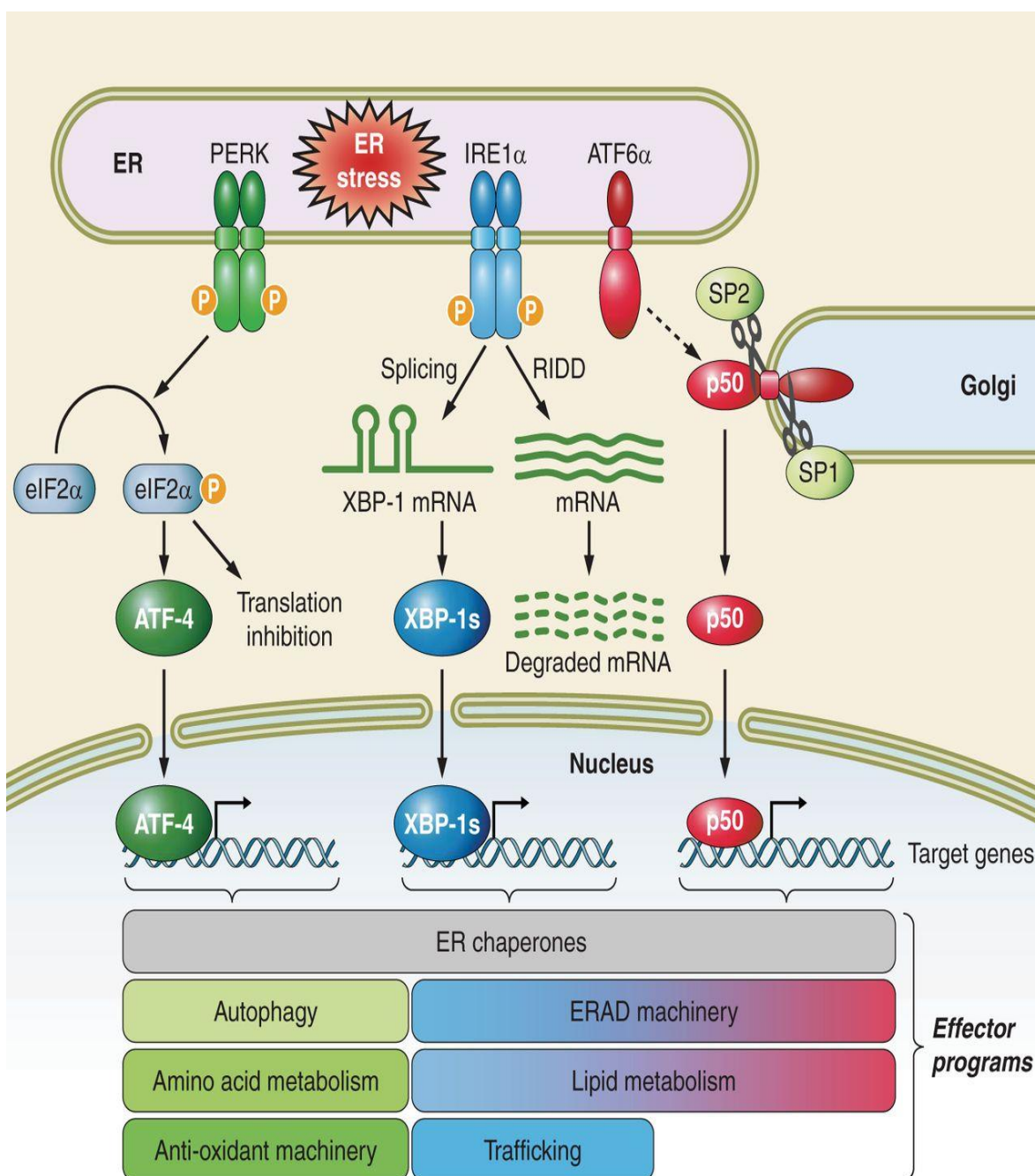


(A) Via co-traducional. A sequência sinal sintetizada sinaliza para ligação com o complexo SRP (*signal recognition particle*), que executa uma parada temporária na elongação da tradução. Em seguida, SRP interage com seu receptor na membrana do RE e promove a interação ribossomo-translocon. Uma vez ligado ao translocon, o ribossomo re-inicia a elongação da tradução e a proteína recém-sintetizada é direcionada ao lúmen do RE, onde assume sua conformação tridimensional adequada. **(B)** Via pós-traducional. Chaperonas ligam-se à cadeia polipeptídica enquanto a mesma está sendo sintetizada. Após o término da tradução, o polipeptídeo é direcionado para o RE e, através do translocon, a proteína passa para o lúmen do RE onde é corretamente enovelada. **Fonte:** ROSSI; GALVAO, *et al.*, 2014.

De forma semelhante aos trabalhos anteriores do nosso laboratório (FRIGIERI *et al.*, 2008; ROSSI; GALVAO, *et al.*, 2014), um estudo recente realizado em células de mamíferos HeLa correlacionou eIF5A com a via secretória, sugerindo uma ativação da via de resposta ao mal enovelamento de proteínas dentro do RE (*Unfolded Protein Response* – UPR) e aumento na expressão de chaperonas mediante a depleção de eIF5A (MANDAL *et al.*,

2016). Cabe aqui destacar que, em eucariotos superiores, o acúmulo de proteínas sem o correto dobramento dentro do RE promove a ativação de três vias paralelas que empregam mecanismos únicos de transdução de sinal e compreendem coletivamente a UPR (Figura 7), cujo intuito é reestabelecer a homeostase do RE (WALTER; RON, 2011). Os sensores transmembrana residentes no RE que atuam como transdutores de UPR em eucariotos superiores incluem IRE1 (*inositol-requiring transmembrane kinase and endonuclease*), PERK (*protein kinase RNA-like ER kinase*) e o fator de transcrição com zíper de leucina ATF6 (*activating transcription factor 6*). IRE1 corresponde a um monômero inativo em condições celulares normais, mas forma aglomerados ativos na membrana do RE em resposta ao estresse de RE (KIMATA *et al.*, 2007; KORENNYKH *et al.*, 2009). Os oligômeros de IRE1 se autofosforilam para ativar seu domínio RNase. Este, por sua vez, cliva o pré-mRNA de XBP1 e uma RNA ligase liga os dois éxons, resultando assim no *splicing* citoplasmático de XBP1. Após esse processo, XBP1 é traduzida e translocada para o núcleo para ativar a transcrição de genes responsivos a UPR (YOSHIDA; MATSUI, *et al.*, 2001; CALFON *et al.*, 2002). PERK possui uma estrutura semelhante à de IRE1, porém, seu domínio citosólico contém apenas a função quinase. Em condições de estresse, PERK se oligomeriza e fosforila o fator de iniciação eIF2 α , resultando na sua inativação e consequente atenuação da tradução, o que evita o acúmulo adicional de proteínas mal enoveladas no RE. Já ATF6 é constitutivamente sintetizado como uma proteína transmembrana no RE. Após a indução do estresse, esta se realoca no Golgi, onde sofre clivagem. O fragmento citoplasmático resultante, ATF6-p50, é direcionado para o núcleo para ativar a transcrição de seus genes alvo (YOSHIDA *et al.*, 2000; YOSHIDA; OKADA, *et al.*, 2001).

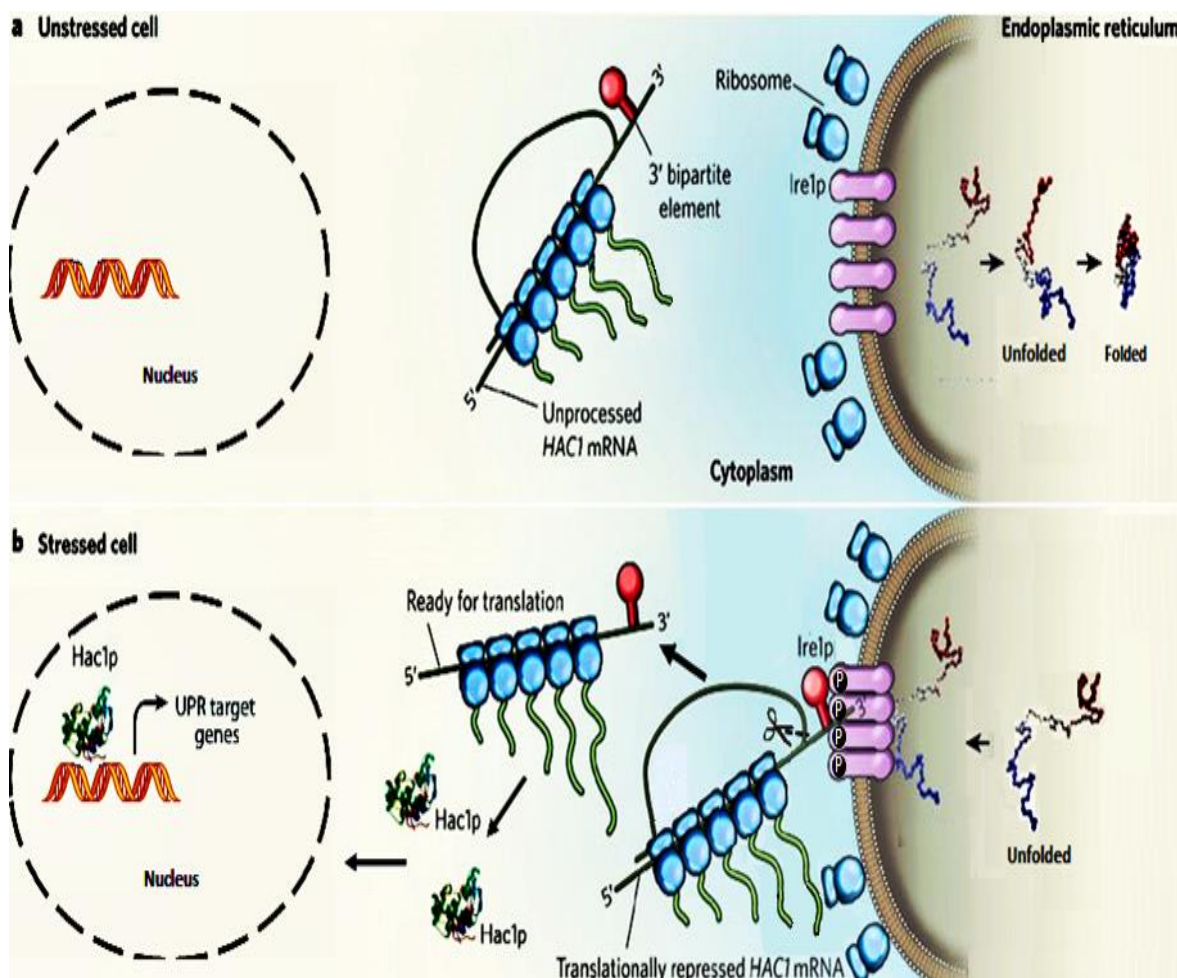
Figura 7 - Mecanismo de ação dos três principais braços da via UPR em eucariotos superiores.



O acúmulo de proteínas mal enoveladas dentro do lúmen do RE desencadeia a UPR. Existem três principais sensores de estresse na membrana do RE: IRE1, PERK e ATF6. Esses sensores geram respostas específicas, coordenadas através da regulação de vários fatores de transcrição, como ATF4, XBP1s (*spliced* XBP1) e ATF6-p50. ERAD: *Endoplasmic Reticulum associated degradation*; RIDD: *regulated Ire1-dependent decay*. **Fonte:** PLUQUET *et al.*, 2015.

Dentre esses transdutores de sinal citados anteriormente, apenas IRE1 é conservado em *Saccharomyces cerevisiae*, sendo este o único responsável pela ativação da UPR neste organismo (COX *et al.*, 1993; MORI *et al.*, 1993), em um mecanismo semelhante ao descrito anteriormente, sendo que ao invés de XBP1, Hac1 é o efetor desta resposta (Figura 8).

Figura 8 – Ativação da via UPR por Hac1 em *Saccharomyces cerevisiae*.



(A) Em condições normais, o dobramento de proteínas no RE ocorre eficientemente. Monômeros de Ire1, uma proteína transmembrana, apresentam-se inativos e o mRNA de *HAC1* não processado inibe sua própria tradução citoplasmática. (B) Em condições de estresse de RE, ocorre acúmulo de proteínas sem o correto dobramento no RE. Esse evento sinaliza para oligomerização e auto-fosforilação de Ire1. Uma vez ativa, Ire1 é capaz de clivar o íntron do mRNA de *HAC1*, e a proteína é sintetizada. No núcleo, Hac1 é capaz de ativar a transcrição de genes alvos da resposta ao estresse de RE. **Fonte:** NICCHITTA, 2009.

Neste contexto, considerando que: a) existem evidências do envolvimento de eIF5A na translocação de proteínas pela via co-traducional e que seus mutantes têm níveis aumentados de proteínas envolvidas no estresse de RE (ROSSI; GALVAO, *et al.*, 2014); b) um estudo recente realizado em mamíferos sugeriu uma ativação da UPR e aumento na expressão de chaperonas mediante a depleção de eIF5A (MANDAL *et al.*, 2016); e c) dados preliminares de nosso laboratório indicam uma redução no *splicing* de *HAC1* em mutantes condicionais de eIF5A; é interessante investigar se há uma correlação entre eIF5A e a via de resposta ao estresse de RE em *S. cerevisiae*, na tentativa de explicar não somente os efeitos biológicos observados para mutantes de eIF5A, como também seu papel na tradução de subgrupos de mRNAs ligados à via secretória e/ou estresse de RE.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Investigar a existência de uma correlação entre eIF5A e a via de resposta ao estresse de RE, usando como organismo modelo a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Os resultados obtidos neste trabalho poderão contribuir significativamente para o entendimento do papel biológico de eIF5A na tradução de possíveis subgrupos de mRNAs.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. *Análise dos níveis de mRNA de HAC1 em um mutante de eIF5A por PCR quantitativa em tempo real (qPCR)*

Como apresentado na Introdução, existem dados indicativos de que eIF5A possa participar de maneira direta e específica na regulação da tradução de fatores envolvidos no estresse de RE e secreção. Resultados preliminares obtidos no nosso laboratório indicaram um papel para eIF5A na maturação do mRNA de *HAC1* e, portanto, na ativação da via UPR. Através da análise do mRNA de *HAC1* por qPCR foi revelada uma redução no *splicing* desse mRNA em mutantes condicionais de eIF5A (*hyp2-3* e *hyp2-S149P*) (Danuza Rossi; dados não publicados). Sendo assim, foi proposta a quantificação do mRNA de *HAC1* (antes e após o *splicing*) nas linhagens selvagem e mutante de eIF5A (*hyp2-3*).

2.2.2. *Análise de interação genética de Hac1 e Ire1 com mutantes de eIF5A*

A análise de interações genéticas corresponde a uma importante estratégia para o estudo de correlações funcionais no modelo *S. cerevisiae* e já colaborou com a determinação da função de proteínas, bem como na correlação entre vias celulares (GUARENTE, 1993). A busca por interações genéticas entre mutantes de eIF5A e outros fatores celulares já contribuiu em nosso laboratório para um grande avanço no entendimento da função celular de eIF5A (VALENTINI *et al.*, 2002; ZANELLI; VALENTINI, 2005; FRIGIERI *et al.*, 2007; FRIGIERI *et al.*, 2008; GREGIO *et al.*, 2009; DIAS *et al.*, 2012; ROSSI; GALVÃO, *et al.*, 2014). Para entender melhor a correlação de eIF5A com via secretória e a resposta ao estresse celular, foi proposto verificar a existência de interações genéticas entre mutantes de eIF5A e genes que codificam as proteínas Hac1 e Ire1. Essas linhagens foram testadas em relação aos fenótipos de crescimento e sensibilidade a drogas que causam estresse de RE.

2.2.3. Perfil proteômico celular utilizando a coleção de ORFs-GFP de *S. cerevisiae* e Synthetic Genetic Array (SGA)

Esta análise utiliza a fluorescência *in vivo* de GFP (*Green Fluorescent protein*) para determinar os níveis de uma determinada proteína com uma fusão C-terminal de GFP (ORF-GFP), sob controle transcricional endógeno. Desta forma, as mudanças nos níveis totais de uma proteína em uma dada condição ou *background* genético podem ser determinados pela medida de fluorescência de GFP. Uma vez dispondo da coleção de genes de *S. cerevisiae* com fusão C-terminal de GFP (ORFs-GFP), esta estratégia pode ser utilizada para determinar o perfil proteômico celular *in vivo* (TKACH *et al.*, 2012; BREKER; SCHULDINER, 2014; SMITH; BURKE, 2014). Esta coleção contém 4.159 linhagens, gerando uma cobertura de 75% do proteoma desse organismo. Apesar da fusão C-terminal poder interferir com os níveis totais da proteína a qual está fundida, a grande maioria (80%, com base na análise de proteínas essenciais) permanece funcional. Além disso, mesmo quando a fusão com GFP influencia na abundância, as alterações relativas podem ser determinadas com precisão (NEWMAN *et al.*, 2006).

Para utilizar essa estratégia em um *background* com mutação em eIF5A, foi utilizada a metodologia de cruzamento em larga escala *Synthetic Genetic Array* (SGA) (TONG *et al.*, 2001) para a geração de linhagens haploides contendo ao mesmo tempo a fusão ORF-GFP e a mutação de eIF5A (*hyp2-3*). Após a geração das linhagens haploides de interesse, as medidas de fluorescência da coleção completa foram obtidas em meio de cultura sólido em escâner *Typhoon*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

As linhagens utilizadas nesse trabalho possuem *background* de linhagens BY, as quais possuem o gene *SSD1* funcional, o que gera um fenótipo de menor suscetibilidade para os mutantes de eIF5A em comparação com os mesmos mutantes no *background* de W303 (dados não publicados; ZANELLI; VALENTINI, 2005). O *background* BY foi escolhido pois as coleções utilizadas neste trabalho apresentam esse *background*. Ainda, foi utilizada como padrão a notação do gene de eIF5A como *HYP2*, por ser o nome oficial do gene e ser o nome que aparece nas análises de bioinformática envolvendo o *YeastMine* e *Yeasttract*. Desta forma, os mutantes também passaram-se a ser chamados pela mesma notação anteriormente utilizada, substituindo-se *tif51A* por *hyp2*. Todos os mutantes de eIF5A utilizados neste trabalho são condicionais, sensíveis a temperatura e induzem a diminuição da proteína eIF5A mutada na temperatura restritiva, como *hyp2-3* (VALENTINI *et al.*, 2002), ou possuem eIF5A mutada estável na temperatura restritiva, como *hyp2^{K56A}* e *hyp2^{Q22H/L93F}* (DIAS *et al.*, 2008).

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

Linhagem	Genótipo	Origem
VZL1256	<i>MATα can1::STE2pr-Sp_his5* lyp1 his3 leu2 ura3 met15 HYP2::natMX4</i>	Coleção do laboratório
VZL1258	<i>MATα can1::STE2pr-Sp_his5* lyp1 his3 leu2 ura3 met15 hyp2-3::natMX4</i>	Coleção do laboratório
VZL1259	<i>MATα can1::STE2pr-Sp_his5* lyp1 his3 leu2 ura3 met15 hyp2^{K56A}::natMX4</i>	Coleção do laboratório
VZL1260	<i>MATα can1::STE2pr-Sp_his5* lyp1 his3 leu2 ura3 met15 hyp2Q22H/L93F::natMX4</i>	Coleção do laboratório
VZL1363	<i>MATα can1pr::TDH3pr-E2Crimson::Hph::can1Δ::STE2pr-LEU2** lyp1 his3 leu2 ura3 met15 HYP2::natMX4</i>	Coleção do laboratório
VZL1364	<i>MATα can1pr::TDH3pr-E2Crimson::Hph::can1Δ::STE2pr-LEU2** lyp1 his3 leu2 ura3 met15 hyp2-3::natMX4</i>	Coleção do laboratório
VZL1365	<i>MATα ura3 his3 leu2 met15 hac1::kanMX4</i>	Coleção de nocautes
VZL1366	<i>MATα ura3 his3 leu2 met15 ire1::kanMX4</i>	Coleção de nocautes
<i>srp54-PH</i>	<i>srp54-PH::kanR his3 leu2 ura3 met15</i>	Coleção de mutantes TS
<i>srp101-47</i>	<i>srp101-47::kanR his3 leu2 ura3 met15</i>	Coleção de mutantes TS
<i>srp102-510</i>	<i>srp102-510::kanR his3 leu2 ura3 met15</i>	Coleção de mutantes TS
<i>Δrpl22a</i>	<i>MATα his3 leu2 ura3 met15 rpl22a::kanMX4</i>	Coleção de nocautes
<i>Δrpp2b</i>	<i>MATα his3 leu2 ura3 met15 rpp2b::kanMX4</i>	Coleção de nocautes
<i>Δrei1</i>	<i>MATα his3 leu2 ura3 met15 rei1::kanMX4</i>	Coleção de nocautes
Coleção GFP	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ10 met15Δ10 ura3Δ10 ORFs-GFP(S65T)::HIS3MX6</i>	(HUH <i>et al.</i> , 2003)

* *STE2pr-Sp_his5* corresponde ao gene selvagem *his5* de *Schizosaccharomyces pombe*, controlado pelo promotor do gene *STE2* de *S. cerevisiae* (ativo apenas em linhagens do tipo *MAT α*); *Sp_his5* complementa o nocaute de *HIS3* de *S. cerevisiae*.

** *STE2pr-LEU2* corresponde ao gene selvagem *LEU2* de *S. cerevisiae*, controlado pelo promotor do gene *STE2* de *S. cerevisiae* (ativo apenas em linhagens do tipo *MAT α*), que complementa o nocaute de *LEU2* de *S. cerevisiae*. **Fonte:** elaborada pela autora.

Tabela 2 - Plasmídeos utilizados neste trabalho.

Plasmídeo	Características	Origem
pSV64	2 μ , <i>LEU2</i>	Coleção do laboratório
pSV364	2 μ , <i>URA3</i>	Coleção do laboratório
pSV374	2 μ , <i>LEU2</i>	Coleção do laboratório
pSV1104	<i>eft2</i> ^{H699K} , 2 μ , <i>LEU2</i>	Coleção do laboratório
pVZ1359	<i>SEC65</i> , <i>SRP21</i> , <i>SRP72</i> , 2 μ , <i>URA3</i>	Colin J. Stirling
pVZ1360	<i>SCR1</i> , <i>SRP14</i> , <i>SRP54</i> , <i>SRP68</i> , 2 μ , <i>LEU2</i>	Colin J. Stirling

Fonte: elaborada pela autora.

3.2. Métodos

A manutenção e o cultivo das linhagens de *S. cerevisiae*, a composição e o preparo dos meios de cultura e soluções, assim como os protocolos das técnicas utilizados neste trabalho seguiram procedimentos padrão descritos em manuais de laboratório (GUTHRIE; FINK, 1991; AUSUBEL, 2004; AMBERG, 2005).

3.2.1. Análise dos níveis de mRNA de *Hac1* em um mutante de *eIF5A* por PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

3.2.1.1. Extração de RNA de *S. cerevisiae* para validação e otimização dos primers

As linhagens de interesse, VZL1256 (selvagem; *HYP2*) e VZL1258 (mutante; *hyp2-3*) foram cultivadas *overnight* em YPD a 25°C. Após esse período, a cultura saturada foi diluída para atingir a densidade óptica (D.O._{600nm}) de 0,1, sendo então cultivada até a fase logarítmica de crescimento (D.O._{600nm} de 0,4). Em seguida, 10 mL de cada cultura foram tratados por 1 h com ditioneitol (DTT) na concentração final de 32 mM para induzir o estresse de RE (OSLOWSKI; URANO 2011). Também foram separados 10 mL de cada cultura que receberam o veículo do DTT (acetato de sódio 0,01 M, pH 5,2), correspondendo esta à condição não tratada. Cabe aqui ressaltar que foram utilizadas três replicatas biológicas independentes por condição.

Após uma hora de incubação a 30°C, as células foram coletadas por centrifugação e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Posteriormente, o RNA total das amostras foi extraído utilizando-se a técnica de purificação por kit RNeasy Mini (QIAGEN). Após a extração, as amostras de RNA foram quantificadas por espectrofotometria a 260 nm em NanoDrop ND-2000 (Thermo Fisher Scientific) e, para a avaliação da qualidade de RNA, as mesmas foram submetidas a uma corrida eletroforética capilar utilizando o equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer, conforme as instruções do fabricante.

3.2.1.2. Tratamento com DNase I

A uma solução contendo 5 µg de RNA em 8 µL de água, foi adicionado 1 µL de *Reaction Buffer* 10x e 1 µL de DNase I, *Amplification Grade*, 1 unidade/µL (Sigma-Aldrich). Essa mistura foi homogeneizada gentilmente e incubada por 15 min à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 1 µL de *Stop Solution* em cada amostra. Por fim, essa mistura foi aquecida a 70°C por 10 min para desnaturação de ambos DNaseI e RNA, sendo esta mistura mantida em gelo até a realização da próxima etapa.

3.2.1.3. Transcrição Reversa

Após tratamento com DNase I, o volume das amostras foi ajustado para 35 µL e estas foram submetidas à reação de transcrição reversa, utilizando-se o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription*, Applied Biosystems, sendo que em cada amostra foram adicionados 5 µL de tampão 10x, 2 µL de dNTPs (concentração de estoque de 100 mM), 5 µL de *primers* (oligonucleotídeos iniciadores) hexâmeros randômicos 10x e 3 µL de transcriptase reversa (50 U/µL). As amostras foram incubadas em termociclador (Applied Biosystems™ GeneAmp PCR System 9700) da seguinte forma: 25°C por 10 min, 37°C por 120 min e 85°C por 5 min.

3.2.1.4. Desenho, otimização e validação dos *primers* para qPCR

Os *primers* para os mRNAs alvos deste estudo (*HAC1* maduro e imaturo) foram desenhados utilizando-se a sequência do gene de *HAC1* presente no banco de dados *Saccharomyces Genome Database* – SGD (<http://www.yeastgenome.org/>) e o software

online *Primer3* (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi), considerando-se os seguintes parâmetros:

- Tamanho do *amplicon*: entre 80 e 150 pares de bases;
- Tamanho dos *primers*: entre 19 e 21 nucleotídeos;
- Conteúdo de CG: entre 50% e 60%;
- Temperatura de hibridização: 60°C.

As sequências dos *primers* utilizados para as análises de qPCR estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Sequências dos *primers* utilizados para as análises de qPCR.

Gene	Oligonucleotídeo F (5' - 3')	Oligonucleotídeo R (5' - 3')
<i>HAC1</i> maduro	ATTTGTTTGATGCGGTGGCC	CAAACCTGACTGCGCTTCTG
<i>HAC1</i> imaturo	CAATTGGCGTAATCCAGCCG	CCCCATCAGAGAACCACGAC

Fonte: elaborada pela autora.

As reações de qPCR foram realizadas utilizando-se *SYBR Green* (*Power SYBR Green PCR Master Mix*, Applied Biosystems) em um equipamento Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System. Todas as reações foram montadas de acordo com as seguintes condições:

- 10 µL de *SYBR Green Master Mix*;
- 1 µL de cDNA;
- 9 µL de solução dos pares de oligonucleotídeos.

Condições de temperatura:

Ciclos	Tempo	Temperatura
1	2 min	50°C
1	10 min	95°C
40	15 s	95°C
	1 min	60°C*

* leitura da fluorescência

Foram realizados ensaios de otimização da concentração dos pares de *primers* e observação de amplificação específica. Nesta etapa do experimento, foi utilizada uma solução de cDNA de 10 ng/μL em 20 μL de reação final, contendo alíquotas de todas as situações amostrais (linhagens selvagem e mutante *hyp2-3* tratadas e não tratadas com DTT). Nesta etapa, além das condições de ciclagem de temperatura descritas acima, foi adicionada uma fase para determinação da curva de dissociação: 15 s a 95°C, 1 min a 60°C e 15 s a 95°C, com leitura de fluorescência durante toda a fase, para confirmação dos tamanhos dos *amplicons* obtidos.

Foram testadas as concentrações de 0,10 μM, 0,25 μM, 0,40 μM, 0,50 μM e 0,70 μM para todos os pares de *primers*. Neste teste, foram considerados os dados de amplificação dos fragmentos de interesse, bem como a curva de dissociação, escolhendo a concentração de pares de oligonucleotídeos que resultavam em uma curva de amplificação de menor *cycle threshold* (Ct) e com curva de dissociação única.

3.2.1.5. Avaliação da eficiência das reações de qPCR

Para a validação das reações de qPCR, foi feita uma diluição seriada, composta por cinco diferentes concentrações de cDNA, partindo-se da concentração inicial de 100 ng/μL de uma mistura de alíquotas de todas as situações amostrais. Nesta fase do experimento, a concentração dos pares de *primers* na reação foi constante.

Ao final da validação, esperou-se encontrar uma curva padrão (Ct x Quantidade de cDNA inicial), com *slope* entre -3,0 e -3,6, resultando em eficiências de reação entre 90% e 110% e R² (coeficiente de determinação) maior ou igual a 0,99 (recomendações do fabricante do equipamento).

3.2.1.6. Análises de qPCR

Foram utilizadas amostras de cDNA provenientes das linhagens selvagem e mutante *hyp2-3*, ambas sob a condição de tratamento com DTT ou com a ausência de tratamento. Os valores de Ct de cada amostra foram utilizados para cálculos dos níveis de *splicing* de *HAC1*, da seguinte forma: foi feita a razão entre o Ct de mRNA maduro e imaturo de *HAC1* para cada condição, sendo esse valor posteriormente corrigido pelo selvagem não tratado (ajustado para 100%) (ELIZALDE *et al.*, 2014; VAN ANKEN *et al.*, 2014).

3.2.2. Detecção do splicing de HAC1 por RT-PCR

Esse procedimento foi realizado baseando-se em trabalhos anteriores (BICKNELL *et al.*, 2007; BROWN *et al.*, 2013; LABUNSKYY *et al.*, 2014; CUI *et al.*, 2015): As linhagens de interesse, VZL1363 (selvagem; *HYP2*) e VZL1364 (mutante; *hyp2-3*) foram cultivadas *overnight* em meio SC a 25°C. Após esse período, a cultura saturada foi diluída para atingir a densidade óptica (D.O._{600nm}) de 0,1, sendo então cultivada até a fase logarítmica de crescimento (D.O._{600nm} de 0,4). Em seguida, 10 mL de cada cultura foram tratados com 4mM de DTT ou com 2µg/mL de tunicamicina para induzir o estresse de RE (OSLOWSKI; URANO 2011). Após uma hora de incubação a 30°C, as células foram coletadas por centrifugação e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Posteriormente, o RNA total das amostras foi extraído utilizando-se a técnica de purificação por kit RNeasy Mini (QIAGEN). Após esse processo as amostras foram submetidas ao tratamento com DNaseI e a transcrição reversa nas condições descritas anteriormente.

Em seguida, o cDNA produzido na etapa anterior foi amplificado por uma reação de PCR, sendo que esta foi montada da seguinte forma:

- 1x tampão
- 1 µL de uma mistura de desoxirribonucleotídeos (10 mM de cada)
- 1 mM de MgSO₄
- 1 µM de *primer Forward* (5'ACAGGGATTTCAGAGCACG3')
- 1 µM de *primer Reverse* (5'CGCGTCAGTCCAACTTAAG3')
- 5 µL de cDNA molde
- 1 U da enzima *Platinum Taq* DNA Polimerase
- H₂O Milli-Q q.s.p. 50 µL

Condições de temperatura:

Ciclos	Tempo	Temperatura
1	5 min	94°C
25	30 s	94°C
	30 s	55°C
	1 min	72°C
1	7 min	72°C

Então, os produtos desta reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,2% (m/V) em TAE (Tris 40 mM, ácido acético glacial 0,11% e EDTA 1 mM), contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio. A 20 µL do DNA, foi adicionado tampão de amostra (azul de bromofenol 0,125%, xileno cianol 0,125% e glicerol 50%) e essa 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).

3.2.3. Cruzamento, esporulação e seleção de haploides de interesse para o teste de sensibilidade a drogas indutoras de estresse de RE

As cepas haploides de *S. cerevisiae* de interesse foram cruzadas ($\Delta hac1$ ou $\Delta ire1$ versus *hyp2-3*, *hyp2*^{K56A} ou *hyp2*^{Q22H/L93F}) na superfície de ágar YPD e incubadas *overnight* a 25°C. A seleção dos diploides foi realizada pela transferência, com veludo estéril, do crescimento obtido na placa de YPD para a placa de meio seletivo duplo (SC + nourseotricina + G418). Posteriormente, as placas foram incubadas a 25°C e os diploides obtidos nessa etapa foram isolados no meio seletivo duplo citado anteriormente.

Os diploides foram então crescidos em meio S-SPO líquido (2,5 g de extrato de levedura; 15 g acetato de potássio; 40 mg de adenina, uracil e tirosina; 20 mg de histidina, leucina, lisina, triptofano, metionina e arginina; 100 mg de fenilalanina e 350 mg de treonina em 1 L de água destilada) a 25°C, sob agitação, até a formação de ascos.

Após 10 dias de incubação, foram centrifugados momentaneamente 200 µL da cultura submetida à esporulação. Após a remoção do sobrenadante, as células foram ressuspensas em 100 µL de sorbitol 20%. A quebra de parede do asco se deu pela adição de 5 µL de zimoliase (10 mg/mL) e incubação da reação a temperatura ambiente por 10 min. Então, foi adicionado 1 mL de sorbitol 20% para diluir e consequentemente interromper reação de digestão, sendo esta mistura submetida à agitação vigorosa por 1 min. Posteriormente, 200 µL foram plaqueados em um meio super-seletivo (SC - Arg -Lys - His + canavanina + tialisina + nourseotricina + G418) para haploides desse *background* em estudo, o qual foi incubado a 25°C até a obtenção de colônias. O genótipo das células haploides obtidas foi caracterizado utilizando diferentes meios de cultura seletivos de acordo com as marcas de seleção das linhagens em estudo. As células com os genótipos adequados seguiram para as análises de interesse.

3.2.4. Teste de sensibilidade a drogas indutoras de estresse de RE após diluição seriada

As linhagens de levedura de interesse foram crescidas em 5 mL de YPD a 25°C até atingirem aproximadamente $1-2 \times 10^7$ células/mL. As células foram coletadas por centrifugação a 3.000 $\times g$ por 10 min e ressuspensas para a concentração final de $2,5 \times 10^8$ células/mL. Após esse processo, 200 μ L da suspensão foram transferidos para um poço de microplaca e 5 diluições seriadas de 1:10 foram realizadas em meio líquido apropriado. Utilizando um pipetador multicanal, 4 μ L da suspensão original e das diluições foram aplicados nos meios de cultura de interesse. A seguir, as placas foram incubadas como descrito nas figuras.

3.2.5. Transformação de leveduras

A transformação de leveduras seguiu protocolos previamente estabelecidos no laboratório, onde, resumidamente, uma colônia da levedura de interesse foi inoculada em 5mL de meio YPD e incubada *overnight* a 30°C sob agitação. Então, as culturas foram diluídas para a concentração de $5,0 \times 10^6$ células/mL e incubadas novamente até a concentração de $2,0 \times 10^7$ células/mL. A seguir, as culturas foram centrifugadas a 3.000 $\times g$ por 5 min, lavadas com PBS estéril e suspensas em 1 mL de acetato de lítio a 100 mM. Após esse processo, as células foram incubadas a 30°C por 15 min, sendo posteriormente centrifugadas a 3.000 $\times g$ por 5 min. Após a remoção do sobrenadante, foram adicionados sobre as células 480 μ L de PEG 4000 50%, 72 μ L de acetato de lítio 1M, 50 μ L de DNA carregador (DNA de esperma de salmão a 2mg/mL), 1 μ g de cada plasmídeo e água Milli-Q estéril q.s.p 720 μ L. Então, o tubo foi agitado vigorosamente para homogeneização da suspensão, e as células foram incubadas a 30°C por 30 min sob agitação. A entrada passiva do plasmídeo na célula ocorreu pelo choque térmico a 42°C por 20 min, sendo os tubos agitados a cada 5 min. As células foram então centrifugadas como descrito acima e ressuspensas em 150 μ L de água Milli-Q estéril. Por fim, as células foram plaqueadas em meio seletivo e incubadas a 25°C até a obtenção de colônias.

Após esse processo, os transformantes foram submetidos ao teste de sensibilidade a drogas indutoras de estresse após diluição seriada, de acordo com o procedimento descrito anteriormente.

3.2.6. Determinação do perfil proteômico celular utilizando a coleção ORFs-GFP e Synthetic Genetic Array (SGA)

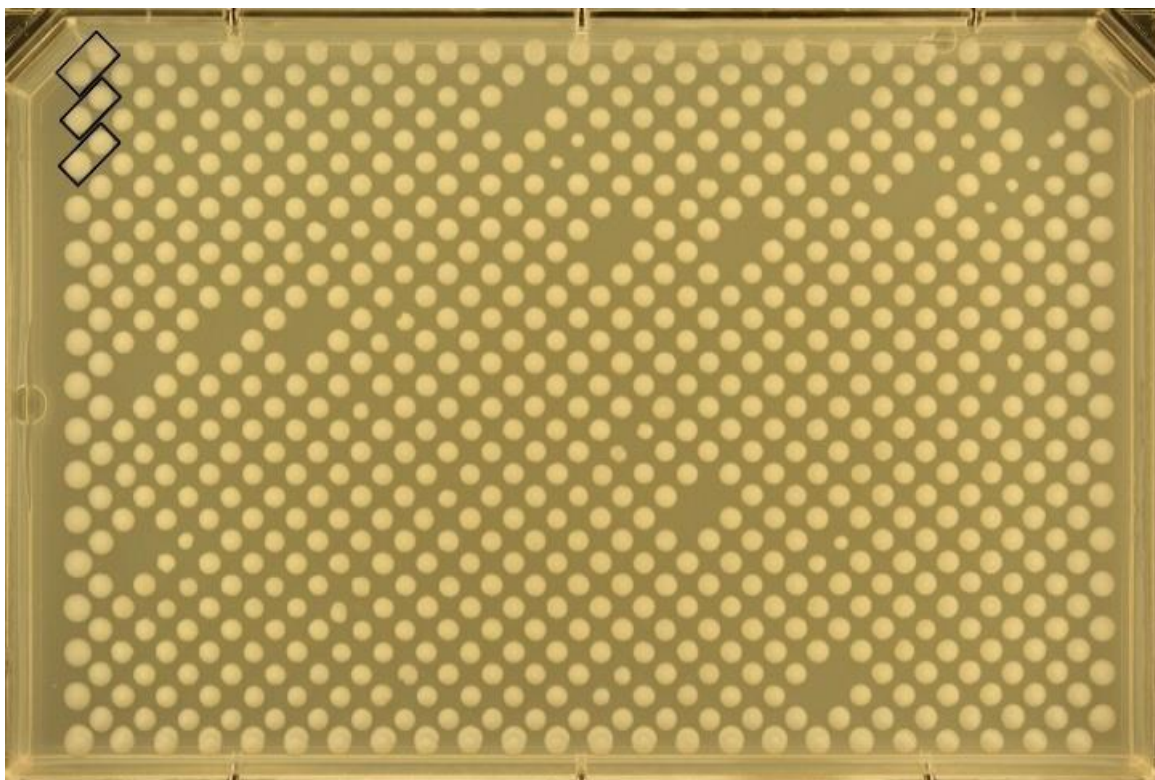
Essa parte do trabalho foi realizada no laboratório da Dra. Brenda J. Andrews (*University of Toronto*, Toronto - Canadá), com quem nosso laboratório possui uma colaboração estabelecida, durante o estágio de pesquisa no exterior concedido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo número: 2016/15621-9) no período de novembro de 2016 a abril de 2017.

Resumidamente, a técnica SGA envolve a utilização de uma linhagem com *background* específico para as análises. Esta deve conter o gene de interesse, conhecido como gene *query*, no caso, *HYP2* ou *hyp2-3*, os quais foram marcados (Fábio Carrilho Galvão; dados não publicados) com um cassete para resistência a nourseotricina (*natMX4*) (TONG *et al.*, 2001). Ainda, a linhagem deve apresentar os genes *CAN1* e *LYP1* nocauteados, os quais servirão como marcas recessivas para a seleção, após cruzamento e esporulação, de linhagens haploides. *CAN1* e *LYP1* codificam, respectivamente, arginina e lisina permeases de membrana plasmática e suas deleções conferem resistência à canavanina e tialisina, respectivamente. A linhagem *query* deve possuir também o repórter *STE2pr-LEU2*, o qual promoverá a expressão do gene *LEU2* apenas em linhagens haploides do *mating type a* em meio de cultura sintético sem leucina.

Além disso, a linhagem *query* possui a construção integrada no cromossomo *TDH3pr-E2Crimson::hphMX* (resistência a higromicina), o que garante a produção do normalizador interno de fluorescência. Como normalizador interno de fluorescência geralmente é empregada uma RFP (*Red Fluorescent Protein*), sendo que neste experimento foi utilizada a variante E2Crimson da RFP de *Discosoma striata* (STRACK *et al.*, 2009).

Cabe aqui ressaltar ainda que a outra linhagem de partida correspondia a cada uma das 4.159 linhagens da coleção ORFs-GFP (<http://yeastgfp.yeastgenome.org>). Neste trabalho, a mesma apresentava-se organizada conforme descrito anteriormente (KAINTH *et al.*, 2009): em 14 placas, com 384 linhagens agrupadas em duplicata em dois *grids* separados que possuíam 16 linhas x 24 colunas, produzindo assim um *array* com 768 colônias por placa (Figura 9). Cada placa foi delimitada por uma linhagem com a capacidade de crescer em meio sintético sem histidina para evitar o “efeito de borda” durante o rastreamento, pois as colônias da borda apresentam uma vantagem de crescimento em relação às outras colônias devido à maior disponibilidade de nutrientes nessa região (TONG; BOONE, 2007).

Figura 9 - Organização da placa 1 da coleção GFP.



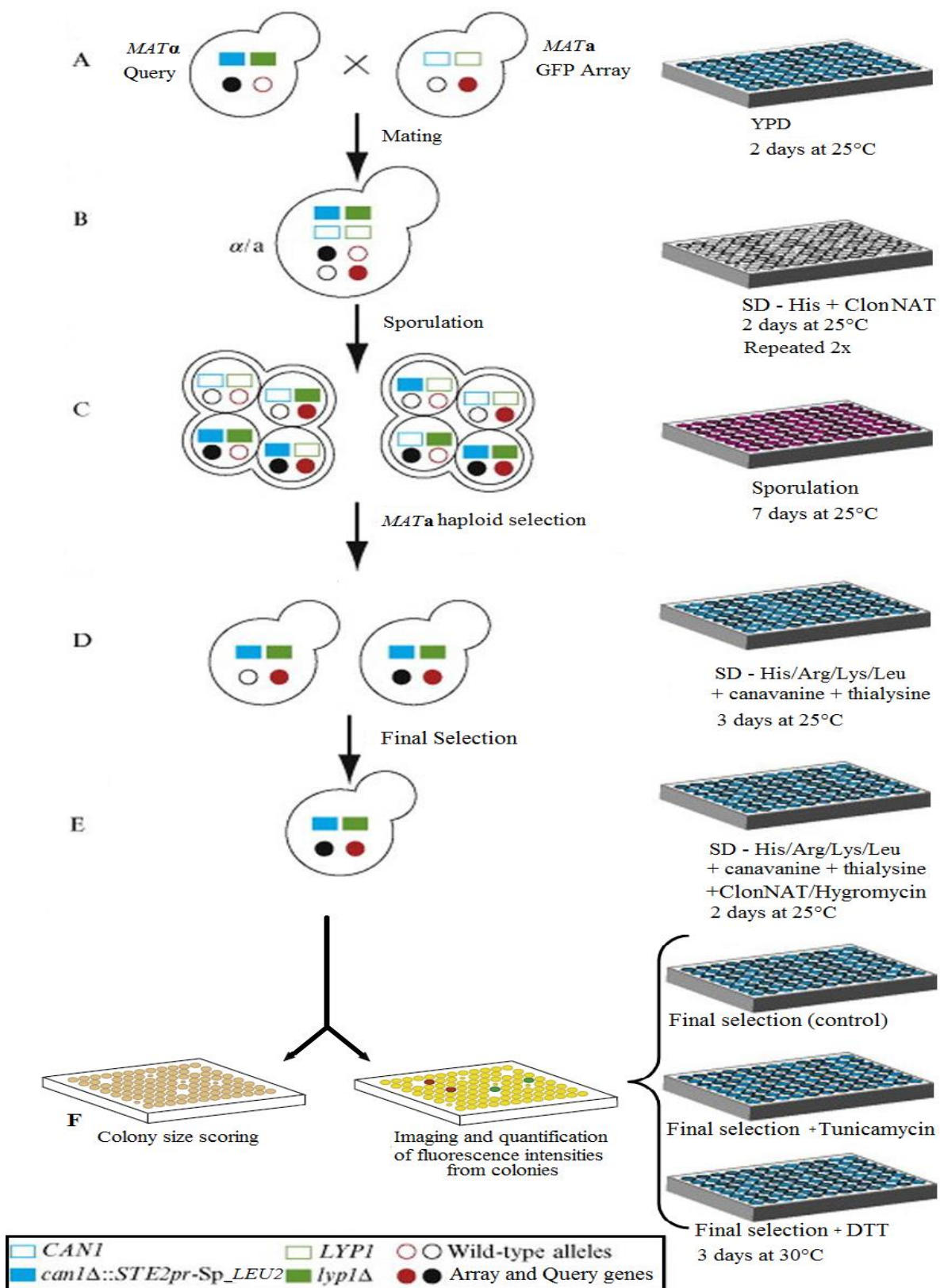
As linhagens foram agrupadas em duplicata (representadas pelos retângulos pretos), em dois *grids* que possuem 16 linhas x 24 colunas, produzindo assim um *array* com 768 colônias por placa. **Fonte:** elaborada pela autora.

3.2.6.1. Synthetic Genetic Array (SGA)

Os rastreamentos foram realizados conforme descrito anteriormente (BARYSHNIKOVA; COSTANZO; DIXON, *et al.*, 2010) (Figura 10): cada linhagem *query* (VZL1363 e VZL1364, selvagem e mutante *hyp2-3*, respectivamente) foi cruzada individualmente em meio YPD com as linhagens da coleção ORFs-GFP utilizando-se um robô específico para essa função (S&P Robotics BioMatrix BM5). Após esse processo, as placas foram incubadas a 25°C por dois dias. Os diploides foram então selecionados em meio contendo a droga nourseotricina (clonNAT) 100 µg/mL e sem histidina, sendo posteriormente incubados a 25°C por dois dias. Após a repetição da etapa de seleção de diploides, as células foram transferidas para um meio com baixa concentração de fontes de carbono e nitrogênio para induzir a formação dos esporos (meio de esporulação: 1% de acetato de potássio, 0,1% de extrato de levedura, 0,05% de glicose, suplementado com 0,014

g/L de uracila e histidina e 0,071 g/L de leucina e um quarto da concentração padrão de antibiótico, no caso, 25 µg/mL de clonNAT para retardar o crescimento de fungos filamentosos), sendo então incubadas por 7 dias a 25°C. Após essa etapa, os esporos foram transferidos para um meio sintético sem leucina, arginina e lisina e com canavanina 50 µg/mL e tialisina 50 µg/mL, permitindo, desta forma, a seleção dos haploides de *mating type a*, sendo posteriormente incubadas a 25°C por 3 dias. As células foram em seguida transferidas para o meio de seleção final que continha as drogas nourseotricina 100 µg/mL, canavanina 50 µg/mL, tialisina 50 µg/mL e higromicina 300 µg/mL e a ausência dos aminoácidos histidina, leucina, arginina, lisina, permitindo assim a seleção de haploides contendo os genes de interesse (*query* e *GFP array*) e o normalizador interno de fluorescência (E2Crimson).

Figura 10 - Esquema ilustrativo da metodologia *Synthetic Genetic Array* (SGA).



(A) A linhagem contendo o gene *query* (círculo preto cheio) fusionado à marca de resistência a nourseotricina, *natMX4*; os repórteres para o SGA $\Delta can1$, $\Delta lyp1$ e *STE2pr-LEU2*,

conferindo, respectivamente, resistência à canavanina, tialisina e permitindo o crescimento na ausência de leucina; e a construção *TDH3pr-E2Crimson::hphMX* (resistência a higromicina; não representado na figura, porém está no mesmo *locus* que *Acn1* - Tabela 1) para a produção do normalizador interno de fluorescência (E2Crimson) foi cruzada com a coleção ORFs-GFP (gene *array*). Na coleção ORFs-GFP, cada gene individualmente (círculo vermelho cheio) apresenta a marca que permite o crescimento na ausência de histidina (*HIS3MX6*). **(B)** A transferência das linhagens cruzadas para o meio contendo clonNAT e ausente em histidina proporciona a seleção de linhagens diploides. **(C)** Após a repetição da etapa anterior, o diploide heterozigoto resultante foi replicado para um meio com baixa concentração de fontes de carbono e nitrogênio para induzir a formação dos esporos. **(D)** Os esporos foram transferidos para um meio sintético sem leucina, com canavanina e tialisina, permitindo, desta forma, a seleção dos haploides de *mating type a*. **(E)** As células foram então transferidas para o meio de seleção final que contém a adição das drogas e omissão de aminoácidos que proporciona a seleção de haploides contendo os genes de interesse (*query* e GFP *array*) e o normalizador interno de fluorescência (E2Crimson). **(F)** Após a geração das linhagens haploides de interesse, as medidas de fluorescência da coleção completa foram obtidas em três condições: controle (ausência de droga indutora de estresse de RE), 1,75 µg/mL de tunicamicina e 2,5mM de DTT (indução estresse de RE). Também foram adquiridas imagens, no comprimento de onda visível, de todas as placas, processo esse necessário para a etapa de análise de dados. **Fonte:** KAINTH *et al.*, 2009; BARYSHNIKOVA; COSTANZO; KIM, *et al.*, 2010.

3.2.6.2. Medida da fluorescência e aquisição de imagens das placas

Após geração das linhagens haploides de interesse (um conjunto da coleção ORFs-GFP com *background* selvagem e outro mutante *hyp2-3* de eIF5A), as medidas de fluorescência das placas foram obtidas através do detector de fluorescência *Typhoon* FLA 9500 (GE Healthcare), após três dias de incubação na temperatura semipermissiva de 30°C em três condições: ausência de droga indutora de estresse de RE (controle), 1,75 µg/mL de tunicamicina e 2,5 mM de DTT (Figura 4). Cabe aqui ressaltar que essas concentrações correspondiam às maiores concentrações dessas drogas que permitiam o crescimento das células, condição essa necessária para o escaneamento, e que causavam a morte da linhagem

que contém o *knockout* de Hac1 (VZL1365), fato esse que indica a ativação da UPR (dados não mostrados).

A superfície do escâner permitia a detecção da fluorescência de 6 placas por escaneamento e, considerando que haviam 84 placas no total, foi necessária a realização de 14 escaneamentos. Para coletar os dados de fluorescência das colônias, as tampas das placas foram removidas e as mesmas foram invertidas de modo que as colônias estivessem voltadas para a superfície do escâner. As placas foram afixadas no escâner através de uma fita transparente para evitar movimentos durante a digitalização. Para estimular e medir as intensidades de fluorescência dos fluoróforos GFP e RFP (E2Crimson), foram empregadas as seguintes configurações: modo de aquisição: fluorescência; detecção de GFP: Laser Blue LD (473 nm) e filtro de emissão LPB (510LP); detecção de RFP: Laser Green SHG (532 nm) e filtro de emissão LPG (575LP); tamanho do pixel: 100 microns.

As voltagens do tubo fotomultiplicador (PMT) foram escolhidas empiricamente de modo que as intensidades de GFP e RFP estivessem abaixo da saturação, sendo que foram usados os PMTs de 300 e 400 para a detecção de GFP e de 350 para RFP. Cabe aqui ressaltar que essa variação no PMT para GFP foi feita para evitar que as intensidades de fluorescência detectadas a partir das colônias ficassem abaixo ou acima dos limites de detecção linear do *Typhoon*.

Também foram adquiridas imagens de todas as placas após o escaneamento, processo esse necessário para a etapa de análise de dados, da seguinte forma: As placas foram fotografadas individualmente utilizando o SPImager (S&P Robotics).

3.2.6.3. Extração de dados de tamanho de colônia pelo SGA Tools

Com as imagens .jpeg obtidas pela fotografia de cada uma das 84 placas (descrita no item 3.2.6.2), os diâmetros das colônias foram convertidos em número de *pixels* pelo *software* de análise de imagens SGA Tools (WAGIH *et al.*, 2013), gerando assim um valor de “*raw colony size*”.

3.2.6.4. Extração de dados de fluorescência através do GenePix

Essa etapa foi realizada como descrito anteriormente (KAINTH *et al.*, 2009): As imagens resultantes da fotodocumentação no *Typhoon* foram quantificadas utilizando-se o

software GenePix Pro versão 3.0. Para isso, os arquivos GFP.gel e RFP.gel foram abertos simultaneamente no *software*, sendo atribuídos para cada uma das imagens o comprimento de onda adequado, ou seja, 473 nm para as imagens GFP.gel e 532 nm para RFP.gel.

Após o desenho de um bloco contendo círculos que contornavam todas as colônias (Figura 11), a seleção da opção “Analyse” gerou uma planilha contendo a quantificação dos dados de fluorescência, sendo que a partir desta, foi utilizada a mediana da intensidade de fluorescência para o *foreground* e *background* local, tanto de GFP quanto de RFP, para cada uma das linhagens analisadas.

Figura 11 - Exemplo de bloco do *GenePix* para delimitar a obtenção de fluorescência de cada colônia.



Imagem de sobreposição de verde e vermelho gerada a partir das intensidades de fluorescência de GFP e de RFP da placa selvagem 1 da coleção na condição controle, ilustrando o gabarito desenhado para extração das respectivas fluorescências da imagem.

Fonte: elaborada pela autora.

3.2.6.5. Análise dos dados de crescimento celular

Cabe aqui destacar que colônias muito pequenas devem ser eliminadas das análises, considerando que essas geram resultados não confiáveis por se tratarem de colônias doentes, em que possivelmente a fusão de GFP àquela ORF resultou em alguma desestabilização da função da proteína ou interação genética com *hyp2-3* (KAINTH *et al.*, 2009).

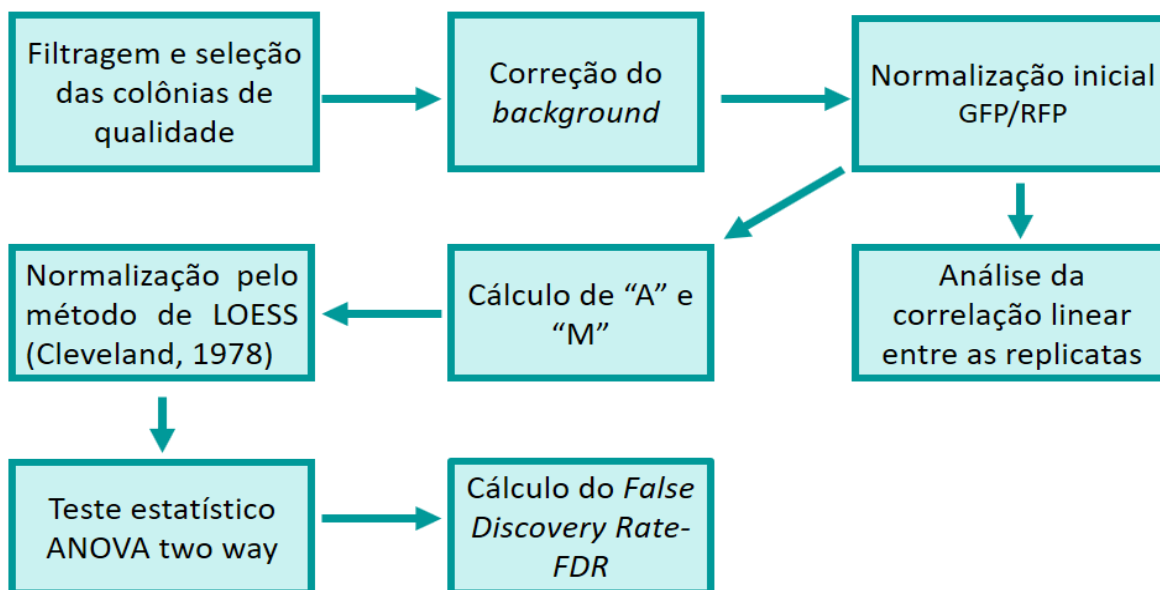
Sendo assim, foram calculados os “Z-valor” para cada tamanho de colônia, ou seja, o número de desvios padrão que o tamanho de determinada colônia se encontra acima ou abaixo da média. Assim, aquelas colônias com tamanho significativamente abaixo da média, considerando $p < 0.01$ para uma distribuição normal, foram removidos da análise (KAINTH, *et al.* 2009). Para isso, determinou-se o limite mínimo para o tamanho do diâmetro de colônia baseado na análise de distribuição normal padrão, ou distribuição Z, para os valores de “raw colony size” tanto para o *array* selvagem (1540 unidades de *pixels*) quanto para o mutante *hyp2-3* (847 unidades de *pixels*).

3.2.6.6. Análise dos dados de fluorescência

Essa etapa foi estruturada baseando-se em trabalhos anteriores (SMYTH; SPEED, 2003; KAINTH *et al.*, 2009), em que, resumidamente, para cada condição foi calculada a razão das medianas das intensidades de fluorescência entre GFP e RFP para cada colônia, e então normalizadas pela mediana dos valores obtidos em cada condição, sendo feita posteriormente uma conversão dos valores resultantes para o logaritmo na base dois ($\log_2$). A partir dos dados da razão em $\log_2$, foi aplicada a normalização pelo algoritmo de LOESS (CLEVELAND, 1979).

A normalização pelo algoritmo de LOESS elimina as possíveis variações dependentes da metodologia ao invés de variações biológicas das amostras. É importante destacar ainda que as relações $\log_2$ de GFP por RFP normalizadas por LOESS são reprodutíveis em *arrays* com repetição em placas diferentes e não são afetadas por artefatos espaciais e pequenas variações no tamanho da colônia, quando este se enquadra no limiar predeterminado descrito anteriormente (KAINTH *et al.*, 2009). As etapas necessárias para a análise dos dados de fluorescência estão resumidas na Figura 12 e descritas a seguir.

Figura 12 - Etapas utilizadas para a análise dos dados de fluorescência.



Fonte: elaborada pela autora.

- Filtragem e seleção das colônias de qualidade

Primeiramente foi feita uma triagem das proteínas analisadas, de forma a escolher somente aquelas que apresentaram medição do sinal de RFP positivo para todas as condições testadas, sendo que os demais, que indicavam colônias ausentes, foram descartados. Descartou-se também os valores obtidos para as colônias da borda e de qualquer proteína que apresentasse valores de intensidade maiores do que 65.535, que é o limite máximo de detecção do *GenePix*. Também foram retiradas das análises as colônias consideradas pequenas demais, ou doentes (como descrito anteriormente).

Assim, após esse passo, 3.973 proteínas foram mantidas para as próximas etapas.

- Correção do background

A correção do *background* é feita primeiramente subtraindo as intensidades do *background* local das intensidades do *foreground* para as medidas de GFP e RFP para cada colônia (KAINTH *et al.*, 2009). Este cálculo pode gerar valores negativos ou nulos para GFP quando a expressão da proteína fusionada a GFP possuir baixos níveis celulares. A ocorrência destes valores prejudica análises posteriores, pois é um falso indicativo de fluorescência negativa, o que não ocorre. Para corrigir tais valores, é inferido um número

inteiro positivo arbitrário (F) tal que seu produto com o valor de E2Crimson somado ao valor de GFP, torne todos os valores negativos ou nulos positivos, não afetando assim, os valores finais da razão $GFP_{\text{corrigido}}/E2Crimson$.

$$GFP_{\text{corrigido}} = GFP + (E2Crimson \times F)$$

Esta transformação matemática é feita para todos os genes avaliados, mesmo aqueles com valores positivos de GFP após a subtração do background, para, assim, não afetar a análise estatística final, pois todos os valores passam pela mesma modificação (SMYTH; SPEED, 2003).

- Normalização inicial

A partir dos dados de fluorescência corrigidos, calculou-se a razão das intensidades de $GFP_{\text{corrigido}}$ por E2Crimson e, em seguida, foi feita uma normalização desta razão pela centralização com a mediana. Esta normalização consiste no cálculo da mediana de cada uma das condições de estudo, sendo que, posteriormente, cada valor de razão é dividido pela mediana de sua respectiva condição e transformados em logaritmo na base dois.

- Análise da correlação linear entre as replicatas

Com os valores normalizados obtidos anteriormente foi possível construir gráficos de dispersão, comparando as duplicatas. Após a construção dos gráficos de dispersão, foi escolhida a condição de referência para os próximos passos, no caso, selvagem controle.

- Cálculo de “A” e “M”

“A” (*add*) representa o logaritmo na base dois da raiz quadrada da multiplicação da condição de referência pela condição a ser comparada para cada proteína; e “M” (*minus*) representa o logaritmo na base dois da divisão da condição referência pela condição comparada para cada proteína. Esses cálculos permitem a centralização do gráfico de dispersão dos dados na abscissa. É uma forma de evitar os problemas advindos de métodos globais de normalização, sendo um passo necessário para normalização pelo método de LOESS.

Como os valores de $GFP_{\text{corrigido}}/E2\text{Crimson}$ foram anteriormente convertidos para a escala $\log_2$, para obter “A” foi necessário apenas calcular a média entre os valores de referência e os valores das demais condições para cada proteína. E para “M”, subtraiu-se o valor de referência dos demais valores.

- *Normalização pelo método de LOESS*

Para a realização deste passo, primeiramente foi calculada a média móvel para cada proteína. Ela corresponde à média entre o valor “M” da proteína correspondente e os valores “M” das quarenta proteínas consecutivas, organizados em ordem crescente pelo valor de “A”. Obtida a média móvel, foi calculado o valor M’, pela subtração da média móvel do valor “M” de cada proteína.

- *Teste estatístico*

Após o processo acima, foi realizado um teste de análise de variância com dois fatores - *two-way ANOVA* utilizando os valores de M’ de cada proteína. No caso, foram consideradas como variáveis dependentes a condição de selvagem e mutante e a condição de tratamento com droga indutora de RE (Tunicamicina ou DTT) e ausência de tratamento com droga (controle). Os valores p obtidos foram então organizados em ordem crescente. Posteriormente foi criado um índice “i” de números naturais (de um a 3.973) para os valores organizados. O índice “i” foi dividido pelo tamanho amostral ($i/3973$).

- *Diferença nos níveis proteicos*

Finalmente foi calculado o FDR (*False Discovery Rate*) para um valor α de 0,35, através da multiplicação de α por $i/\text{tamanho amostral}$. A importância do cálculo de FDR deve-se ao fato de mesmo excluir falsos positivos na obtenção das proteínas com níveis alterados. Cabe aqui destacar que as proteínas foram consideradas com níveis diferenciados (ou *hits - up* ou *down* no mutante *hyp2-3* em relação ao selvagem) quando o valor de p era menor ou igual ao valor do FDR calculado.

- Análises complementares

Foi feita a comparação entre os níveis proteicos da condição selvagem controle e os selvagens tratados com DTT ou tunicamicina (indutores de estresse de RE) para avaliar se a estratégia de determinação de perfil proteômico utilizada aqui foi capaz de detectar o aumento nos níveis de proteínas induzidas pela UPR. A diferença nos níveis proteicos entre as duas condições (selvagem controle e selvagem tratado) foi testada por um teste t de *Student* bicaudal para cada proteína utilizando os valores de M' . Em seguida, foi feita uma comparação da lista de proteínas cujo nível aumentou mediante o tratamento com DTT ou tunicamicina com uma lista de genes cuja expressão é ativada por UPR (TRAVERS *et al.*, 2000; KIMATA *et al.*, 2006). Após a comparação desses dados, foi realizado um teste de Qui Quadrado ($p < 0,05$) com o intuito de identificar enriquecimento na condição de tratamento para proteínas cujos níveis aumentam após a indução de UPR. Adicionalmente, foi realizada uma análise de GO através do *software web Saccharomyces Genome Database YeastMine* (<https://yeastmine.yeastgenome.org/yeastmine/begin.do>) com o intuito de comparar as categorias de GO da lista de alvos de UPR com as listas de proteínas com níveis aumentados no selvagem tratado em relação ao selvagem não tratado para cada indutor de estresse de RE.

Também foi investigada a presença dos *motifs* tripeptídicos associados à pausa dos ribossomos em células com depleção de eIF5A (SCHULLER *et al.*, 2017) dentre os *hits up* e *down* (no mutante *hyp2-3* em relação ao selvagem) para os tratamentos com indutores de estresse de RE, da seguinte forma: foi feita uma busca através do *software web Saccharomyces Genome Database Yeast Genome* utilizando a ferramenta de análise *Pattern Matching* (<http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/PATMATCH/nph-patmatch>) para as proteínas que contêm os 29 principais *motifs* associados a pausa de ribossomos em células com depleção de eIF5A. Essa lista foi comparada com as proteínas que compõem a coleção GFP e em seguida foi feita uma nova comparação com os *hits down* para o tratamento com DTT e tunicamicina. Após o cruzamento desses dados, foi realizado um teste de Qui Quadrado ($p < 0,05$) com o intuito de identificar enriquecimento dentre os *hits* para proteínas que possuem esses *motifs*.

Devido ao fato de que um estudo recente realizado em células de mamíferos sugeriu uma ativação da UPR e aumento na expressão de chaperonas mediante a depleção de eIF5A sem indução de estresse de RE (MANDAL *et al.*, 2016), foi investigada a possibilidade da

existência de uma ativação prévia da UPR no mutante de eIF5A em *S. cerevisiae*. Isso foi feito através da análise dos níveis proteicos do mutante *hyp2-3* em relação ao selvagem na condição controle, ou seja, sem a indução do estresse de RE, através de um teste t de *Student* bicaudal, utilizando os valores de M' para cada gene. A lista de proteínas *hits up* na condição sem indução de estresse foi comparada com uma lista de genes ativados por Hac1 que foi gerada no banco de dados Yeasttract (***Yeast Search for Transcriptional Regulators And Consensus Tracking***; www.yeasttract.com). Além disso, também foi realizada uma busca por esses genes ativados por Hac1 dentre os *hits up* provenientes de duas análises de perfil transcricional realizadas previamente no laboratório: a) perfil transcricional gerado por RNA-seq do mutante *dys1-1* (Tatiana Watanabe, dados não publicados), que é deficiente em eIF5A hipusinado (GALVAO *et al.*, 2013) b) perfil transcricional gerado por análises de *microarray* do mutante *hyp2-1* (Cleslei Zanelli, dados não publicados). Após a comparação desses dados, foi realizado um teste de Qui Quadrado ($p < 0,05$) com o intuito de identificar enriquecimento nesses rastreamentos para proteínas cuja transcrição é ativada por Hac1.

3.2.6.7. Análise de Ontologia Genética

Foram analisados os resultados obtidos para o rastreamento com as drogas indutoras de RE, ao nível biológico, utilizando a abordagem do enriquecimento de ontologias genéticas, neste caso, as identificações de GO (ontologia genética ou *Gene Ontology*), que permite classificar e catalogar os genes segundo vários domínios, nomeados em relação ao componente celular, processo biológico e função molecular em um determinado organismo (ASHBURNER *et al.*, 2000).

Para tanto, foi utilizado o *software* web *Saccharomyces Genome Database Slim Mapper* (<http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/GO/goSlimMapper.pl>) para determinar as classificações de GO.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise da influência de eIF5A no *splicing* de *HAC1*

4.1.1. Análise dos níveis de mRNA de *HAC1* em um mutante de eIF5A por PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

Como apresentado anteriormente neste projeto, dados recentes de nosso laboratório mostraram a participação de eIF5A na translocação de proteínas pela via co-traducional e que mutantes desse fator possuem níveis aumentados de proteínas envolvidas com estresse de RE, como chaperonas de via secretória (ROSSI; GALVÃO, *et al.*, 2014). Esses dados são indicativos de que eIF5A possa participar na regulação da tradução de fatores envolvidos com RE e secreção.

Resultados preliminares indicavam um papel para eIF5A na maturação de Hac1 e, portanto, na ativação da via UPR, pois, através da análise de mRNA de *HAC1* por qPCR foi revelada uma redução no *splicing* desse mRNA nos mutantes condicionais de eIF5A *hyp2-3* e *hyp2-S149P* (Danuza Rossi, dados não publicados; mutante *hyp2-S149P* também chamado de ts1159 (ZUK; JACOBSON, 1998)). No entanto, esse dado necessitava ser confirmado.

Para tanto, foi proposta a quantificação do mRNA de *HAC1* (antes e após o *splicing*) em uma linhagem selvagem e em uma mutante de eIF5A (*hyp2-3*).

4.1.1.1. Obtenção do cDNA para validação e otimização dos *primers*

Os dados de quantificação das amostras de RNA total, bem como a razão 260/280, que indica a qualidade, em relação a contaminantes, estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Quantificação das amostras de RNA em triplicata utilizadas para esta etapa.

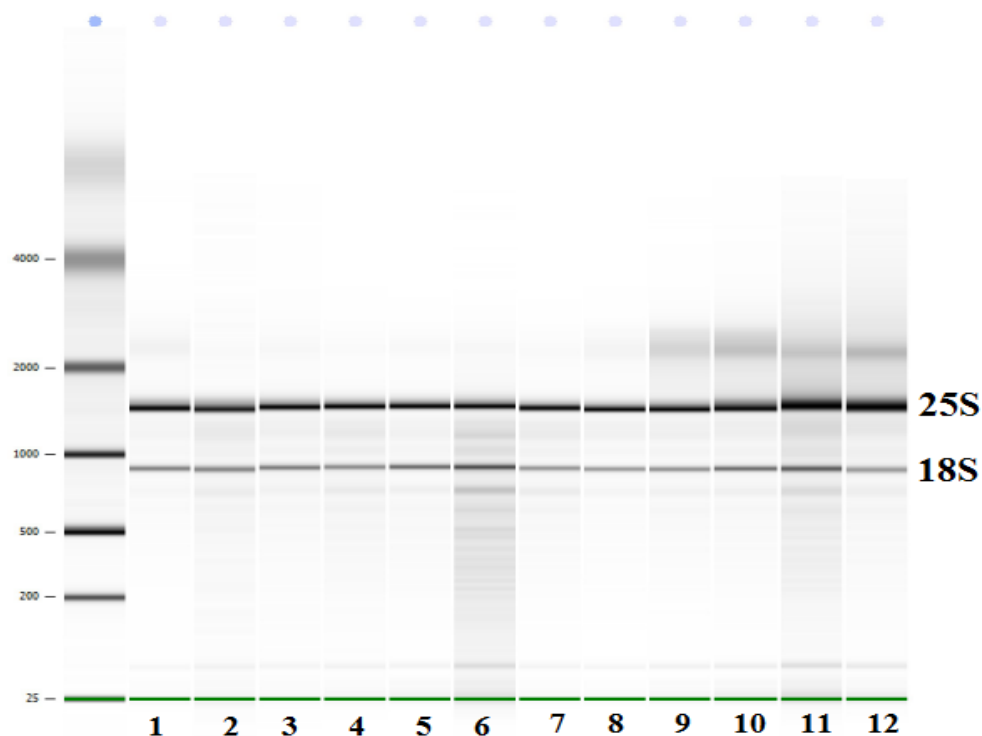
Amostra*	(ng/μL)	A260/A280
<i>HYP2.1</i> NT	557,4	2,10
<i>HYP2.2</i> NT	1901,0	2,09
<i>HYP2.3</i> NT	566,7	2,03
<i>HYP2.1</i> DTT	1330,0	2,08
<i>HYP2.2</i> DTT	753,7	2,10
<i>HYP2.3</i> DTT	738,0	2,15
<i>hyp2-3.1</i> NT	1758,0	2,10
<i>hyp2-3.2</i> NT	935,5	2,07
<i>hyp2-3.3</i> NT	670,9	2,10
<i>hyp2-3.1</i> DTT	887,5	2,13
<i>hyp2-3.2</i> DTT	1304,0	2,15
<i>hyp2-3.3</i> DTT	825,5	2,11

* NT=amostra não tratada; DTT=amostra tratada com 32mM de DTT. **Fonte:** elaborada pela autora.

Com estes resultados, observou-se que a extração do RNA total de levedura pelo método de purificação pelo kit RNeasy Mini foi eficiente e o material obtido foi puro, pois a razão 260/280 apresentou-se dentro dos valores esperados determinados pelo fabricante (1,9-2,1).

Em seguida, para verificar a integridade do RNA obtido, essas amostras foram submetidas a uma eletroforese capilar, como apresentado na Figura 13.

Figura 13 - Análise de integridade do RNA purificado de *S. cerevisiae*.



Em que: **1-3** corresponde a VZL1256 (selvagem) não tratada com DTT; **4-6** corresponde a VZL1256 (selvagem) tratada com 32 mM de DTT; **7-9** corresponde a VZL1258 (mutante *hyp2-3*) não tratada com DTT; **10-12** corresponde a VZL1258 (mutante *hyp2-3*) tratada com DTT. As bandas destacadas correspondem aos RNAs ribossomais 25S e 18S. **Fonte:** elaborada pela autora.

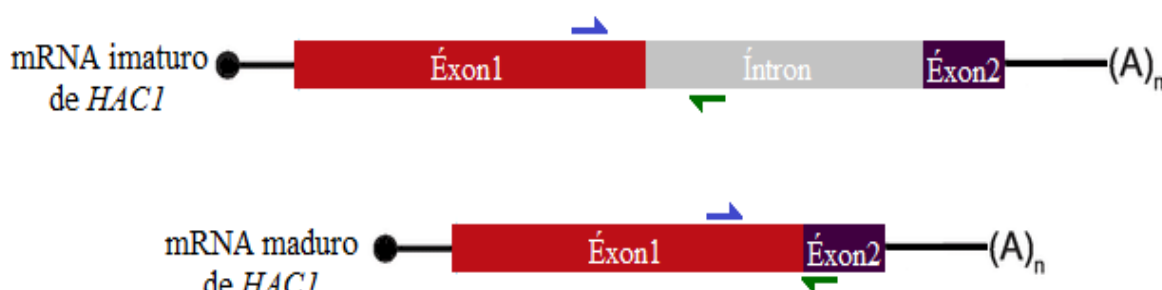
Após a corrida, as bandas dos rRNAs 25S e 18S ficaram claramente destacadas. A banda de 25S apresentou uma intensidade cerca de duas vezes maior do que a banda de 18S, sendo que esta proporção de 2:1 (25S:18S) é um bom indicativo de que o RNA total possui qualidade suficiente para o ensaio de qPCR. Vale destacar ainda que foi apresentado pouco arraste entre essas duas bandas de rRNA.

Em seguida, as amostras de RNA total foram tratadas com DNase I para retirada de qualquer contaminação com DNA genômico e submetidas à transcrição reversa, sendo que o cDNA obtido foi utilizado para a otimização e validação dos *primers*.

4.1.1.2. Desenho, otimização e validação dos *primers* para qPCR

Para a amplificação diferenciada do cDNA proveniente do mRNA de *HAC1* imaturo (antes do *splicing*), foi desenhado um *primer Forward* que anela no éxon 1 de *HAC1* e um *primer reverse* que anela no íntron (Figura 14). Já a estratégia empregada para a amplificação específica do cDNA proveniente do mRNA de *HAC1* maduro (depois do *splicing*) foi desenhar um *primer Forward* que anela no éxon 1 e um *primer reverse* que anelava na junção éxon1- éxon2 (Figura 14).

Figura 14 - Regiões de anelamento dos *primers* desenhados para o mRNA de *HAC1*.



A seta azul corresponde ao local aproximado de anelamento dos *primers forward* e a seta verde corresponde ao local aproximado de anelamento dos *primers reverse*. **Fonte:** Adaptado de DI SANTO *et al.*, 2016.

Para a determinação da eficiência de amplificação dos *primers*, foi utilizada uma curva de concentração de amostras contendo diferentes concentrações de cDNA. A partir dos valores de *slope* das curvas de concentração, foi possível calcular as eficiências de cada par de *primers* (Tabela 5). Outra informação relevante é que todos os genes em estudo apresentaram amplificação, sendo que houve a presença de um único *amplicon* para cada par de *primers*. Esta constatação se deu pela observação da curva de dissociação dos *amplicons* (fluorescência x temperatura), as quais apresentaram um único pico de fluorescência (dados não mostrados).

Tabela 5 - Concentração e eficiência dos pares de *primers* nas reações de qPCR para o gene em estudo.

mRNA em análise	Concentração dos <i>Primers</i> (µM)	Eficiência da Reação (%)	R ²
<i>HAC1</i> maduro	0,25	94	0,99
<i>HAC1</i> imaturo	0,25	90	0,99

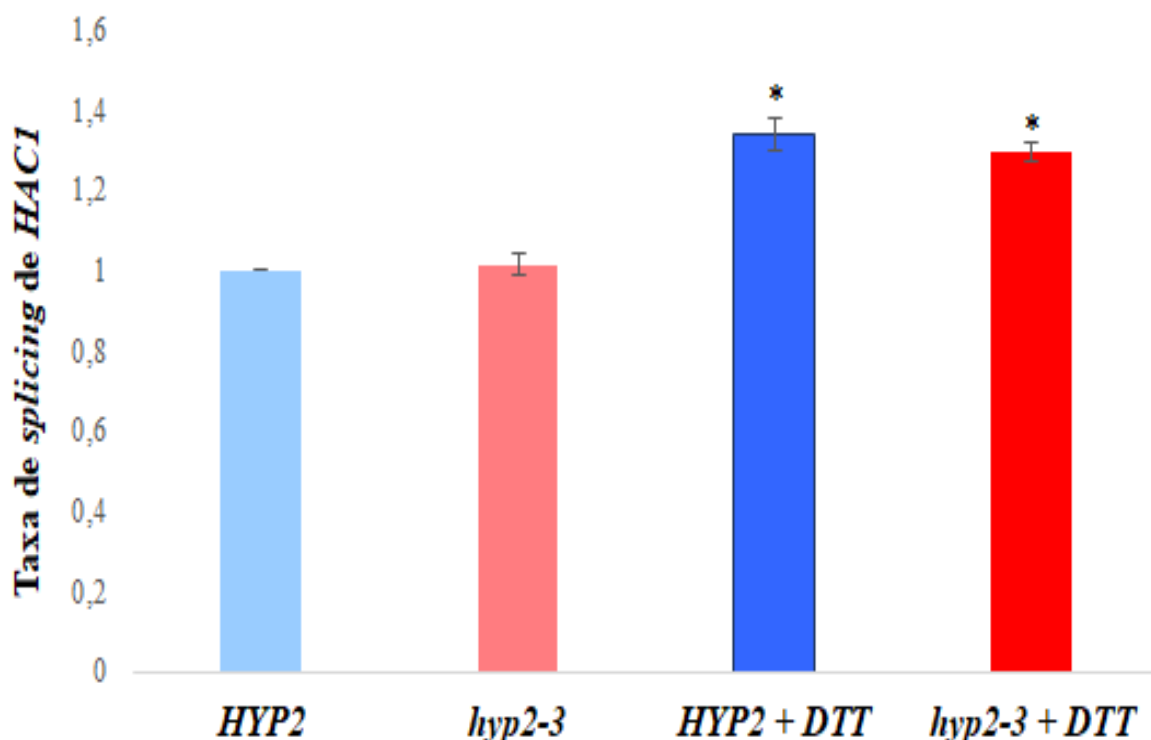
Fonte: elaborada pela autora.

Como pode ser observado através da Tabela 5, os primers analisados apresentam uma eficiência entre 90 e 110%. Ainda, o valor de R² para os mesmos foi de 0,99, sendo que este pode variar entre 0 e 1, indicando assim o quanto que o modelo consegue explicar os valores observados.

4.1.1.3. Análise de qPCR

Após todo o processo de padronização da técnica de qPCR descrito anteriormente, foi possível utilizar os valores de Ct de cada amostra para calcular os níveis de *splicing* do mRNA de *HAC1*, através da razão entre o mRNA maduro e imaturo de *HAC1*, corrigido pela condição selvagem não tratado (ELIZALDE *et al.*, 2014; VAN ANKEN *et al.*, 2014). Os resultados obtidos encontram-se na Figura 15.

Figura 15 - Taxa de *splicing* do mRNA de *HAC1* nas linhagem selvagem e mutante de eIF5A na ausência ou presença de 32 mM de DTT.



Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes, em que a razão entre os níveis de *HAC1* maduro e imaturo foram corrigidas pela condição selvagem não tratado. * $p < 0,05$ (linhagem tratada com DTT versus a mesma linhagem sem tratamento). **Fonte:** elaborada pela autora.

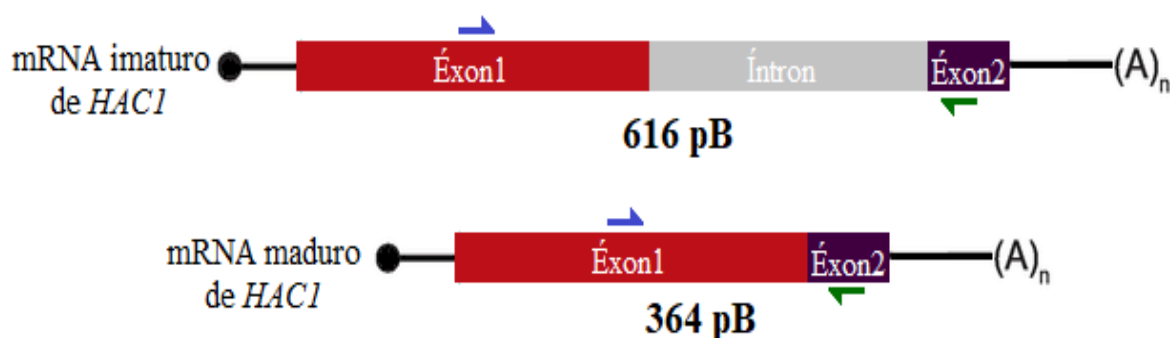
Como mostrado na Figura 15, o tratamento com DTT provocou um aumento estatisticamente significativo na taxa de *splicing*, tanto na linhagem selvagem (*HYP2*) quanto na mutante (*hyp2-3*) em relação à condição não tratada de cada linhagem, devido à indução do estresse, comprovando assim a eficiência do tratamento com DTT.

Através desse experimento, não foram observadas diferenças significativas entre a taxa de *splicing* do selvagem e mutante tanto na condição tratada quanto na condição não tratada. Sendo assim, os dados anteriores que sugeriam um papel para eIF5A na maturação de mRNA de *HAC1* não foram confirmados.

4.1.2. Detecção do *splicing* de *HAC1* por RT-PCR

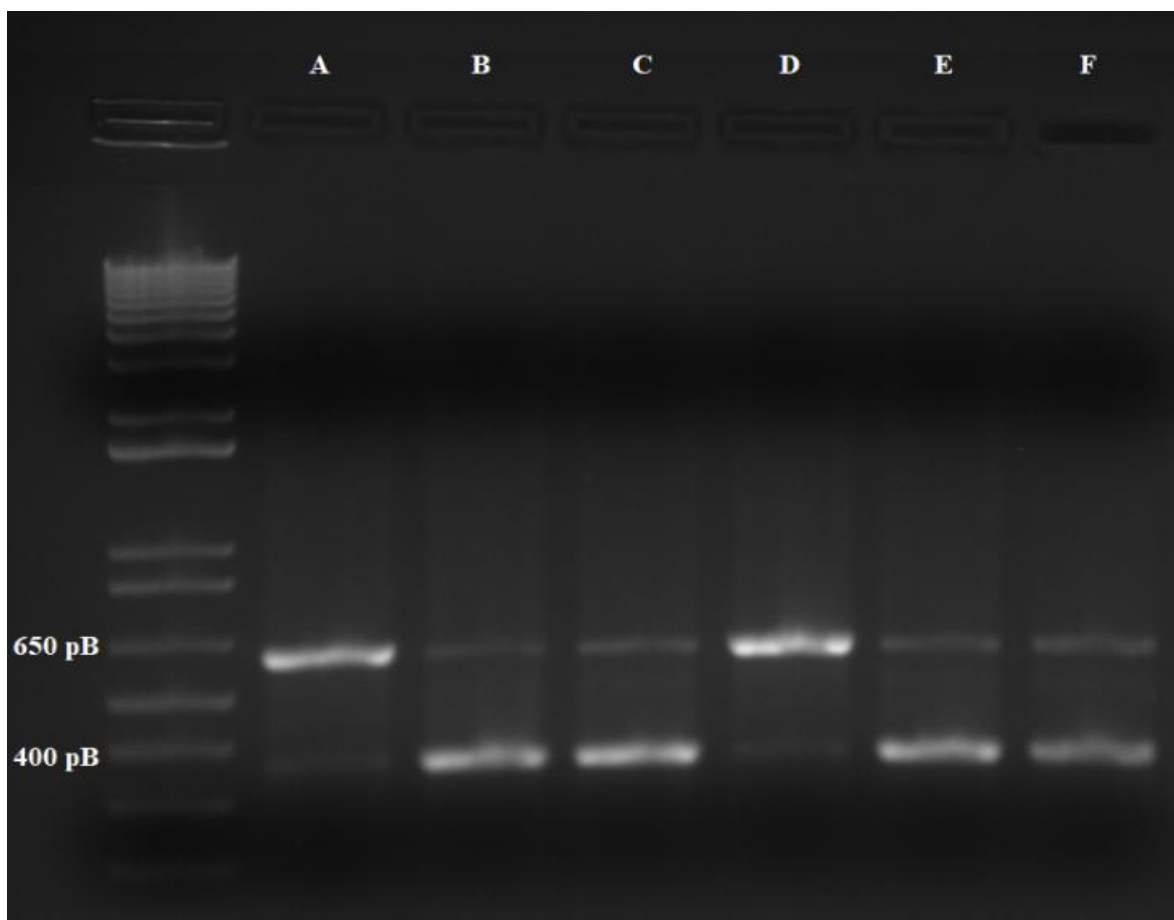
Como a qPCR não confirmou os dados preliminares obtidos anteriormente no laboratório (Danuza Rossi, dados não publicados), foi utilizada uma abordagem diferente para testar a influência de eIF5A sobre o *splicing* de *HAC1*. No caso, o emprego de uma RT-PCR utilizando-se *primers* que anelem tanto no cDNA de *HAC1* maduro quanto no imaturo (Figura 16) (BICKNELL *et al.*, 2007; BROWN *et al.*, 2013; LABUNSKYY *et al.*, 2014; CUI *et al.*, 2015). Sendo assim, a amplificação de *HAC1* imaturo gera um *amplicon* maior (616 pb) que o maduro (364 pb), devido à presença do íntron. A Figura 17 a seguir mostra os resultados obtidos com esse experimento.

Figura 16 - Primers utilizados para a amplificação de *HAC1* maduro ou imaturo.



Tamanho de fragmento esperado para *HAC1* imaturo: 616 pb; tamanho de fragmento esperado para *HAC1* maduro: 364 pb. **Fonte:** Adaptado de DI SANTO *et al.*, 2016.

Figura 17 - Detecção do *splicing* de *HAC1* por RT-PCR.



(A) selvagem não tratado; (B) selvagem tratado com DTT 4 mM; (C) selvagem tratado com tunicamicina 2 µg/mL; (D) mutante (*hyp2-3*) não tratado; (E) mutante (*hyp2-3*) tratado com DTT 4 mM; (F) mutante (*hyp2-3*) tratado com tunicamicina 2 µg/mL. **Fonte:** elaborada pela autora.

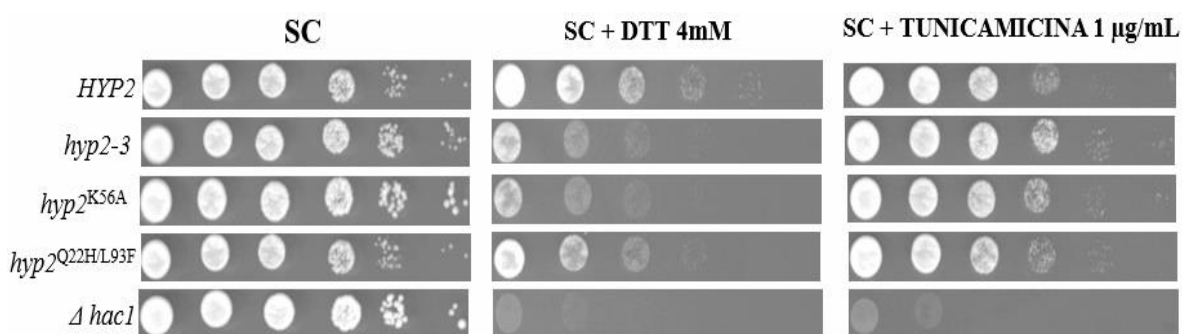
Como pode ser observado na Figura 17, tanto o selvagem quanto o mutante *hyp2-3* na condição não tratada apresentam predominantemente a amplificação de um fragmento próximo à banda de 650 pb do padrão de peso molecular, correspondendo essa banda a forma imatura de *HAC1*. É evidente ainda que o tratamento com DTT ou com tunicamicina induzem a conversão de *HAC1* imaturo para sua forma madura (fragmento próximo a 400 pb), tanto no selvagem quanto no mutante, o que demonstra, mais uma vez, que eIF5A não influencia de forma relevante no *splicing* de *HAC1*. É importante mencionar que, apesar desse experimento ser semiquantitativo, o mesmo é comumente usado para detectar o *splicing* de *HAC1* (BICKNELL *et al.*, 2007; BROWN *et al.*, 2013; LABUNSKYY *et al.*, 2014; CUI *et al.*, 2015).

4.2. Teste de sensibilidade a drogas indutoras de estresse de RE

As figuras mostradas aqui são resultados representativos de pelo menos triplicatas biológicas feitas com mais de uma colônia.

Inicialmente foram avaliados os fenótipos de crescimento das linhagens selvagem (*HYP2*) e mutantes de eIF5A (*hyp2-3*, *hyp2^{K56A}* ou *hyp2^{Q22H/L93F}*) na presença de DTT e tunicamicina (Figura 18), que são drogas indutoras de estresse de RE (OSLOWSKI; URANO, 2011).

Figura 18 - Mutantes de eIF5A apresentam sensibilidade distinta a drogas indutoras de estresse de RE.



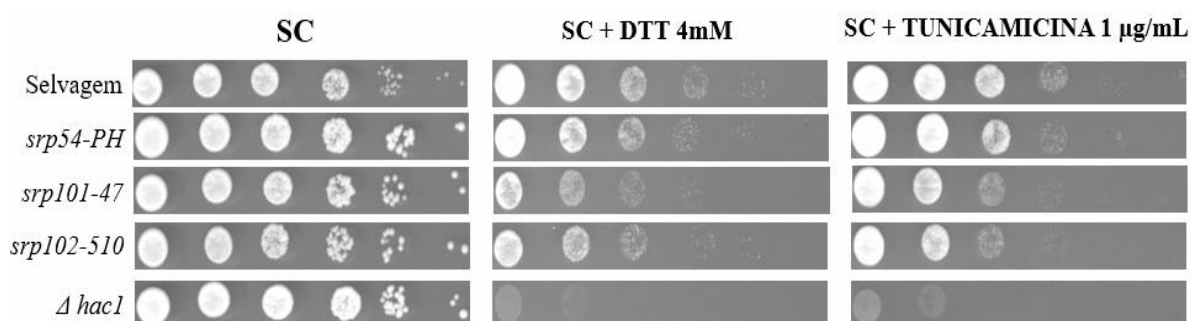
Diluições seriadas de 1:10 das linhagens foram plaqueadas em meio SC suplementado com as drogas indicadas e cultivadas a 25°C durante 2 dias. **Fonte:** elaborada pela autora.

Esses resultados foram bastante interessantes pois os mutantes de eIF5A possuem fenótipos distintos na presença de drogas indutoras de estresse de RE, sendo que apresentam sensibilidade ao DTT e não sensibilidade à tunicamicina, ou até mesmo uma certa resistência do alelo *hyp2-3*. Cabe aqui destacar que essas drogas induzem o estresse celular por mecanismos diferentes. O DTT corresponde a um potente agente redutor que bloqueia a formação de pontes dissulfeto, incluindo as de proteínas recém-sintetizadas no citosol, não sendo assim um indutor específico de estresse de RE (OSLOWSKI; URANO, 2011). Já a tunicamicina inibe a enzima UDP-N-acetil-glicosamina-dolicol fosfato N-acetilglicosamina-1-fosfato transferase (*GPT*), que catalisa a etapa inicial de biossíntese de glicoproteínas. Dessa forma, o tratamento com tunicamicina inibe a N-glicosilação, o que resulta no acúmulo de proteínas mal enoveladas no lúmen do RE e na ativação da via UPR (OSLOWSKI; URANO, 2011).

Como essas drogas afetam o dobramento de proteínas no RE e considerando que um

trabalho anterior do laboratório descreveu a participação de eIF5A na translocação de proteínas para o RE pela via co-traducional (ROSSI; GALVAO, *et al.*, 2014), foi realizado um teste para analisar o fenótipo de crescimento na presença de DTT e tunicamicina de mutantes condicionais da via de SRP (Figura 19). Foram testados o mutante de uma subunidade de SRP, *srp54-PH*, e mutantes do receptor de SRP no RE (*srp101-47* e *srp102-510*). Vale ressaltar que todos esses mutantes mencionados, relacionados a SRP, apresentam defeito na translocação de proteínas para o RE (PRINZ *et al.*, 2000).

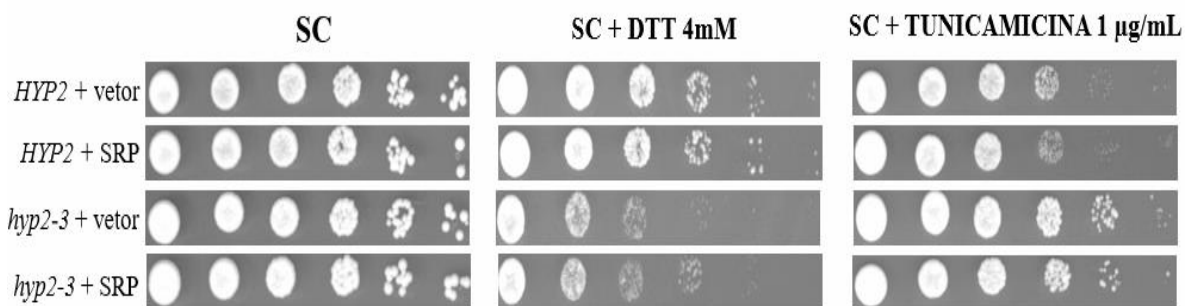
Figura 19 - Teste de sensibilidade de mutantes de SRP a drogas indutoras de estresse de RE.



Diluições seriadas de 1:10 das linhagens foram plaqueadas em meio SC suplementado com as drogas indicadas e cultivadas a 25°C durante 2 dias. **Fonte:** elaborada pela autora.

Verificou-se que esses mutantes de SRP testados ou não apresentam sensibilidade tanto ao DTT quanto à tunicamicina, como *srp54-PH*, ou apresentam certa sensibilidade, a ambos indutores de estresse de RE, demonstrando, assim, um padrão diferente daquele dos mutantes de eIF5A (em comparação com a Figura 18).

Como já foi descrito em um trabalho do nosso laboratório que a superexpressão de todos os componentes do complexo SRP suprimiu o fenótipo de sensibilidade à temperatura do mutante *hyp2-1 (tif51A-1)* de eIF5A (ROSSI; GALVAO, *et al.*, 2014), foi testado se essa superexpressão alteraria os fenótipos apresentados pelo mutante *hyp2-3* de eIF5A na presença de drogas indutoras de estresse de RE (Figura 20).

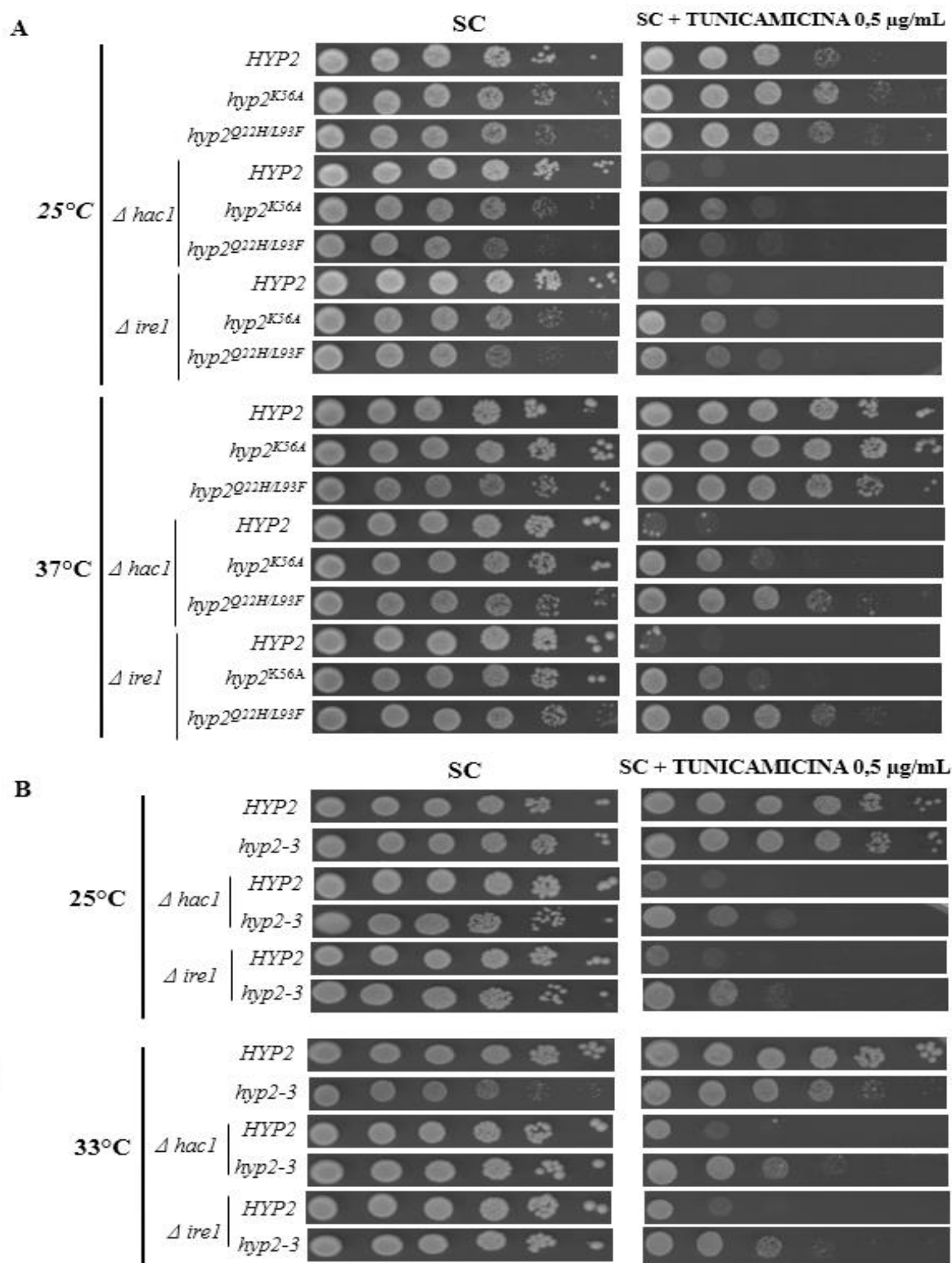
Figura 20 - Superexpressão dos componentes do complexo SRP.

Diluições seriadas de 1:10 das linhagens selvagem (VZL1256) e mutante *hyp2-3* (VZL1258), superexpressando todos os componentes do complexo de SRP (pVZ1359 + pVZ1360) ou carreando vetores vazios (pSV364 + pSV374), foram plaqueadas em SC -leu, -ura e cultivadas a 25°C durante 3 dias. **Fonte:** elaborada pela autora.

Como pode ser observado, o teste de superexpressão dos componentes do complexo SRP não alterou os fenótipos apresentados pelo mutante de eIF5A *hyp2-3* na presença de drogas indutoras de estresse de RE. Sendo assim, o comportamento diferencial de mutantes de eIF5A com relação a diferentes indutores de estresse de RE não deve estar diretamente relacionado com a translocação co-traducional de proteínas mediada por SRP.

Uma vez que mutantes de eIF5A são resistentes a tunicamicina em algumas condições, foi testado também se mutantes duplos de eIF5A e de nocautes de *HAC1* ou *IRE1* possuem comportamento diferente daqueles dos mutantes simples (Figura 21).

Figura 21 - Análise de interação genética entre os mutantes de eIF5A e nocautes de *HAC1* ($\Delta hac1$) ou *Ire1* ($\Delta ire1$).



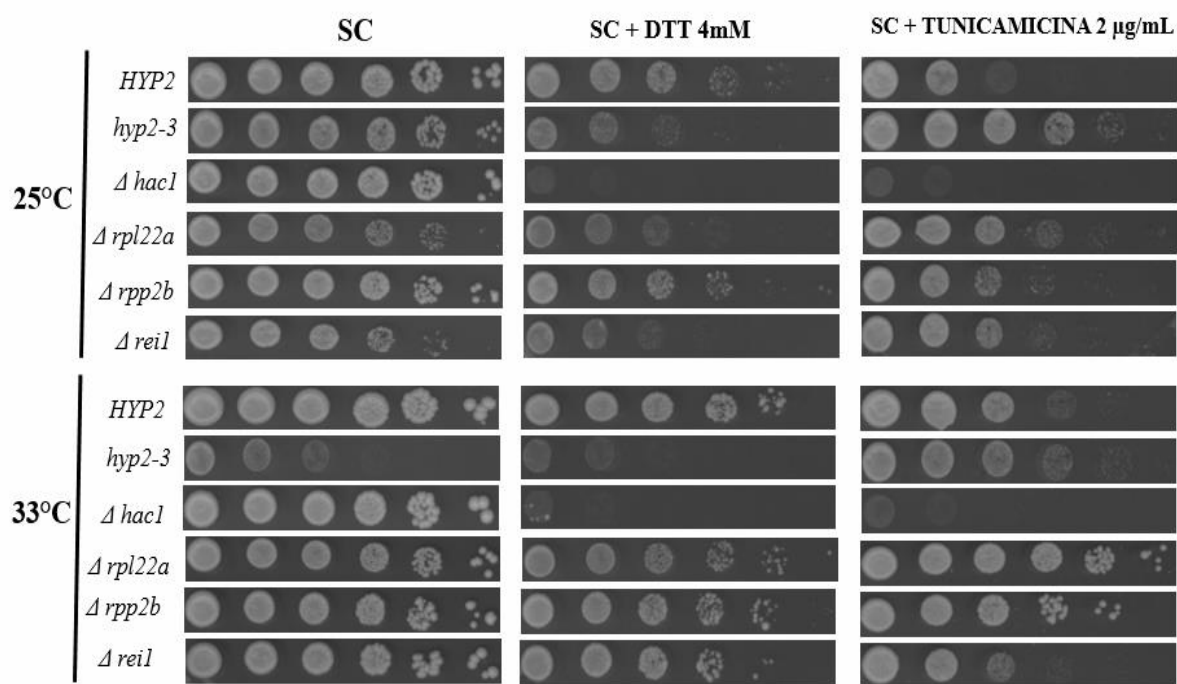
Diluições seriadas de 1:10 das linhagens indicadas foram plaqueadas em meio SC adicionado ou não de tunicamicina e cultivadas a 25°C e 37°C durante 2 dias **(A)** ou 25°C e a 33°C durante 3 dias **(B)**. **Fonte:** elaborada pela autora.

Como apresentado na Figura 21, os mutantes duplos de eIF5A e de nocautes de *HAC1* ou *IRE1* apresentam crescimento melhor que os nocautes de *HAC1* ou *IRE1* isolados na presença de uma concentração menor de tunicamicina do que as testadas na Figura 18. Apesar dessa supressão ser pequena a 25°C, ela é reproduzível e compatível com dados similares de mutantes de proteínas ribossomais, sendo esta mais pronunciada nas temperaturas semipermissivas.

Este resultado é bastante interessante, pois, sem Hac1 ou Ire1 na célula a UPR não é ativada em resposta a estresse de RE. Desta forma, a supressão de fenótipo promovida pela inativação da função de eIF5A na célula é independente de Hac1 ou Ire1, pois mesmo na ausência destes, ocorre melhora no crescimento de mutantes de eIF5A na presença de tunicamicina (Figura 21).

De forma semelhante ao que foi observado no presente trabalho, um estudo prévio demonstrou uma resistência à tunicamicina aumentada em mutantes com deleções nos genes de proteínas ribossomais e de montagem de ribossomo, sendo esta independente do fator de transcrição Hac1. Estes dados suportam um modelo no qual a tradução reduzida é protetora contra o estresse de RE por meio de um mecanismo distinto da via canônica de UPR (STEFFEN *et al.*, 2012). Porém, neste caso, não foi demonstrado o comportamento dessas linhagens com deleção de proteínas ribossomais ou responsáveis pela montagem do ribossomo na presença de DTT. Sendo assim, foi realizado um ensaio de sensibilidade a DTT e tunicamicina após diluição seriada com essas linhagens e os resultados encontram-se na Figura 22.

Figura 22 - Mutante de eIF5A apresenta comportamento distinto de linhagens com deleção de proteínas ribossomais na presença de drogas indutoras de estresse de RE.



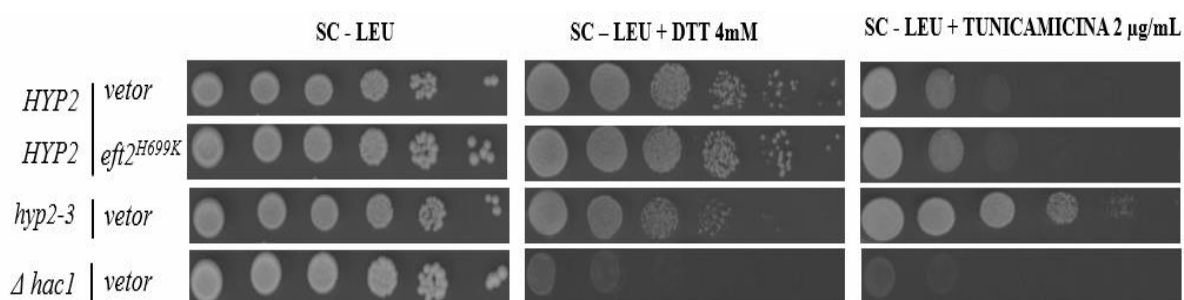
Diluições seriadas de 1:10 das linhagens foram plaqueadas em meio SC suplementado com as drogas indicadas e cultivadas a 25°C e 33°C durante 3 dias. **Fonte:** elaborada pela autora.

Como pode ser observado na Figura 22, a resistência a tunicamicina do mutante *hyp2-3* é ainda mais pronunciada (principalmente a 25°C) na presença de uma concentração maior desta droga. Essa concentração maior de tunicamicina foi utilizada nesse experimento pois os ensaios com linhagens que apresentam deleções de proteínas ribossomais foram realizados nessa condição. De uma maneira geral, a resistência à tunicamicina não foi demonstrada de forma muito evidente para essas linhagens, porém, os testes originais foram realizados a 30°C. Apesar disso, o que ficou bem evidente é que o comportamento de sensibilidade ao DTT do mutante *hyp2-3*, principalmente a 33°C, não é observado nas outras linhagens da Figura 22, o que mostra que eIF5A afeta a resposta a drogas que induzem o estresse de RE de uma forma diferente que os mutantes de proteínas ribossomais e montagem de ribossomo.

Ainda neste âmbito, com o intuito de confirmar se esse efeito supressor da sensibilidade a tunicamicina de mutantes de eIF5A corresponde a uma deficiência na tradução específica de elementos da via secretória (MANDAL *et al.*, 2016) ou geral, as linhagens selvagem (VZL1363), *Δhac1* e *Δrei1* foram transformadas com o plasmídeo que

carreia o mutante dominante negativo de eEF2 (*eft2^{H699K}*), que ocasiona um defeito geral na elongação da tradução celular (ORTIZ; KINZY, 2005). Em seguida, foi avaliado se esse mutante também desencadeia os efeitos observados para os mutantes de eIF5A na presença de drogas indutoras de estresse de RE (Figura 23).

Figura 23 - Comportamento da linhagem selvagem transformada com o mutante dominante negativo de eEF2 (*eft2^{H699K}*) na presença de drogas indutoras de estresse de RE.

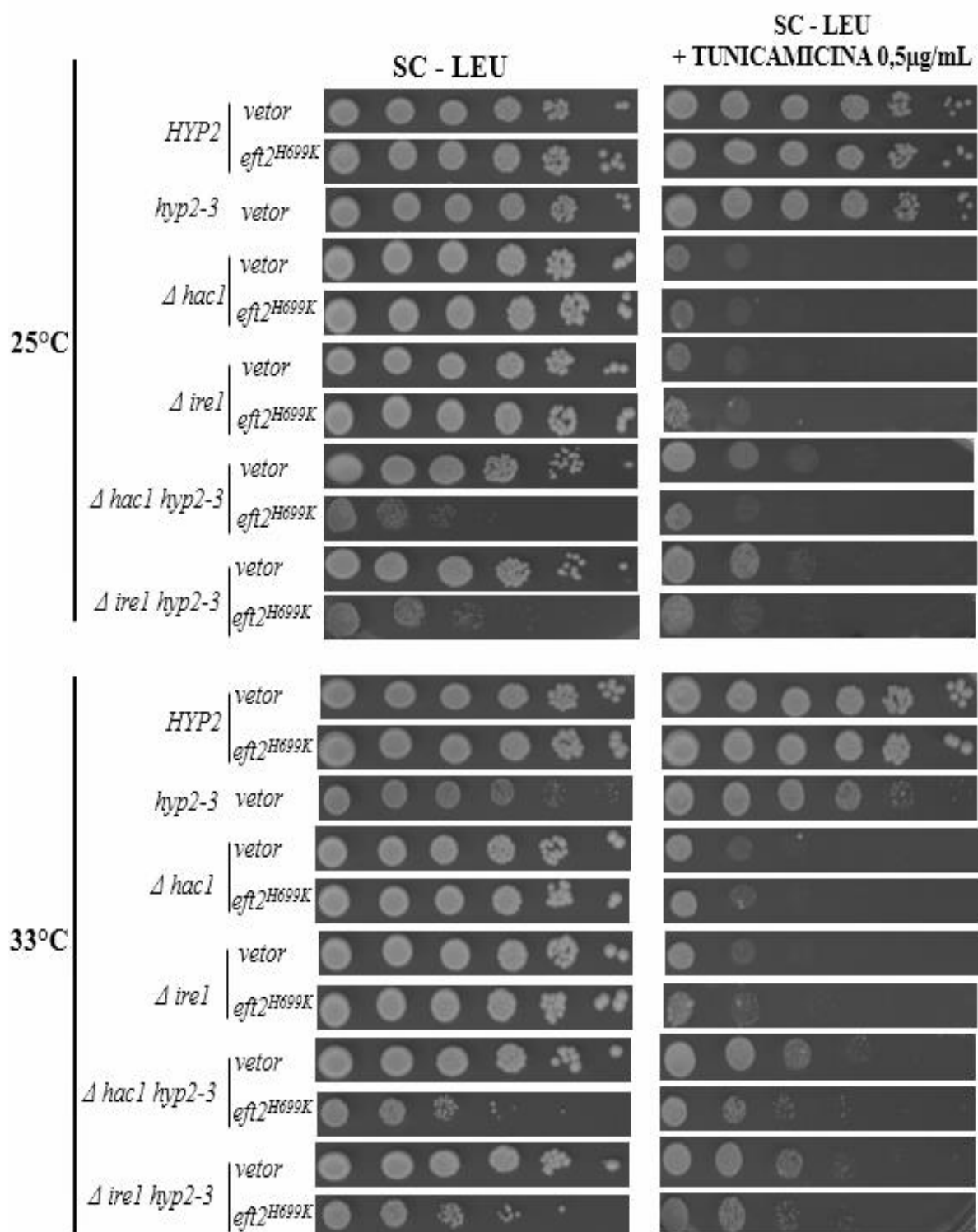


Diluições seriadas de 1:10 das linhagens de interesse foram plaqueadas em SC-leu e cultivadas a 25°C durante 3 dias. **Fonte:** elaborada pela autora.

Como pode ser observado na Figura 23, uma redução geral da elongação da tradução não é capaz de proporcionar na célula selvagem para eIF5A um comportamento semelhante ao mutante desse fator na presença de drogas indutoras de estresse de RE, permanecendo esta com padrão de crescimento compatível com a linhagem de partida transformada com o vetor vazio. Nessas condições, não foi possível avaliar o efeito do dominante negativo de eEF2 sobre as linhagens Δ *hac1* e Δ *ire1*, pois as mesmas não cresceram (dados não mostrados).

Considerando que os mutantes duplos de eIF5A e Δ *hac1* e Δ *ire1* apresentam crescimento melhor que Δ *hac1* e Δ *ire1* separadamente, também foi testado se a combinação da mutação de eEF2 com os nocautes de Hac1 ou Ire1 proporciona alguma alteração no crescimento (Figura 24).

Figura 24 - Análise de interação genética entre o mutante eEF2 (*eft2^{H699K}*) e nocautes para Hac1 ($\Delta hac1$) ou Ire1 ($\Delta ire1$).



Diluições seriadas de 1:10 das linhagens indicadas foram plaqueadas em meio SC adicionado ou não de tunicamicina e cultivadas a 25°C e 33°C durante 3 dias. **Fonte:** elaborada pela autora.

Como pode ser observado na Figura 24, a redução geral da elongação da tradução não foi capaz de proporcionar a supressão do defeito de crescimento dos nocautes de Hac1 ou Ire1 na presença de tunicamicina, como é observado para os mutantes duplos dessas proteínas e de eIF5A, permanecendo estas com padrão de crescimento compatível com a linhagem de partida transformada com o vetor vazio, o que corrobora com um efeito específico de eIF5A sobre essa supressão do defeito de crescimento em tunicamicina, independente de via de Hac1.

É necessário ainda chamar a atenção para o fato de que mutantes duplos de eIF5A e de nocautes de Hac1 ou Ire1 transformados com o dominante negativo de eEF2 mostram a interação genética já descrita para eIF5A e eEF2 (DIAS *et al.*, 2012), o que aumenta a confiabilidade dos resultados.

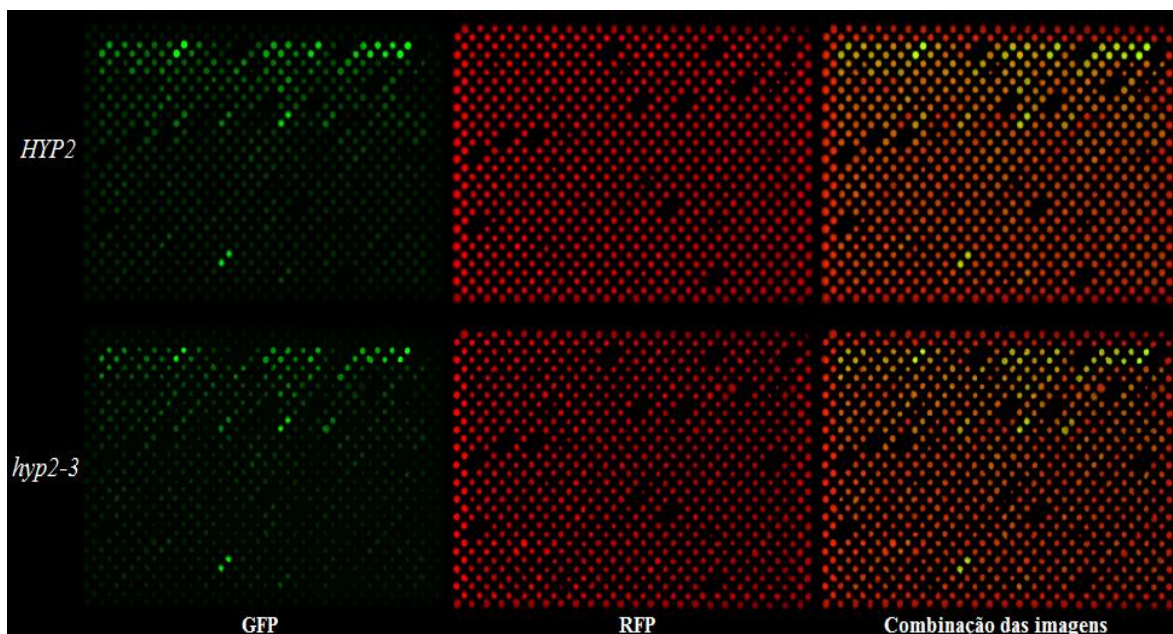
4.3. Análise do perfil proteômico do mutante *hyp2-3* em resposta ao DTT e a tunicamicina

4.3.1. Rastreamento com a coleção de ORFs-GFP de *S. cerevisiae*

Para tentar entender melhor como eIF5A está envolvido na tradução de genes específicos e o motivo pelo qual mutantes de eIF5A possuem fenótipos distintos na presença de drogas indutoras de estresse de RE: sensibilidade ao DTT e resistência à tunicamicina (dados apresentados anteriormente), foi feita uma verificação da existência de diferenças nos níveis de proteínas entre uma linhagem selvagem (VZL1363) e uma mutante (VZL1364 - *hyp2-3*) de eIF5A na presença dessas drogas indutoras de estresse de RE.

Para isso, foi realizada uma análise do perfil proteômico de *S. cerevisiae* através da quantificação de fluorescência *in vivo* utilizando-se versões da coleção de ORFs-GFP com *background* selvagem e mutante de eIF5A (*hyp2-3*), geradas através da metodologia SGA. Como normalizador interno, foi utilizada uma variante da proteína fluorescente vermelha (RFP) E2Crimson, sob o controle transcrricional de um promotor constitutivo do gene de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH - *TDH3* em *S. cerevisiae*). Um exemplo dos resultados obtidos pode ser visto na Figura 25.

Figura 25 - Resultado do escaneamento de uma placa da coleção com o *background* selvagem e mutante de eIF5A (*hyp2-3*).

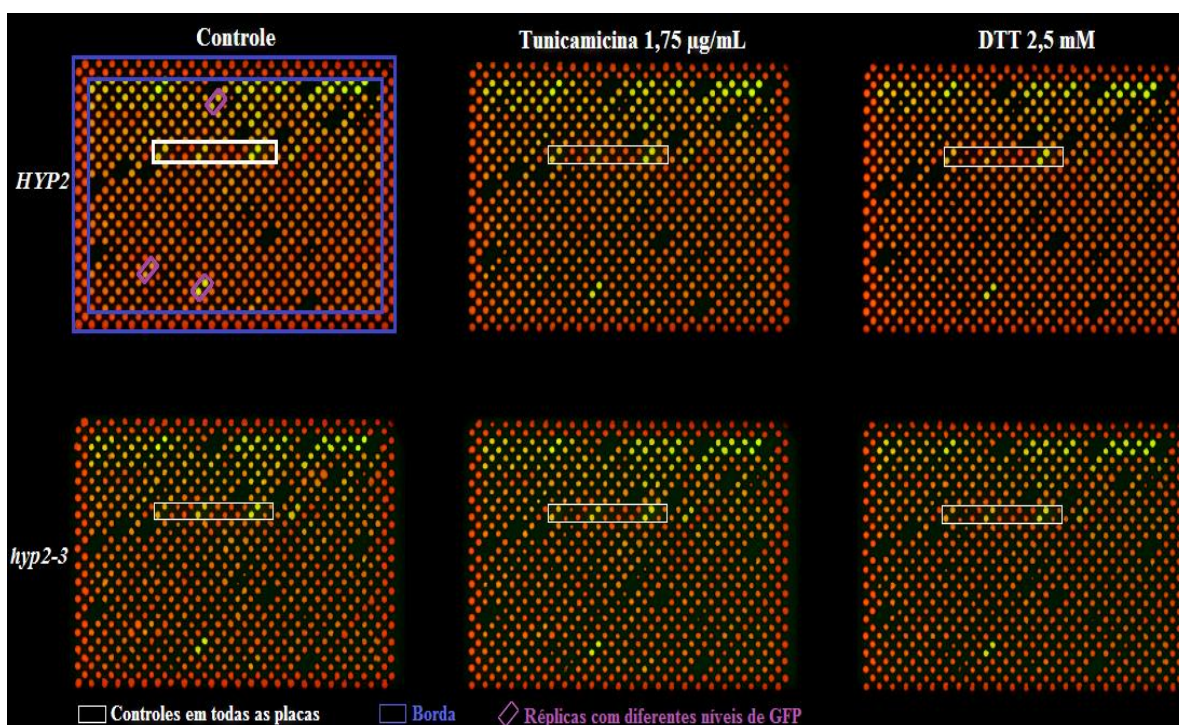


Os painéis à esquerda demonstram as intensidades de fluorescência de GFP, os centrais de RFP (E2Crimson) e os à direita representam a sobreposição dessas imagens para a placa 1 da coleção utilizada, com o *background* selvagem (superior) e mutante de eIF5A (inferior).

Fonte: elaborada pela autora.

As medidas de fluorescência foram obtidas nas seguintes condições: ausência de droga indutora de estresse de RE (controle), 1,75 µg/mL de tunicamicina e 2,5mM de DTT para o selvagem e o mutante de eIF5A. O resultado da sobreposição das imagens obtidas para GFP e RFP de um dos 14 escaneamentos, nas 6 condições de estudo, pode ser visualizado na Figura 26.

Figura 26 - Amostra dos resultados da sobreposição das imagens de fluorescência de GFP e RFP obtidos após escaneamento no *Typhoon*.



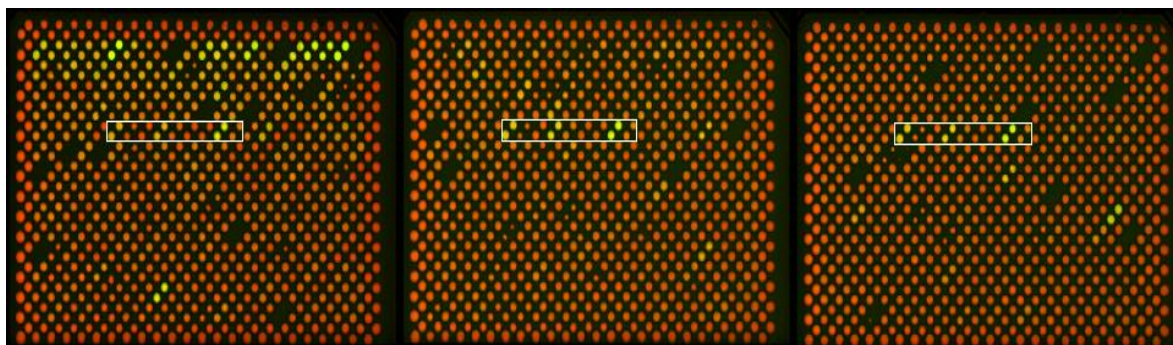
As linhas destacadas pelos retângulos brancos correspondem aos controles presentes em todas as placas; as linhas destacadas pelos retângulos azuis (primeira placa canto superior esquerdo) correspondem à borda presente em todas as placas; e as colônias destacadas pelo retângulo roxo correspondem a duplicatas de diferentes ORFs-GFP. **Fonte:** elaborada pela autora.

Como pode ser observado na Figura 26, cada placa foi delimitada por uma linha com a capacidade de crescer em meio sintético sem histidina, pois as colônias da borda apresentam uma vantagem de crescimento em relação às outras colônias devido à maior disponibilidade de nutrientes nessa região (TONG; BOONE, 2007). Essa borda aparece mais avermelhada que as demais colônias pois a mesma produz apenas a proteína fluorescente RFP. Os outros clones presentes na placa aparecem mais ou menos verdes, o que reflete os diferentes níveis de proteínas fluorescentes que estão sendo produzidas pelas mesmas (GFP e RFP).

Em todas as placas também foram adicionadas 9 linhas com diferentes níveis de expressão de GFP que funcionaram como controles para avaliar a variação de intensidade do sinal de fluorescência entre as placas. Através de uma análise visual, foi constatado que a coloração das duplicatas dos controles eram bem parecidas dentro da mesma placa nas

diferentes condições e entre placas diferentes (Figura 27), assim como a coloração das replicatas dos demais clones. Essa análise visual também indicou que a maior parte das linhagens analisadas apresentava a intensidade das proteínas fluorescentes para selvagem e mutante nas diferentes condições analisadas em um nível semelhante, comportamento este esperado para esse tipo de estudo.

Figura 27 - Semelhança entre o comportamento dos controles em diferentes placas.



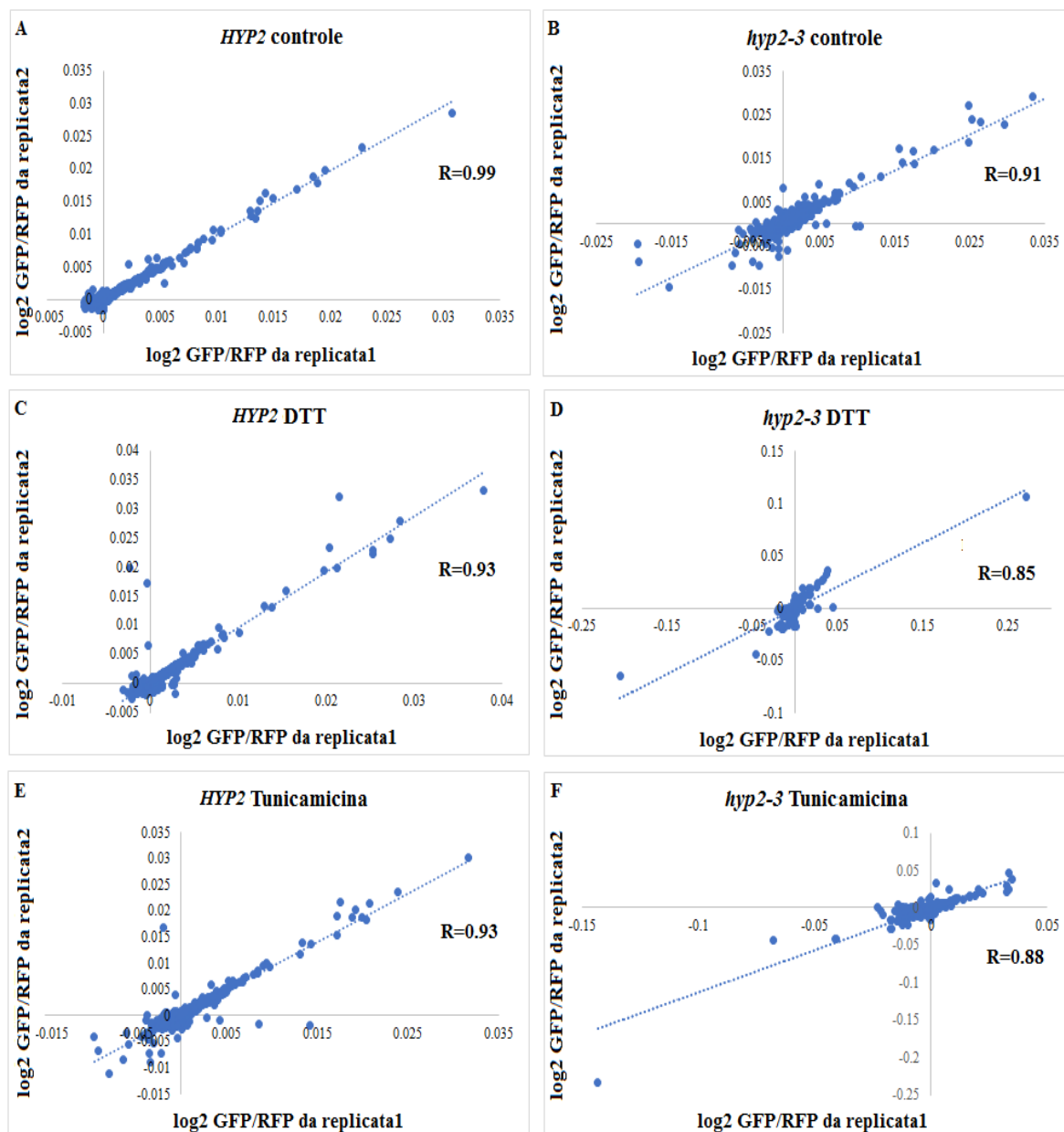
Os painéis demonstram a sobreposição das imagens obtidas para GFP e RFP das placas 1, 2 e 3 (da esquerda pra direita) na condição controle/selvagem (sem DTT ou tunicamicina).

Fonte: elaborada pela autora.

Para comprovar que as duplicatas das diferentes linhagens nas diferentes condições analisadas apresentavam níveis de proteínas fluorescentes semelhantes, o que reflete na reprodutibilidade dos resultados, foi realizada a quantificação da intensidade da associação linear entre as replicatas através do cálculo do coeficiente de correlação linear (R), utilizando para isso os valores da razão $\log_2$ GFP/RFP (KAINTH *et al.*, 2009) (Figura 28).

Como pode ser observado na Figura 28, os coeficientes de correlação variaram de 0,85 (para a condição mutante tratado com 2,5 mM de DTT) a 0,99 (para a condição selvagem controle) demonstrando assim que há uma correlação positiva forte entre os valores das replicatas do experimento.

Figura 28 - Correlação linear entre as replicatas nas diferentes condições de estudo.



(A) Condição selvagem controle, cujo valor de R foi 0,99; (B) Condição mutante *hyp2-3* controle, cujo valor de R foi 0,91; (C) Condição selvagem tratado com 2,5 mM de DTT, cujo valor de R foi 0,93; (D) Condição mutante *hyp2-3* tratado com 2,5 mM de DTT, cujo valor de R foi 0,85; (E) Condição selvagem tratado com 1,75 µg/mL de tunicamicina, cujo valor de R foi 0,93; (F) Condição mutante *hyp2-3* tratado com 1,75 µg/mL de tunicamicina, cujo valor de R foi 0,88. A correlação foi determinada comparando a razão log2 GFP/RFP para cada replicata nas diferentes condições. **Fonte:** elaborada pela autora.

4.3.2. Análise do efeito do tratamento com DTT e tunicamicina no selvagem

Primeiramente, no intuito de avaliar se a estratégia de análise proteômica utilizada nesse trabalho foi capaz de detectar o aumento nos níveis de proteínas induzidas por UPR, foi realizada a comparação entre os níveis proteicos da condição selvagem controle e os selvagens tratados com DTT ou tunicamicina. Após esse processo, as proteínas cujos níveis aumentaram significativamente após o tratamento com DTT ou tunicamicina foram comparados com uma lista de 290 genes (considerando os presentes na coleção GFP - Anexo 1) que representa o perfil transcricional de ativação de UPR obtido com o tratamento com DTT ou tunicamicina através de *microarray* (TRAVERS *et al.*, 2000; KIMATA *et al.*, 2006).

Após essa comparação, foi feita uma análise de Qui Quadrado ($p < 0,05$) para avaliar se havia um enriquecimento para esses genes da lista de referência de genes ativados por UPR dentre as proteínas *hits up* no selvagem após o tratamento com DTT ou com tunicamicina. Como esse enriquecimento não foi observado, foi realizada uma análise de ontologia genética (GO, *Gene Ontology*) para avaliar se os termos de GO enriquecidos da lista de genes induzidos por UPR (TRAVERS *et al.*, 2000; KIMATA *et al.*, 2006) apresentam coincidências informativas do efeito do tratamento com DTT ou com tunicamicina nos *hits up* do selvagem (selvagem tratado em comparação com não tratado). As Tabelas 6 e 7 a seguir mostram os termos de GO de processo biológico e de componente celular enriquecidos que são coincidentes entre as listas de referência (genes induzidos por UPR) e as listas de proteínas *hits up* no selvagem após os tratamentos (Anexo 2).

Tabela 6 - Correspondências entre os termos de GO enriquecidos da lista de alvos de UPR em comparação com as proteínas com níveis aumentados na linhagem selvagem após o tratamento com DTT.

BIOLOGICAL PROCESS		
<i>GO term</i>	<i>p value</i>	<i>n. de genes*</i>
Cellular lipid biosynthetic process	0,05	8
Cellular lipid metabolic process	0,04	49
Cytoplasmic sequestering of protein	0,05	5
Ergosterol biosynthetic process	0,05	8
Ergosterol metabolic process	0,04	9
GPI anchor metabolic process	0,07	7
Protein retention in ER lumen	0,00	5
Lipid biosynthetic process	0,03	36
Lipid metabolic process	0,04	51
Maintenance of protein localization in endoplasmic reticulum	0,00	5
Maintenance of protein localization in organelle	0,03	5
Membrane lipid metabolic process	0,10	14
Phosphatidylinositol biosynthetic process	0,08	9
Phosphatidylinositol metabolic process	0,10	13
Protein folding in endoplasmic reticulum	0,09	4
Protein N-linked glycosylation	0,09	9
Vesicle fusion	0,06	10
CELLULAR COMPONENT		
<i>GO term</i>	<i>p value</i>	<i>n. de genes*</i>
Endoplasmic reticulum membrane	0,03	58
Golgi medial cisterna	0,03	3
Vacuolar membrane	0,04	41
Spindle	0,04	15
Microtubule	0,05	13
Nuclear outer membrane-endoplasmic reticulum membrane network	0,06	58
Integral component of membrane	0,06	148
Vacuole	0,06	66
Endoplasmic reticulum part	0,08	58
Endoplasmic reticulum	0,08	87
Oligosaccharyltransferase complex	0,09	3

* Com níveis aumentados na linhagem selvagem após o tratamento com DTT. **Fonte:** elaborada pela autora.

Tabela 7 - Correspondências entre os termos de GO enriquecidos da lista de alvos de UPR em comparação com as proteínas com níveis aumentados na linhagem selvagem após o tratamento com tunicamicina.

BIOLOGICAL PROCESS		
GO term	p value	n. de genes*
Cell aging	0,00	19
Cellular response to external stimulus	0,00	25
Cellular response to extracellular stimulus	0,00	25
Establishment of protein localization to endoplasmic reticulum	0,07	9
Golgi organization	0,03	5
Localization within membrane	0,08	4
Posttranslational protein targeting to membrane	0,02	6
Posttranslational protein targeting to membrane, translocation	0,00	5
Protein desumoylation	0,06	3
Protein folding	0,08	20
Protein insertion into membrane from inner side	0,03	3
Protein localization to endoplasmic reticulum	0,02	13
Protein localization to endoplasmic reticulum exit site	0,07	2
Protein polyubiquitination	0,09	7
Protein targeting to ER	0,06	9
Regulation of glycolytic process	0,00	4
Replicative cell aging	0,04	11
Response to external stimulus	0,00	28
Signal peptide processing	0,09	3
Cellular component		
GO term	p value	n. de genes*
Sec62/Sec63 complex	0,00	4
Endoplasmic reticulum Sec complex	0,00	4
Signal peptidase complex	0,01	3
Membrane-bounded organelle	0,02	527
ESCRT II complex	0,03	2
Rough endoplasmic reticulum	0,03	4
Rough endoplasmic reticulum membrane	0,03	4
BLOC-1 complex	0,05	3
Endoplasmic reticulum lumen	0,06	4

* Com níveis aumentados na linhagem selvagem após o tratamento com tunicamicina.

Fonte: elaborada pela autora.

Como pode ser observado através das Tabelas 6 e 7, existem diversas coincidências de categorias de GO. Sendo assim, os resultados obtidos no presente trabalho possuem uma boa concordância com os resultados da literatura para genes ativados por UPR (TRAVERS *et al.*, 2000; KIMATA *et al.*, 2006). Vale ressaltar que apesar dessa lista de genes ativados por UPR ser muito utilizada na literatura como referência para esse tipo de comparação, a mesma não engloba genes que classicamente foram definidos como alvos de UPR, como é o caso de *KAR2* e *INO1*. Além disso, comparando essa lista de referência (290 genes da coleção GFP) com a lista de genes regulados positivamente por Hac1 (137 genes na coleção GFP; dados provenientes do Yeasttract - Anexo 3), é observada uma sobreposição de apenas 50% dos genes, o que pode ter ocorrido devido ao fato de que esses conjuntos de resultados são provenientes de experimentos em larga escala.

4.3.3. Análise geral dos hits gerados pelo rastreamento com drogas indutoras de estresse de RE

Após a análise dos dados provenientes das 84 placas nas diferentes condições, foram então obtidas as proteínas que apresentavam níveis distintos entre o mutante de eIF5A e o selvagem na presença de drogas indutoras de estresse de RE, sendo que essas receberam a denominação de *hit*. Quando as mesmas apresentavam níveis reduzidos no mutante *hyp2-3* em relação ao selvagem, estas receberam a denominação *hit down* e, quando os níveis eram aumentados no mutante, estas receberam a denominação *hit up*. Cabe aqui ressaltar que o foco deste trabalho foi tentar entender porque o mutante de eIF5A apresenta fenótipos distintos na presença das drogas indutoras de estresse de RE, sendo assim, serão exibidos os resultados obtidos para as proteínas que apresentaram diferentes níveis entre o mutante de eIF5A e o selvagem na presença destas drogas, sendo que o estudo das proteínas que se encontram diferencialmente presentes na ausência de drogas é parte do objetivo do projeto da doutoranda Natália Moreira Barbosa. Entretanto, em um futuro próximo pretende-se comparar os resultados obtidos no presente estudo com os dados provenientes do trabalho da Natália, para avaliar a reprodutibilidade dos resultados obtidos através do escaneamento com o *Typhoon*. A Tabela 8 a seguir resume o número de *hits* obtidos para as condições de tratameto com DTT e com tunicamicina (lista completa dos *hits* no Anexo 4).

Tabela 8 - Número de *hits* identificadas na análise proteômica por GFP/RFP.

Condição	Número de <i>hits</i>	Número de <i>hits</i>	Total
	<i>up</i>	<i>down</i>	
DTT	205	256	461
Tunicamicina	112	186	298

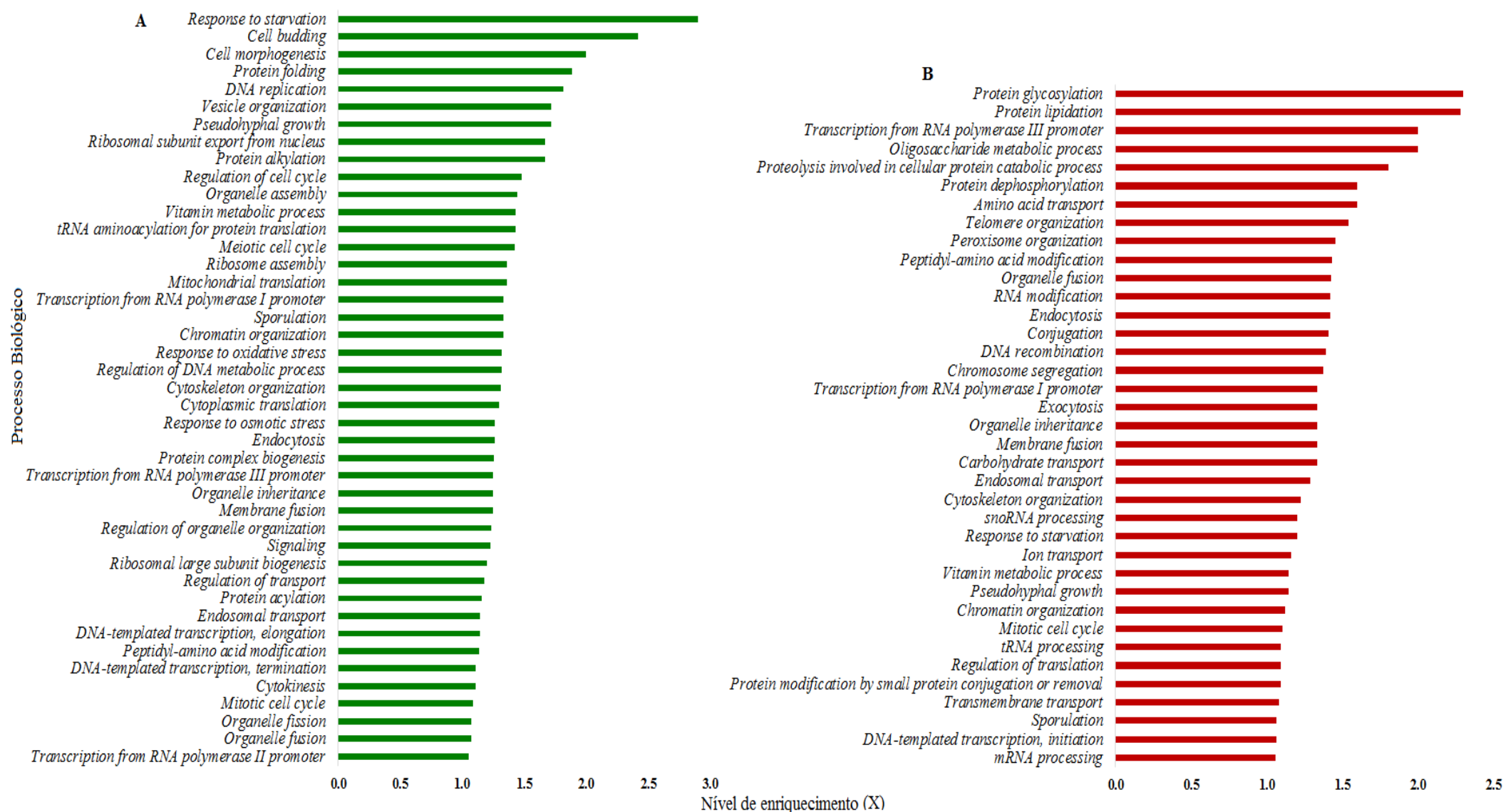
Fonte: elaborada pela autora.

Como pode ser observado na Tabela 8, foram encontradas, após o rastreamento, 461 proteínas com níveis alterados entre o mutante e o selvagem na presença de DTT, sendo que 205 destas apresentavam os níveis aumentados e 256 os níveis reduzidos no mutante. Já para a condição de tratamento com tunicamicina, foram observados 298 proteínas com os níveis diferentes do selvagem, sendo que 112 destas apresentavam os níveis aumentados e 186 os níveis reduzidos no mutante (Anexo 4).

Em seguida, foi realizada uma análise de ontologia genética (GO) separando-se os *hits up* e *down* para cada droga, de acordo com as classificações do banco de dados SGD de *S. cerevisiae*. 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 sua frequência no genoma. Porém, como a coleção GFP não apresenta todos os genes de *S. cerevisiae*, a frequência dos *hits* foi comparada com a frequência dos genes na coleção GFP. É importante mencionar que foi considerado que existia um enriquecimento de GO quando a frequência dos *hits* em um determinado processo biológico fosse maior do que a frequência dos genes de partida nesse processo.

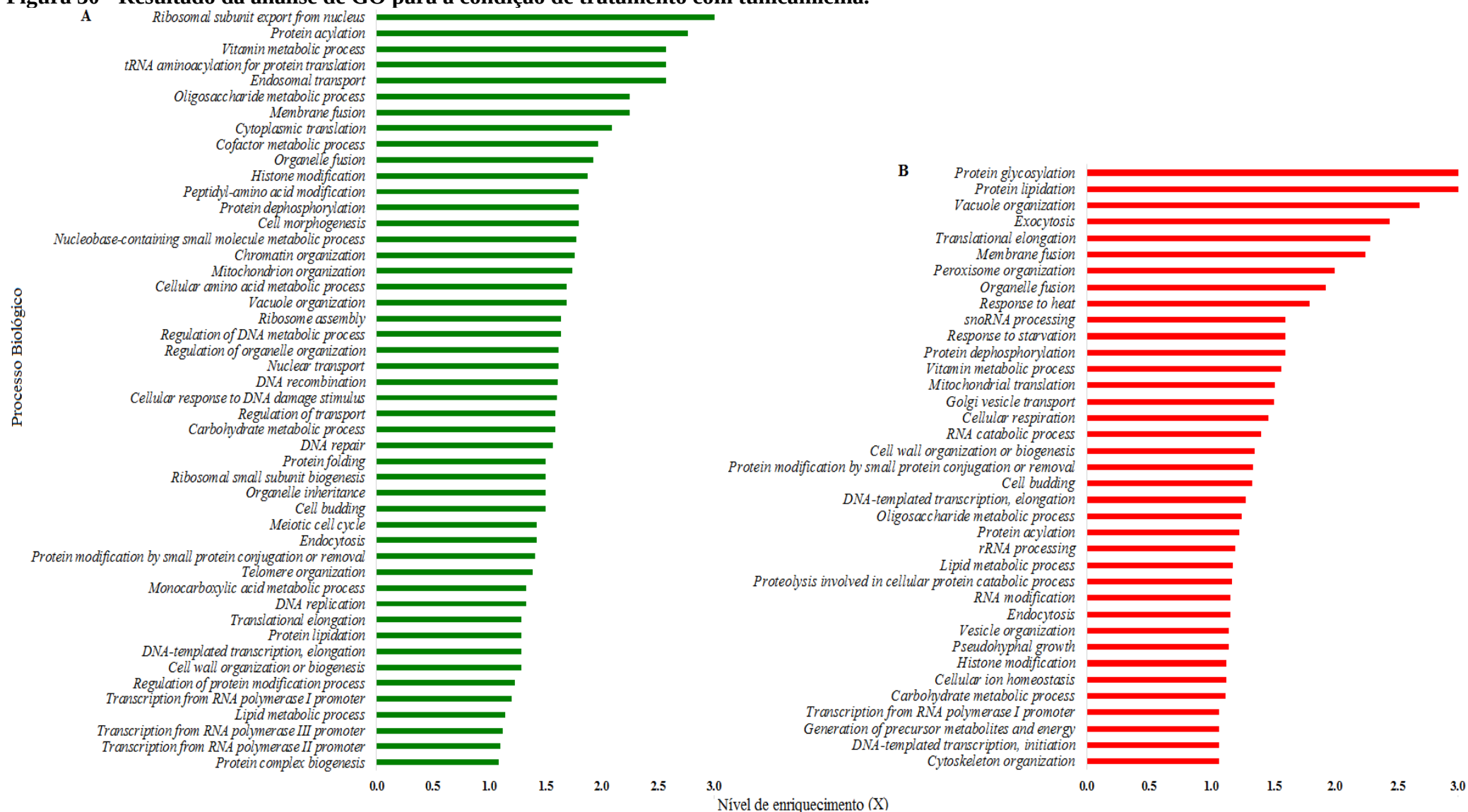
As Figuras 29 e 30 mostram os resultados obtidos com a análise de GO para os *hits* obtidos para o tratamento com DTT e tunicamicina, respectivamente. Como pode ser observado, em ambas condições de estudo existem enriquecimentos de GO para processos cujo envolvimento de eIF5A já foi descrito anteriormente, tais como: progressão do ciclo celular, organização do citoesqueleto de actina, tráfego vesicular/secreção e tradução (PARK *et al.*, 1993; PARK *et al.*, 1997; ZANELLI; VALENTINI, 2005; JAO; CHEN, 2006; ZANELLI *et al.*, 2006; FRIGIERI *et al.*, 2007; FRIGIERI *et al.*, 2008). Uma análise mais aprofundada dos genes presentes nessas categorias precisa ser realizada para o entendimento de como a mutação de eIF5A pode estar influenciando na diferença dos fenótipos.

Figura 29 - Resultado da análise de GO para a condição de tratamento com DTT.



Classificações feitas de acordo com o banco de dados SGD de *S. cerevisiae*. **(A)** Hits up do mutante em relação ao selvagem. **(B)** Hits down do mutante em relação ao selvagem. **Fonte:** elaborada pela autora.

Figura 30 - Resultado da análise de GO para a condição de tratamento com tunicamicina.



Classificações feitas de acordo com o banco de dados SGD de *S. cerevisiae*. **(A)** Hits up do mutante em relação ao selvagem. **(B)** Hits down do mutante em relação ao selvagem. **Fonte:** elaborada pela autora.

Para tentar explicar o fenótipo de resistência à tunicamicina e de sensibilidade ao DTT a partir dos resultados obtidos neste rastreamento, foram comparados os *hits down* para tratamento com tunicamicina e DTT com genes já descritos na literatura cujos nocautes geram resistência à tunicamicina ou sensibilidade a DTT (busca no SGD, na categoria *Phenotypes*, utilizando os termos "*resistance to tunicamycin: increased*" ou "*resistance to 1,4-dithiothreitol: decreased*"), respectivamente. Os resultados obtidos com essas comparações estão representados na Tabela 9.

Tabela 9 - Correspondências entre os genes descritos na literatura cujo nocaute gera resistência a tunicamicina ou sensibilidade a DTT com os *hits* desse trabalho.

ORF	Gene	Categoria do <i>hit</i> no perfil proteômico	Fenótipo associado ao nocaute do gene, na literatura
YJR145C	<i>RPS4a</i>	tunicamicina <i>down</i>	resistência a tunicamicina
YOR001W	<i>RRP6*</i>	tunicamicina <i>down</i>	resistência a tunicamicina
YPL047W	<i>SGF11</i>	tunicamicina <i>down</i>	resistência a tunicamicina
YGL195W	<i>GCN1*</i>	tunicamicina <i>down</i>	resistência a tunicamicina
YGL147C	<i>RPL9a*</i>	tunicamicina <i>down</i>	resistência a tunicamicina
YHR041C	<i>SRB2</i>	tunicamicina <i>down</i>	resistência a tunicamicina
YOR259C	<i>RPT4</i>	tunicamicina <i>down</i>	resistência a tunicamicina
YGR135W	<i>PRE9</i>	tunicamicina <i>down</i>	resistência a tunicamicina
YML072C	<i>TCB3</i>	tunicamicina <i>down</i>	resistência a tunicamicina
YNL025C	<i>SSN8</i>	DTT <i>down</i>	sensibilidade a DTT
YOL081W	<i>IRA2</i>	DTT <i>down</i>	sensibilidade a DTT
YAL047C	<i>SPC72</i>	DTT <i>down</i>	sensibilidade a DTT
YDR245W	<i>MNN10*</i>	DTT <i>down</i>	sensibilidade a DTT
YGR167W	<i>CLC1*</i>	DTT <i>down</i>	sensibilidade a DTT
YGR284C	<i>ERV29*</i>	DTT <i>down</i>	sensibilidade a DTT
YIL017C	<i>VID28</i>	DTT <i>down</i>	sensibilidade a DTT
YIL042C	<i>PKP1</i>	DTT <i>down</i>	sensibilidade a DTT
YIL065C	<i>FIS1</i>	DTT <i>down</i>	sensibilidade a DTT
YJL053W	<i>PEP8</i>	DTT <i>down</i>	sensibilidade a DTT
YLR025W	<i>SNF7*</i>	DTT <i>down</i>	sensibilidade a DTT

YLR447C	<i>VMA6</i>	DTT <i>down</i>	sensibilidade a DTT
YML121W	<i>GTR1</i>	DTT <i>down</i>	sensibilidade a DTT
YOL105C	<i>WSC3*</i>	DTT <i>down</i>	sensibilidade a DTT
YOR132W	<i>VPS17</i>	DTT <i>down</i>	sensibilidade a DTT

*Genes selecionados para futura confirmação por *western blot*. **Fonte:** elaborada pela autora.

Após essa comparação, foram encontradas 9 correspondências entre genes cujos nocautes levam a resistência à tunicamicina, sendo que desses, *RRP6*, *GCN1* e *RPL9A* foram escolhidos para serem confirmados por *western blot*, pois já foi demonstrado que mutantes de proteínas ribossomais e outras proteínas relacionadas com síntese de ribossomo e tradução de uma maneira geral levam a este fenótipo (KAPITZKY *et al.*, 2010; STEFFEN *et al.*, 2012; DELANEY *et al.*, 2013).

Já para os *hits down* de DTT, foram encontradas 15 correspondências com genes cujos nocautes geram sensibilidade a DTT, sendo que desses, *MNN10*, *ERV29*, *SNF7* e *WSC3*, foram escolhidos para serem, futuramente, confirmados por *western blot* por se tratarem de genes importantes para a resposta celular ao DTT. Como a interação genética entre eIF5A e *WSC3* já foi descrita (VALENTINI *et al.*, 2002; ZANELLI; VALENTINI, 2005), também serão analisados os genes *WSC2* e *MID2*, cuja função está relacionada com *WSC3* (RODICIO; HEINISCH, 2010).

Ainda, dentre os *hits down* obtidos nesse rastreamento com drogas, foram encontrados componentes do sistema de degradação associado ao RE (ERAD): *CDC48*, *HUL5*, *DFM1*, *RPT4*, *SHP1*. Os membros desse grupo foram escolhidos pois têm uma participação importante na resposta UPR (TRAVERS *et al.*, 2000; SCHUBERTH; BUCHBERGER, 2005; SATO; HAMPTON, 2006).

Em seguida, foi feita a investigação da presença dos *motifs* tripeptídicos associados à pausa dos ribossomos em células com depleção de eIF5A (SCHULLER *et al.*, 2017), dentre os *hits down* (mutante *hyp2-3* tratado em comparação com selvagem tratado). Para isso, foi feito um levantamento das proteínas que contêm os 29 principais *motifs* associados a pausa de ribossomos em células com depleção de eIF5A, totalizando 2.726 proteínas presentes na coleção GFP. Após a comparação dos *hits down* com essa lista de 2.726 proteínas, foi constatado que 170 das 256 proteínas *down* no tratamento com DTT e 130 das 186 proteínas *down* em tunicamicina apresentaram esses *motifs*. No entanto,

nenhum desses grupos apresentou enriquecimento estatisticamente significativo para algum *motif* devido a alta representatividade de proteínas com algum dos 29 *motifs* na coleção GFP. Portanto, uma análise mais precisa precisa ser feita para avaliar se de alguma forma esses *motifs* são responsáveis pela alteração nos níveis proteicos na comparação entre linhagem mutante *hyp2-3* e selvagem. Por exemplo, será feita uma nova análise dos dados obtidos em perfis ribossomais de depleção de eIF5A (SCHULLER *et al.*, 2017; PELECHANO; ALEPUZ, 2017) para determinar quais mRNAs devem estar menos traduzidos na ausência de eIF5A (busca pelos mRNAs a que pertencem as *reads* mais frequentemente protegidas pelo ribossomo, ou seja, aquelas envolvidas em eventos de *stalling*).

Por fim, é importante destacar ainda que um trabalho recente sugere que a presença de diferentes elementos de atenuação da elongação da tradução pode contribuir para o aumento de ligação de SRP a polirribossomos e seu direcionamento ao RE. Esses elementos de atenuação da elongação da tradução poderiam ser códons raros e *stalling motifs*, como sequências ricas em amino ácidos carregados positivamente ou ricas em prolina (CHARTRON *et al.*, 2016). Uma vez que esta observação pode estar correlacionada com a influência da função de eIF5A para a tradução associada ao RE, nosso laboratório estabeleceu colaboração com a Dra. Judith Frydman no intuito de entender melhor o impacto de eIF5A na tradução de mRNAs associados a RE ou a SRP, através de perfil ribossomal (estágio BEPE de doutorado da aluna Natália Barbosa).

4.3.4. Avaliação da ocorrência de pré-ativação de UPR em *Saccharomyces cerevisiae*

Um estudo recente realizado em células HeLa sugeriu uma ativação da UPR (aumento de ATF4 e seu efector *downstream* CHOP; aumento de fosfo-IRE1; aumento de ATF6-p50) e aumento na expressão de chaperonas (HSPD1; HSP90B1; HSPA5/GRP78/BiP, homólogo de Kar2; HSPA1B, homólogo de Ssa3-4; homólogo de Hsp60; P4HB, homólogo de Pdi1; calreticulina, homólogo de Cne1; calnexina, homólogo de Cne1) mediante a depleção de eIF5A (induzida por shRNA) sem a indução de estresse de RE (MANDAL *et al.*, 2016). Desta forma, tornou-se necessária a investigação da existência de uma ativação prévia de UPR no mutante de eIF5A em *S. cerevisiae*. Uma ativação da UPR prévia à indução do estresse de RE no mutante de eIF5A ajudaria a explicar o fenótipo de resistência à tunicamicina, considerando que a ativação constitutiva

da sinalização da UPR pode levar a uma maior resistência ao estresse de RE induzido farmacologicamente (LABUNSKYY *et al.*, 2014).

Para isso, foi realizada a análise dos níveis proteicos do mutante *hyp2-3* em comparação ao selvagem na condição controle, ou seja, sem a indução do estresse de RE, em que foram observadas 869 proteínas com níveis distintos entre o mutante e o selvagem, sendo 448 *hits up* e 421 *hits down*. Dentre essas proteínas *hits up* no mutante, 19 correspondem a alvos de Hac1, de um total de 137 proteínas alvos de Hac1 presentes na coleção GFP, valor este que não é estatisticamente significativo de acordo com o teste de Qui Quadrado a um valor de 5% de significância. Além disso, também foi realizada uma busca por esses genes ativados por Hac1 dentre os *hits up* provenientes de duas análises de perfil transcricional realizados previamente no laboratório: a) perfil transcricional gerado por RNA-seq do mutante *dys1-1* (deficiente em eIF5A hipusinado) b) perfil transcricional gerado por análises de *microarray* do mutante *hyp2-1*. Também nestes perfis transcricionais não foi observado um enriquecimento para alvos de Hac1.

Além do mais, também não foram encontrados indícios de pré-ativação de UPR nos experimentos de qPCR: não foi observado um aumento significativo na taxa de *splicing* do mutante em relação ao selvagem na condição sem tratamento com DTT (vide Figura 14); ou no experimento de RT-PCR: não foi observada uma banda considerável para o mRNA de *HAC1* maduro em comparação ao imaturo no mutante *hyp2-3* na ausência de tratamento (vide Figura 16). Somado a isso, já é bem descrito que mutantes que levam à pré-ativação de UPR em *S. cerevisiae*, como por exemplo, mutantes de Kar2, apresentam letalidade sintética com nocautes de Ire1 e/ou Hac1 (KIMATA *et al.*, 2003; SCHULDINER *et al.*, 2005), o que não é observado para eIF5A.

Sendo assim, não foi verificada a ocorrência de uma pré-ativação de UPR em mutantes de eIF5A em *S. cerevisiae*, como ocorre em mamíferos. Uma possível explicação para a existência de uma pré-ativação de UPR em células de mamíferos com depleção de eIF5A é que, em eucariotos superiores, a resposta a UPR é muito mais complexa e tem uma ação mais direta sobre o controle da tradução do que em *S. cerevisiae*.

5. CONCLUSÕES

Os dados preliminares que sugeriam um papel para eIF5A na maturação do mRNA de *HAC1* não foram confirmados.

Os resultados apresentados mostraram um comportamento diferencial de mutantes de eIF5A com relação a diferentes indutores de estresses de RE e que estas respostas não estão diretamente relacionadas com a translocação co-traducional de proteínas mediada por SRP ou a um possível defeito geral na elongação da tradução de mutantes de eIF5A.

A supressão do fenótipo de sensibilidade a tunicamicina dos nocautes de *Hac1* ou *Ire1* promovida pela inativação parcial da função de eIF5A na célula é independente de *Hac1* ou *Ire1*.

Os resultados obtidos no rastreamento em larga escala de sensibilidade a drogas indutoras de estresse de RE (DTT e tunicamicina) possibilitaram a indicação de uma série de proteínas cuja tradução pode estar comprometida em mutantes de eIF5A, o que explicaria o fenótipo de sensibilidade a DTT e resistência a tunicamicina observados nesses mutantes.

Não foi verificada a ocorrência de uma pré-ativação de UPR em mutantes de eIF5A em *S. cerevisiae*, como ocorre em mamíferos.

REFERÊNCIAS

- AMBERG, D. **Methods in yeast genetics**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2005. 230 p.
- ASHBURNER, M. *et al.* Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. **Nat Genet**, v. 25, n. 1, p. 25-9, May 2000. ISSN 1061-4036 (Print)1061-4036. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/75556> >.
- AUSUBEL, F. **Current Protocols in Molecular Biology**. 2004.
- BARBOSA, N. M. *et al.* Mapping surface residues of eIF5A that are important for binding to the ribosome using alanine scanning mutagenesis. **Amino Acids**, v. 48, n. 10, p. 2363-74, Oct 2016. ISSN 0939-4451. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00726-016-2279-z> >.
- BARYSHNIKOVA, A. *et al.* Synthetic genetic array (SGA) analysis in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. **Methods Enzymol**, v. 470, p. 145-79, 2010. ISSN 0076-6879. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/s0076-6879\(10\)70007-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0076-6879(10)70007-0) >.
- _____. Quantitative analysis of fitness and genetic interactions in yeast on a genome scale. **Nat Methods**, v. 7, n. 12, p. 1017-24, Dec 2010. ISSN 1548-7091. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1534> >.
- BENNE, R.; HERSHEY, J. W. B. MECHANISM OF ACTION OF PROTEIN-SYNTHESIS INITIATION-FACTORS FROM RABBIT RETICULOCYTES. **Journal of Biological Chemistry**, v. 253, n. 9, p. 3078-3087, 1978. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1978EY67400030 >.
- BICKNELL, A. A. *et al.* A novel role in cytokinesis reveals a housekeeping function for the unfolded protein response. **J Cell Biol**, v. 177, n. 6, p. 1017-27, Jun 18 2007. ISSN 0021-9525 (Print)0021-9525. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200702101> >.
- BLAHA, G.; STANLEY, R. E.; STEITZ, T. A. Formation of the first peptide bond: the structure of EF-P bound to the 70S ribosome. **Science**, v. 325, n. 5943, p. 966-70, Aug 21 2009. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19696344 >.
- BREKER, M.; SCHULDINER, M. The emergence of proteome-wide technologies: systematic analysis of proteins comes of age. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 15, n. 7, p. 453-64, Jul 2014. ISSN 1471-0080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24938631> >.
- BROWN, N. A. *et al.* Transcriptional profiling of Brazilian *Saccharomyces cerevisiae* strains selected for semi-continuous fermentation of sugarcane must. **FEMS Yeast Res**, v. 13, n. 3, p. 277-90, May 2013. ISSN 1567-1356. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/1567-1364.12031> >.

BULLWINKLE, T. J. *et al.* (R)- β -lysine modified elongation factor P functions in translation elongation. **J Biol Chem**, Dec 2012. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23277358> >.

CALFON, M. *et al.* IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. **Nature**, v. 415, n. 6867, p. 92-6, Jan 03 2002. ISSN 0028-0836 (Print)0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/415092a> >.

CHARTRON, J. W.; HUNT, K. C.; FRYDMAN, J. Cotranslational signal-independent SRP preloading during membrane targeting. **Nature**, v. 536, n. 7615, p. 224-8, Aug 11 2016. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nature19309> >.

CHEN, K. Y.; LIU, A. Y. C. Biochemistry and function of hypusine formation on eukaryotic initiation factor 5A. **Biological Signals**, v. 6, n. 3, p. 105-109, May-Jun 1997. ISSN 1016-0922. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1997XV33100001 >.

CLEVELAND, W. S. Robust Locally Weighted Regression and Smoothing Scatterplot. **Journal of the American Statistical Association**, v. 74, n. 368, p. pp. 829-836, 1979. Disponível em: < http://www.stat.washington.edu/courses/stat527/s13/readings/Cleveland_JASA_1979.pdf >.

COX, J. S.; SHAMU, C. E.; WALTER, P. Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. **Cell**, v. 73, n. 6, p. 1197-206, Jun 18 1993. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674.

CUI, H. J. *et al.* PMT1 deficiency enhances basal UPR activity and extends replicative lifespan of *Saccharomyces cerevisiae*. **Age (Dordr)**, v. 37, n. 3, p. 9788, Jun 2015. ISSN 0161-9152. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11357-015-9788-7> >.

DELANEY, J. R. *et al.* Stress profiling of longevity mutants identifies Afg3 as a mitochondrial determinant of cytoplasmic mRNA translation and aging. **Aging Cell**, v. 12, n. 1, p. 156-66, Feb 2013. ISSN 1474-9718. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/accel.12032> >.

DEVER, T. E.; GREEN, R. The elongation, termination, and recycling phases of translation in eukaryotes. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 4, n. 7, p. a013706, Jul 01 2012. ISSN 1943-0264. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a013706> >.

DI SANTO, R.; ABOULHOUDA, S.; WEINBERG, D. E. The fail-safe mechanism of post-transcriptional silencing of unspliced HAC1 mRNA. **Elife**, v. 5, Oct 01 2016. ISSN 2050-084x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.20069> >.

DIAS, C. A. *et al.* Structural modeling and mutational analysis of yeast eukaryotic translation initiation factor 5A reveal new critical residues and reinforce its involvement in protein synthesis. **Febs j**, v. 275, n. 8, p. 1874-88, Apr 2008. ISSN 1742-464X (Print)1742-464x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06345.x> >.

DIAS, C. A. O. *et al.* eIF5A interacts functionally with eEF2. **Amino Acids**, v. 42, n. 2-3, p. 697-702, FEB 2012 2012.

DOERFEL, L. K. *et al.* EF-P is essential for rapid synthesis of proteins containing consecutive proline residues. **Science**, v. 339, n. 6115, p. 85-8, Jan 2013. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23239624> >.

ELIZALDE, M. *et al.* Splicing regulator SLU7 is essential for maintaining liver homeostasis. **J Clin Invest**, v. 124, n. 7, p. 2909-20, Jul 2014. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1172/jci74382> >.

FRIGIERI, M. C. *et al.* Synthetic lethality between eIF5A and Ypt1 reveals a connection between translation and the secretory pathway in yeast. **Mol Genet Genomics**, v. 280, n. 3, p. 211-21, Sep 2008. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18568365 >.

_____. Use of a synthetic lethal screen to identify genes related to TIF51A in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genet Mol Res**, v. 6, n. 1, p. 152-65, 2007. ISSN 1676-5680 (Electronic).

FUJIMURA, K. *et al.* Eukaryotic Translation Initiation Factor 5A (EIF5A) Regulates Pancreatic Cancer Metastasis by Modulating RhoA and Rho-associated Kinase (ROCK) Protein Expression Levels. **J Biol Chem**, v. 290, n. 50, p. 29907-19, Dec 11 2015. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M115.687418> >.

GALVAO, F. C. *et al.* The deoxyhypusine synthase mutant dys1-1 reveals the association of eIF5A and Asc1 with cell wall integrity. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e60140, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0060140> >.

GANOZA, M. C.; KIEL, M. C.; AOKI, H. Evolutionary conservation of reactions in translation. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 66, n. 3, p. 460-85, table of contents, Sep 2002. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12209000 >.

GLICK, B. R.; GANOZA, M. C. Identification of a soluble protein that stimulates peptide bond synthesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 72, n. 11, p. 4257-60, Nov 1975. ISSN 0027-8424 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1105576 >.

GREGIO, A. P. *et al.* eIF5A has a function in the elongation step of translation in yeast. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 380, n. 4, p. 785-90, Mar 20 2009. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19338753 >.

GUARENTE, L. Synthetic enhancement in gene Interaction - A Genetic tool come of age. **Trends in Genetics**, v. 9, n. 10, p. 362-366, Oct 1993. ISSN 0168-9525. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1993LZ86600010 >.

GUTHRIE, C.; FINK, G. R. E. **Guide to Yeast Genetics**. New York: Academic Press, 1991.

GUTIERREZ, E. *et al.* eIF5A Promotes Translation of Polyproline Motifs. **Mol Cell**, May 2013. ISSN 1097-4164. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23727016> >.

HUH, W. K. *et al.* Global analysis of protein localization in budding yeast. **Nature**, v. 425, n. 6959, p. 686-91, Oct 16 2003. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nature02026> >.

JAO, D. L.; CHEN, K. Y. Tandem affinity purification revealed the hypusine-dependent binding of eukaryotic initiation factor 5A to the translating 80S ribosomal complex. **J Cell Biochem**, v. 97, n. 3, p. 583-98, Feb 15 2006. ISSN 0730-2312 (Print)0730-2312. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.20658> >.

KAINTH, P. *et al.* Comprehensive genetic analysis of transcription factor pathways using a dual reporter gene system in budding yeast. **Methods**, v. 48, n. 3, p. 258-64, Jul 2009. ISSN 1046-2023. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.02.015> >.

KANG, H. A.; HERSHEY, J. W. B. EFFECT OF INITIATION-FACTOR EIF-5A DEPLETION ON PROTEIN-SYNTHESIS AND PROLIFERATION OF SACCHAROMYCES-CEREVISIAE. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 6, p. 3934-3940, Feb 11 1994. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1994MW98900008 >.

KAPITZKY, L. *et al.* Cross-species chemogenomic profiling reveals evolutionarily conserved drug mode of action. In: (Ed.). **Mol Syst Biol**, v.6, 2010. p.451. ISBN 1744-4292 (Electronic).

KIMATA, Y. *et al.* Two regulatory steps of ER-stress sensor Ire1 involving its cluster formation and interaction with unfolded proteins. **J Cell Biol**, v. 179, n. 1, p. 75-86, Oct 08 2007. ISSN 0021-9525 (Print)0021-9525. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200704166> >.

_____. Yeast unfolded protein response pathway regulates expression of genes for anti-oxidative stress and for cell surface proteins. **Genes Cells**, v. 11, n. 1, p. 59-69, Jan 2006. ISSN 1356-9597 (Print)1356-9597. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2443.2005.00921.x> >.

_____. Genetic evidence for a role of BiP/Kar2 that regulates Ire1 in response to accumulation of unfolded proteins. **Mol Biol Cell**, v. 14, n. 6, p. 2559-69, Jun 2003. ISSN 1059-1524 (Print)1059-1524. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E02-11-0708> >.

KLIER, H. *et al.* DETERMINATION AND MUTATIONAL ANALYSIS OF THE PHOSPHORYLATION SITE IN THE HYPUSINE-CONTAINING PROTEIN HYP2P. **Febs Letters**, v. 334, n. 3, p. 360-364, Nov 22 1993. ISSN 0014-5793. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1993MH65000025 >.

KORENNYKH, A. V. *et al.* The unfolded protein response signals through high-order assembly of Ire1. **Nature**, v. 457, n. 7230, p. 687-93, Feb 05 2009. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nature07661> >.

LABUNSKYY, V. M. *et al.* Lifespan extension conferred by endoplasmic reticulum secretory pathway deficiency requires induction of the unfolded protein response. **PLoS Genet**, v. 10, n. 1, p. e1004019, Jan 2014. ISSN 1553-7390. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1004019> >.

MAGDOLEN, V. *et al.* THE FUNCTION OF THE HYPUSINE-CONTAINING PROTEINS OF YEAST AND OTHER EUKARYOTES IS WELL CONSERVED. **Molecular & General Genetics**, v. 244, n. 6, p. 646-652, Sep 28 1994. ISSN 0026-8925. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1994PL42500010 >.

MANDAL, A.; MANDAL, S.; PARK, M. H. Global quantitative proteomics reveal up-regulation of endoplasmic reticulum stress response proteins upon depletion of eIF5A in HeLa cells. **Sci Rep**, v. 6, p. 25795, May 16 2016. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/srep25795> >.

MARRA, M. *et al.* Anticancer drugs and hyperthermia enhance cytotoxicity induced by polyamine enzymatic oxidation products. **Amino Acids**, v. 33, n. 2, p. 273-81, Aug 2007. ISSN 0939-4451. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00726-007-0536-x> >.

MATEYAK, M. K.; KINZY, T. G. Breaking the Silos of Protein Synthesis. **Trends Biochem Sci**, v. 42, n. 8, p. 587-588, Aug 2017. ISSN 0968-0004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28669455> >.

MATHEWS, M. B.; HERSHEY, J. W. The translation factor eIF5A and human cancer. **Biochim Biophys Acta**, v. 1849, n. 7, p. 836-44, Jul 2015. ISSN 0006-3002 (Print)0006-3002. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagr.2015.05.002> >.

MORI, K. *et al.* A transmembrane protein with a cdc2+/CDC28-related kinase activity is required for signaling from the ER to the nucleus. **Cell**, v. 74, n. 4, p. 743-56, Aug 27 1993. ISSN 0092-8674 (Print)0092-8674. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MÉMIN, E. *et al.* Blocking eIF5A modification in cervical cancer cells alters the expression of cancer-related genes and suppresses cell proliferation. **Cancer Res**, v. 74, n. 2, p. 552-62, Jan 2014. ISSN 1538-7445. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24220243> >.

NAKANISHI, S.; CLEVELAND, J. L. Targeting the polyamine-hypusine circuit for the prevention and treatment of cancer. **Amino Acids**, v. 48, n. 10, p. 2353-62, Oct 2016. ISSN 0939-4451. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00726-016-2275-3> >.

NEWMAN, J. R. *et al.* Single-cell proteomic analysis of *S. cerevisiae* reveals the architecture of biological noise. **Nature**, v. 441, n. 7095, p. 840-6, Jun 15 2006. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nature04785> >.

NICCHITTA, C. V. Cell biology: How to combat stress. **Nature**, v. 457, n. 7230, p. 668-9, Feb 2009. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19194438> >.

OLSEN, G. J.; WOESE, C. R. Archaeal genomics: An overview. **Cell**, v. 89, n. 7, p. 991-994, Jun 27 1997. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1997XG83000001 >.

OLSEN, M. E.; CONNOR, J. H. Hypusination of eIF5A as a Target for Antiviral Therapy. **DNA Cell Biol**, v. 36, n. 3, p. 198-201, Mar 2017. ISSN 1044-5498. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1089/dna.2016.3611> >.

ORTIZ, P. A.; KINZY, T. G. Dominant-negative mutant phenotypes and the regulation of translation elongation factor 2 levels in yeast. **Nucleic Acids Res**, v. 33, n. 18, p. 5740-8, 2005. ISSN 0305-1048. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gki882> >.

OSLOWSKI, C. M.; URANO, F. Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system. **Methods Enzymol**, v. 490, p. 71-92, 2011. ISSN 0076-6879. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-385114-7.00004-0> >.

OUZOUNIS, C. A.; KYRPIDES, N. C. The core histone fold: Limits to functional versatility. **Journal of Molecular Evolution**, v. 43, n. 6, p. 541-542, Dec 1996. ISSN 0022-2844. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1996WB04900001 >.

PARK, M. H. The post-translational synthesis of a polyamine-derived amino acid, hypusine, in the eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A). **J Biochem**, v. 139, n. 2, p. 161-9, Feb 2006. ISSN 0021-924X (Print)0021-924x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/jb/mvj034> >.

PARK, M. H.; LEE, Y. B.; JOE, Y. A. Hypusine is essential for eukaryotic cell proliferation. **Biological Signals**, v. 6, n. 3, p. 115-123, May-Jun 1997. ISSN 1016-0922. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1997XV33100003 >.

PARK, M. H. *et al.* Functional significance of eIF5A and its hypusine modification in eukaryotes. **Amino Acids**, v. 38, n. 2, p. 491-500, Feb 2010. ISSN 0939-4451. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000274384100015 >.

PARK, M. H.; WOLFF, E. C.; FOLK, J. E. HYPUSINE - ITS POSTTRANSLATIONAL FORMATION IN EUKARYOTIC INITIATION FACTOR-5A AND ITS POTENTIAL ROLE IN CELLULAR-REGULATION. **Biofactors**, v. 4, n. 2, p. 95-104, May 1993. ISSN 0951-6433. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1993LG27300004 >.

PELECHANO, V.; ALEPUZ, P. eIF5A facilitates translation termination globally and promotes the elongation of many non polyproline-specific tripeptide sequences. In: (Ed.). **Nucleic Acids Res**, v.45, 2017. p.7326-38. ISBN 0305-1048 (Print)1362-4962 (Electronic).

PLUQUET, O.; POURTIER, A.; ABBADIE, C. The unfolded protein response and cellular senescence. A review in the theme: cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 308, n. 6, p. C415-25, Mar 15 2015. ISSN 0363-6143. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00334.2014> >.

PRINZ, W. A. *et al.* Mutants affecting the structure of the cortical endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Cell Biol**, v. 150, n. 3, p. 461-74, Aug 07 2000. ISSN 0021-9525 (Print)0021-9525. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

RODICIO, R.; HEINISCH, J. J. Together we are strong--cell wall integrity sensors in yeasts. **Yeast**, v. 27, n. 8, p. 531-40, Aug 2010. ISSN 0749-503x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/yea.1785> >.

ROSSI, D. *et al.* eIF5A has a function in the cotranslational translocation of proteins into the ER. **Amino Acids**, v. 46, n. 3, p. 645-53, Mar 2014. ISSN 0939-4451. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00726-013-1618-6> >.

_____. eIF5A and EF-P: two unique translation factors are now traveling the same road. **Wiley Interdiscip Rev RNA**, v. 5, n. 2, p. 209-22, 2014 Mar-Apr 2014. ISSN 1757-7012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24402910> >.

SATO, B. K.; HAMPTON, R. Y. Yeast Derlin Dfm1 interacts with Cdc48 and functions in ER homeostasis. **Yeast**, v. 23, n. 14-15, p. 1053-64, Oct-Nov 2006. ISSN 0749-503X (Print)0749-503x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/yea.1407> >.

SCHNIER, J. *et al.* TRANSLATION INITIATION-FACTOR 5A AND ITS HYPUSINE MODIFICATION ARE ESSENTIAL FOR CELL VIABILITY IN THE YEAST *SACCHAROMYCES-CEREVISIAE*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 11, n. 6, p. 3105-3114, Jun 1991. ISSN 0270-7306. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1991FM85200022 >.

SCHUBERTH, C.; BUCHBERGER, A. Membrane-bound Ubx2 recruits Cdc48 to ubiquitin ligases and their substrates to ensure efficient ER-associated protein degradation. In: (Ed.). **Nat Cell Biol**. England, v.7, 2005. p.999-1006. ISBN 1465-7392 (Print)1465-7392 (Linking).

SCHULDINER, M. *et al.* Exploration of the function and organization of the yeast early secretory pathway through an epistatic miniarray profile. **Cell**, v. 123, n. 3, p. 507-19, Nov 04 2005. ISSN 0092-8674 (Print)0092-8674. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.031> >.

SCHULLER, A. P. *et al.* eIF5A Functions Globally in Translation Elongation and Termination. **Mol Cell**, v. 66, n. 2, p. 194-205.e5, Apr 20 2017. ISSN 1097-2765. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2017.03.003> >.

SCHWELBERGER, H. G.; KANG, H. A.; HERSHEY, J. W. 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**, v. 268, n. 19, p. 14018-25, Jul 5 1993. ISSN 0021-9258 (Print).

SEGEV, N. Ypt and Rab GTPases: insight into functions through novel interactions. **Curr Opin Cell Biol**, v. 13, n. 4, p. 500-11, Aug 2001. ISSN 0955-0674 (Print)0955-0674. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SMITH, J. S.; BURKE, D. J. **Yeast Genetics : Methods and Protocols**. University of Virginia School of Medicine, Charlottesville VA USA: Springer Protocols. 1205 2014.

SMYTH, G. K.; SPEED, T. Normalization of cDNA microarray data. **Methods**, v. 31, n. 4, p. 265-73, Dec 2003. ISSN 1046-2023 (Print)1046-2023. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

STEFFEN, K. K. *et al.* Ribosome deficiency protects against ER stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 191, n. 1, p. 107-18, May 2012. ISSN 0016-6731. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1534/genetics.111.136549> >.

STRACK, R. L. *et al.* A rapidly maturing far-red derivative of DsRed-Express2 for whole-cell labeling. **Biochemistry**, v. 48, n. 35, p. 8279-81, Sep 2009. ISSN 1520-4995. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19658435> >.

STRNADEL, J. *et al.* eIF5A-PEAK1 Signaling Regulates YAP1/TAZ Protein Expression and Pancreatic Cancer Cell Growth. **Cancer Res**, v. 77, n. 8, p. 1997-2007, Apr 15 2017. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-16-2594> >.

TKACH, J. M. *et al.* Dissecting DNA damage response pathways by analysing protein localization and abundance changes during DNA replication stress. **Nat Cell Biol**, v. 14, n. 9, p. 966-76, Sep 2012. ISSN 1476-4679. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22842922> >.

TONG, A. H.; BOONE, C. **Yeast Gene Analysis – Methods in Microbiology**. Elsevier Ltd, 2007.

TONG, A. H. *et al.* Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants. **Science**, v. 294, n. 5550, p. 2364-8, Dec 14 2001. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11743205 >.

TRAVERS, K. J. *et al.* Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. **Cell**, v. 101, n. 3, p. 249-58, Apr 28 2000. ISSN 0092-8674 (Print)0092-8674. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

UDE, S. *et al.* Translation elongation factor EF-P alleviates ribosome stalling at polyproline stretches. **Science**, v. 339, n. 6115, p. 82-5, Jan 2013. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23239623> >.

VALENTINI, S. R. *et al.* Genetic interactions of yeast eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) reveal connections to poly(A)-binding protein and protein kinase C signaling. **Genetics**, v. 160, n. 2, p. 393-405, Feb 2002. ISSN 0016-6731 (Print).

VAN ANKEN, E. *et al.* Specificity in endoplasmic reticulum-stress signaling in yeast entails a step-wise engagement of HAC1 mRNA to clusters of the stress sensor Ire1. **Elife**, v. 3, p. e05031, Dec 30 2014. ISSN 2050-084x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.05031> >.

WAGIH, O. *et al.* SGAtools: one-stop analysis and visualization of array-based genetic interaction screens. **Nucleic Acids Res**, v. 41, n. Web Server issue, p. W591-6, Jul 2013. ISSN 0305-1048. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkt400> >.

WALTER, P.; RON, D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. **Science**, v. 334, n. 6059, p. 1081-6, Nov 25 2011. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1126/science.1209038> >.

WOHL, T. *et al.* 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. **Molecular & General Genetics**, v. 241, n. 3-4, p. 305-311, Nov 1993. ISSN 0026-8925. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1993ME53200008 >.

YOSHIDA, H. *et al.* XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. **Cell**, v. 107, n. 7, p. 881-91, Dec 28 2001. ISSN 0092-8674 (Print)0092-8674. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

_____. ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. **Mol Cell Biol**, v. 20, n. 18, p. 6755-67, Sep 2000. ISSN 0270-7306 (Print)0270-7306. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

_____. Endoplasmic reticulum stress-induced formation of transcription factor complex ERSF including NF-Y (CBF) and activating transcription factors 6alpha and 6beta that activates the mammalian unfolded protein response. **Mol Cell Biol**, v. 21, n. 4, p. 1239-48, Feb 2001. ISSN 0270-7306 (Print)0270-7306. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/mcb.21.4.1239-1248.2001> >.

ZANELLI, C. F. *et al.* eIF5A binds to translational machinery components and affects translation in yeast. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 348, n. 4, p. 1358-66, Oct 6 2006. ISSN 0006-291X (Print).

ZANELLI, C. F.; VALENTINI, S. R. Pkc1 acts through Zds1 and Gic1 to suppress growth and cell polarity defects of a yeast eIF5A mutant. **Genetics**, v. 171, n. 4, p. 1571-81, Dec 2005. ISSN 0016-6731 (Print).

ZUK, D.; JACOBSON, A. A single amino acid substitution in yeast eIF-5A results in mRNA stabilization. **Embo j**, v. 17, n. 10, p. 2914-25, May 15 1998. ISSN 0261-4189 (Print)0261-4189. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/17.10.2914> >.

ANEXO1

Lista de genes que representa o perfil transcricional de ativação de UPR (TRAVERS *et al.* 2000; KIMATA *et al.* 2006) presentes na coleção GFP.

YKL019W	YGL137W	YJR117W	YOR129C
YCL030C	YJR041C	YLL028W	YFL062W
YDR528W	YBL051C	YPR079W	YDR453C
YGL250W	YDR411C	YDR098C	YER068W
YJR009C	YKL022C	YLR413W	YAL023C
YIL068C	YML108W	YCL044C	YGL253W
YBR095C	YMR149W	YMR153W	YGR028W
YOR131C	YMR112C	YNL142W	YHR175W
YMR078C	YDR047W	YDR503C	YLR187W
YJL154C	YNR026C	YLR095C	YOL031C
YOR236W	YOL055C	YDR400W	YER003C
YBR261C	YMR308C	YCR067C	YMR079W
YAL007C	YDL212W	YML012W	YJR113C
YOL108C	YKL024C	YHR114W	YHR123W
YKL165C	YGL023C	YBR093C	YBR235W
YOR099W	YOL057W	YGR271W	YHR072W
YER156C	YHR003C	YJR073C	YMR058W
YDR093W	YHR098C	YKL096W	YLR199C
YML114C	YHR102W	YKL173W	YDR437W
YNL108C	YOR288C	YBR264C	YLR335W
YLR380W	YMR296C	YML028W	YJL091C
YDL189W	YOR239W	YGL222C	YHR129C
YFR044C	YIL109C	YCR048W	YKR021W
YDL236W	YMR163C	YBR092C	YOR172W
YKL073W	YBR223C	YML079W	YDR384C
YBL105C	YFR041C	YLR354C	YOL030W

YGL127C	YGR244C	YLR188W	YJL074C
YIL156W	YAR002C-A	YGR008C	YDL160C
YAL017W	YHL032C	YNL036W	YLR450W
YOR344C	YER027C	YPL141C	YBR245C
YOR251C	YBR162W-A	YKL204W	YNR027W
YLR430W	YMR184W	YDR069C	YLR120C
YGR163W	YGL200C	YGL043W	YML029W
YMR070W	YDR044W	YLR113W	YOR188W
YBR166C	YDR320C	YBR176W	YBL014C
YAL043C	YDR405W	YBR135W	YCR088W
YNL245C	YBR233W	YDR217C	YLR240W
YDL203C	YNR075W	YBR272C	YGL234W
YNL124W	YLR386W	YIL044C	YOR321W
YGR284C	YBL074C	YDL235C	YGR156W
YDL084W	YFR028C	YMR067C	YMR272C
YDR210W	YDL248W	YMR315W	YEL047C
YOL059W	YDR301W	YBR197C	YFR051C
YGR037C	YBL082C	YDL211C	YHR073W
YLR350W	YAL026C	YGR133W	YDL125C
YKL206C	YDL108W	YDR295C	YKR054C
YPL051W	YGL073W	YGL126W	YML055W
YAL014C	YGR161C	YML132W	YOR176W
YML102W	YNL271C	YIL108W	YHR043C
YMR225C	YDR073W	YGL128C	YPL085W
YEL002C	YNL015W	YML076C	YGL014W
YBR238C	YLL029W	YFL045C	YOR002W
YPL094C	YCR024C	YFL049W	YDR027C
YML013W	YNL049C	YOR324C	YBR067C
YDR182W	YML031W	YKL074C	YEL031W

YHR117W	YJL196C	YOR092W	YDL095W
YMR252C	YHR179W	YDR362C	YDL052C
YER017C	YJR089W	YER087C-A	YNL071W
YLR131C	YGL216W	YLR292C	YDR103W
YLR005W	YJR131W	YOR289W	YOR375C
YDR238C	YBR137W	YBL107C	YBR302C
YDL123W	YPL019C	YJL183W	YOL088C
YDR439W	YBL033C	YLR126C	YJR006W
YMR212C	YJL222W	YBR145W	YDL146W
YGR010W	YNL212W	YCR065W	YBL037W
YBR070C	YGR255C	YKL106W	YNL076W
YER147C	YBL008W	YFR021W	YBR171W
YHL028W	YJL062W	YMR281W	YEL022W
YGL022W	YKL105C	YLR423C	YOR085W
YDR540C	YDL124W	YLR424W	YER033C
YML074C	YIL002C	YPL008W	YGR015C
YKR027W	YHL048W	YDR519W	
YGR062C	YKL042W	YDR407C	

ANEXO 2

Proteínas com os níveis alterados no selvagem após o tratamento com DTT ou tunicamicina.

Tratamento com DTT

YDL119C	YJL030W	YML060W	YOL042W	YNR013C
YLL060C	YOR104W	YLR103C	YNL217W	YKL125W
YNL194C	YDR405W	YHR175W	YCL057W	YJR010C-A
YML027W	YKL146W	YLR263W	YGR283C	YLR181C
YML016C	YNL142W	YOR297C	YKL191W	YML056C
YLR017W	YBR055C	YKL095W	YBR119W	YDR226W
YLR154C	YOR187W	YKL047W	YKR022C	YML023C
YBR143C	YJL029C	YBR211C	YCL028W	YLR364W
YGR271C-A	YBR187W	YOR377W	YLR387C	YLR270W
YLR438C-A	YLR376C	YMR305C	YDR519W	YER088C
YMR166C	YOR346W	YKL108W	YDR288W	YOR034C
YDR005C	YNL153C	YBR070C	YIL077C	YDR076W
YBR025C	YBR159W	YPL254W	YDL128W	YPR057W
YDL046W	YGL226C-A	YER061C	YHR015W	YMR009W
YOL082W	YNL138W	YMR240C	YPL011C	YKR052C
YBR230C	YKR027W	YDL139C	YDR072C	YPR065W
YOR354C	YLR347C	YLR183C	YBR137W	YPL069C
YOL068C	YJL191W	YEL017C-A	YDR243C	YKL075C
YIL161W	YBR251W	YJR016C	YJR136C	YGR179C
YBL080C	YBR177C	YJL197W	YPR107C	YDR361C
YMR239C	YDL213C	YAR003W	YOL098C	YDL043C
YPL198W	YDR006C	YLR319C	YPL107W	YOR226C
YIL111W	YML094W	YDR297W	YOR355W	YIL015W
YLL039C	YGL004C	YGL254W	YGR071C	YGR093W

YFR041C	YMR268C	YDR040C	YDR511W	YMR124W
YDR231C	YDR299W	YOL102C	YJR119C	YDL090C
YLL038C	YGL099W	YDR434W	YJR053W	YBR253W
YKR036C	YBL097W	YGL010W	YIR018W	YLR144C
YER140W	YNL055C	YKL187C	YDR411C	YHR119W
YDR343C	YFR027W	YLR002C	YPL155C	YJL143W
YDR190C	YDL072C	YLL010C	YMR297W	YMR169C
YGL231C	YML008C	YKL105C	YDR090C	YOL017W
YMR308C	YBL033C	YPL010W	YBR242W	YDR469W
YIL035C	YPL018W	YBR158W	YLR390W-A	YPR104C
YHL036W	YPR105C	YKL212W	YBR194W	YNL278W
YJL065C	YJL011C	YPR001W	YGR157W	YKL051W
YGL200C	YOR026W	YJR057W	YDR451C	YBR235W
YFL029C	YLR401C	YHR112C	YPR131C	YCR090C
YER169W	YFR014C	YOR317W	YOR044W	YBR080C
YMR307W	YHR172W	YLR417W	YKR049C	YJL060W
YHR037W	YFL002C	YOL081W	YLR447C	YKL103C
YCR028C	YHR202W	YMR114C	YOR236W	YDR503C
YDL156W	YPL213W	YPL246C	YJR050W	YIL016W
YKL113C	YBR212W	YDR222W	YNL257C	YBR123C
YHR062C	YOL138C	YKR007W	YCL030C	YHL009C
YLR408C	YGR233C	YBR161W	YGR261C	YDR276C
YGR092W	YLR166C	YCR067C	YIL156W	YFL017C
YER134C	YCR024C-A	YBR236C	YAL029C	YBR102C
YBL034C	YDR183W	YDR194C	YER013W	YPL006W
YGR166W	YHR066W	YJR041C	YKL033W	YHR031C
YKL059C	YDR193W	YGL095C	YOR172W	YMR149W
YNL104C	YKL091C	YGR217W	YMR255W	YPL047W
YPR074C	YOR266W	YLR448W	YPR101W	YDR227W
YOR118W	YDR410C	YMR102C	YBL026W	YBL095W

YML131W	YPL219W	YFL006W	YNL042W	YLR168C
YML034W	YGL241W	YCR084C	YHR129C	YMR113W
YJR074W	YDR283C	YOR315W	YLR121C	YOR085W
YLR016C	YML001W	YPR033C	YBR109C	YBR061C
YML043C	YDL209C	YMR208W	YNL322C	YLR382C
YNL168C	YDR047W	YOR046C	YKL149C	YBR221C
YPR055W	YOR228C	YDL107W	YGR008C	YDR436W
YFL027C	YFL025C	YOR252W	YKR029C	YNL076W
YDR125C	YDR487C	YGL244W	YDR423C	YGL173C
YHR034C	YJL044C	YDL203C	YPL109C	YPR179C
YGL020C	YKR026C	YOR217W	YJR105W	YDR308C
YPL083C	YDR122W	YOR209C	YMR280C	YEL046C
YGL163C	YDR245W	YLR290C	YJL104W	YLR344W
YMR198W	YLR204W	YMR167W	YDR032C	YBR281C
YJL179W	YDR484W	YNR011C	YLR248W	YLR360W
YGR263C	YKL117W	YDR084C	YIL036W	YFR015C
YDR444W	YER052C	YAL060W	YKR103W	YNL234W
YLR045C	YGL019W	YBR132C	YOL124C	YBR179C
YDL105W	YHR190W	YJR096W	YNL254C	YMR257C
YKL078W	YKL077W	YNR018W	YPR143W	YGR112W
YLR332W	YLR005W	YLL061W	YBR057C	YNL172W
YGL157W	YDR414C	YGL083W	YOR363C	YOR040W
YLR090W	YHR069C	YLR188W	YDR039C	YOR245C
YOR073W	YJL186W	YKL074C	YMR192W	YKL208W
YKL081W	YNL113W	YER021W	YCR004C	YOR320C
YER176W	YML032C	YML058W	YGR062C	YMR153W
YDR213W	YOL151W	YER128W	YHR023W	YOL027C
YDR363W	YGR205W	YMR200W	YOL013C	YML104C
YER003C	YDR452W	YPL170W	YOR262W	YPL076W
YDR051C	YPR011C	YOL064C	YNL323W	YFR031C-A

YMR284W	YHR156C	YPR115W	YGL075C	YOL080C
YBR023C	YDR483W	YBR171W	YKR099W	YNR040W
YOL134C	YCR079W	YIL037C	YPR036W	YDR169C
YJL201W	YKL001C	YKR096W	YDL134C	YDR450W
YMR042W	YPL166W	YLR265C	YEL063C	YGR161C
YJL088W	YOL069W	YGR175C	YBL090W	YIL114C
YKR031C	YHR039C-A	YJR015W	YOR060C	YNL218W
YMR029C	YPR163C	YDR216W	YNL213C	YMR162C
YLL036C	YHR067W	YML125C	YBR120C	YNL139C
YPR003C	YGL076C	YBR176W	YLL052C	YER035W
YGL105W	YML109W	YMR043W	YFR052W	YPL068C
YCL014W	YNL148C	YIL026C	YOR285W	YPR071W
YLR094C	YBR233W-A	YLR427W	YJR149W	YGR116W
YBL098W	YDL219W	YKL110C	YDR044W	YBR056W
YOL136C	YEL038W	YBR208C	YER151C	YJL125C
YHR083W	YOR196C	YNL304W	YAL053W	YOR099W
YOR128C	YFR048W	YGL181W	YJL183W	YMR281W
YOL112W	YKL222C	YPR152C	YGL028C	YOR205C
YOR344C	YPR190C	YDL155W	YDR253C	YGL070C
YDR392W	YPL045W	YLR240W	YGL023C	YNL024C
YDR060W	YBR111C	YKR100C	YMR073C	YGL141W
YNL006W	YML018C	YGL098W	YJR084W	YMR115W
YIL005W	YMR287C	YMR310C	YPL139C	YKL165C
YCR053W	YLR258W	YGR091W	YDR465C	YLR430W
YPR161C	YNL073W	YJL084C	YIL112W	YML079W
YBL054W	YEL039C	YGL180W	YMR218C	YOR147W
YJR127C	YHR008C	YIL137C	YDR079C-A	YDR197W
YDR458C	YGL156W	YHR127W	YDL030W	YMR030W
YOL123W	YOR052C	YPL188W	YOR062C	YIR010W
YNL246W	YNL003C	YPL241C	YKR035W-A	YOL148C

YLL014W	YLR390W	YPL141C	YIR017C	YOR259C
YBR289W	YHR147C	YMR251W-A	YMR264W	YNL022C
YOR358W	YMR275C	YOR058C	YBR085C-A	YDR479C
YPL154C	YNL036W	YFL049W	YDL211C	YLL055W
YLR289W	YDR523C	YHR090C	YPR185W	YPL190C
YOR276W	YLL054C	YMR015C	YDR513W	YPL118W
YIL061C	YMR059W	YML005W	YGL255W	YMR164C
YLR215C	YDL180W	YOR279C	YDR474C	YNL058C
YLR356W	YGR185C	YGR209C	YGL001C	YGL202W
YGR085C	YER032W	YER048W-A	YKL162C	YBR042C
YGR177C	YAR002C-A	YGR106C	YDR111C	YHR045W
YDR409W	YIR037W	YBL056W	YDL051W	YHR144C
YNL255C	YNL312W	YOR293W	YDR204W	YDR096W
YNL223W	YGR030C	YIL070C	YDL192W	YBR166C
YDR357C	YLL031C	YGL249W	YNR029C	
YER157W	YNL201C	YBL027W	YOR349W	

Tratamento com tunicamicina

YLR369W	YOR254C	YMR037C	YPL075W	YIL161W
YMR157C	YPL058C	YHR090C	YBR215W	YPL018W
YDR361C	YIL053W	YFL027C	YDR456W	YOR304C-A
YCR002C	YMR263W	YPR073C	YNL040W	YPL263C
YGR239C	YOL080C	YKL085W	YOL022C	YGL219C
YLR292C	YHR008C	YPL141C	YOL093W	YDL156W
YPL139C	YDR457W	YER020W	YFL025C	YMR149W
YOR344C	YOL043C	YKL176C	YHL017W	YGR263C
YLR039C	YPL087W	YPR161C	YLR073C	YDR040C
YDR167W	YCR046C	YPL070W	YIL062C	YLR253W
YPL024W	YKL140W	YKR082W	YML032C	YBR065C
YNL198C	YJL065C	YOL044W	YDL170W	YPL133C
YDR357C	YMR135C	YDR474C	YLR383W	YOR226C
YER169W	YIR018W	YDR222W	YIL122W	YNL181W
YPR148C	YKR031C	YKL078W	YBR251W	YLR094C
YBR003W	YGR271C-A	YGL233W	YHR027C	YGR280C
YPL083C	YMR049C	YOR197W	YBR171W	YPL221W
YHL038C	YHL020C	YJL168C	YMR252C	YJL030W
YMR097C	YJL151C	YOL147C	YDR363W	YOL089C
YOR074C	YPL116W	YOL054W	YGL032C	YNR056C
YML034W	YMR153W	YDR508C	YLR397C	YLR145W
YDR020C	YLL060C	YNR013C	YOR205C	YJL190C
YPR074C	YGL059W	YKL149C	YPL219W	YLL007C
YKL222C	YOR248W	YPR180W	YER013W	YJL002C
YPL104W	YLR203C	YDL056W	YOR332W	YMR285C
YIL114C	YNL066W	YDR436W	YKR046C	YOR092W
YML006C	YOR060C	YMR308C	YCR009C	YFR046C
YOL125W	YKL110C	YKR063C	YDR266C	YJR121W
YIR005W	YLR332W	YER061C	YPL043W	YHR034C

YBR211C	YJR136C	YDR337W	YGL141W	YIL065C
YMR212C	YLR188W	YBL029W	YGR202C	YMR192W
YBL098W	YFR050C	YNR004W	YBR172C	YDR258C
YFL062W	YPR108W	YNL230C	YNL152W	YKL125W
YDL045C	YGL163C	YGL244W	YDR088C	YIL156W
YDR423C	YLR066W	YLR451W	YJR077C	YLR176C
YHR187W	YPR169W	YPL069C	YPL270W	YBR167C
YDL002C	YPL029W	YMR307W	YDL090C	YKL028W
YER038C	YIL154C	YOL062C	YGR001C	YCR090C
YCL055W	YER122C	YKR026C	YGR283C	YAR002W
YGR062C	YDL043C	YDL224C	YJR015W	YBR225W
YIR001C	YLR265C	YLR195C	YOL136C	YMR166C
YGL175C	YLR413W	YPL074W	YGL254W	YKL046C
YAL060W	YMR297W	YOL051W	YIR022W	YLR121C
YLR364W	YDR398W	YLL022C	YIL042C	YGR092W
YDR299W	YJR084W	YBL035C	YJR127C	YNL086W
YBL054W	YDR450W	YBR179C	YCL014W	YEL009C
YPR171W	YIL112W	YKL117W	YOR276W	YOL042W
YNL162W-A	YPL170W	YNL111C	YOL013C	YNL213C
YLR239C	YDR092W	YPL154C	YNL330C	YPR135W
YPR086W	YGL162W	YGL095C	YKL108W	YNR035C
YDR047W	YBL033C	YBR242W	YML079W	YDR385W
YJR010C-A	YGR044C	YKL033W	YPL155C	YDR407C
YGL040C	YOR228C	YMR244C-A	YPL181W	YKL075C
YIL036W	YNL221C	YKL208W	YFR017C	YNL095C
YMR110C	YJL061W	YMR162C	YDR245W	YNL051W
YLL031C	YGL140C	YLR417W	YKR079C	YMR201C
YOR118W	YPR143W	YDR478W	YKL007W	YDR517W
YDL072C	YIL092W	YER105C	YGL037C	YPL168W
YOR363C	YKL065C	YDR262W	YDL174C	YLL052C

YPL212C	YPL051W	YJL084C	YOR266W	YBR237W
YLR409C	YNL287W	YMR299C	YDR152W	YKL113C
YMR275C	YBR039W	YNL325C	YHR062C	YMR032W
YGL079W	YBL057C	YOL082W	YLR034C	YDL119C
YDR421W	YMR219W	YBR066C	YKL073W	YNR028W
YFR041C	YOR113W	YER171W	YGL240W	YMR111C
YDR493W	YOR052C	YFL048C	YOL045W	YLR143W
YBR200W	YMR271C	YDL175C	YDL160C	YNL083W
YBR118W	YDR213W	YGL023C	YDR283C	YFL047W
YLR126C	YDR452W	YER167W	YDR434W	YML112W
YMR129W	YDR231C	YJL148W	YHR179W	YNL148C
YHR097C	YFL007W	YNL267W	YKR035W-A	YNL304W
YJL066C	YLR387C	YBR254C	YOR209C	YPR186C
YJL125C	YLL038C	YPR134W	YPL118W	YKL213C
YDR345C	YBR152W	YHL009C	YPL002C	YLR327C
YJR119C	YFR048W	YBR068C	YKL077W	YNL286W
YDL130W-A	YDR503C	YHR057C	YLR080W	YIL026C
YOR034C	YML028W	YKL146W	YCR093W	YER157W
YDR169C	YDL128W	YDR313C	YBR236C	YMR208W
YMR098C	YER124C	YOL039W	YKL021C	YBL082C
YCL034W	YER154W	YMR251W-A	YBR252W	YNL142W
YLR200W	YBL055C	YEL038W	YNR011C	YJR050W
YPL228W	YFL016C	YDR476C	YGR277C	YHR200W
YPL188W	YGR244C	YDR443C	YOR046C	YKL042W
YKR018C	YHR046C	YHL008C	YPR029C	YDR414C
YBL014C	YDR497C	YOR040W	YNL015W	YPL175W
YML085C	YDR492W	YDR463W	YBR058C	YDL083C
YBL086C	YKR048C	YNR015W	YBL025W	YMR102C
YKL038W	YMR276W	YLR319C	YDR216W	YML004C
YLR370C	YOR104W	YMR171C	YLR204W	YHL002W

YOL088C	YDL046W	YOR305W	YMR115W	YNL211C
YGL161C	YPR034W	YER021W	YJR110W	YOR288C
YPL094C	YDR179C	YOR027W	YGR117C	YNR017W
YDL030W	YDR540C	YFR044C	YDR295C	YNL118C
YGL151W	YBR055C	YBR057C	YPL066W	YBR166C
YOR075W	YDR122W	YKR103W	YMR167W	YAR003W
YDL123W	YER059W	YKL116C	YBR281C	YKR027W
YDR298C	YOR326W	YBL032W	YPL241C	YNL129W
YFR001W	YBL095W	YKR023W	YDR333C	YCR023C
YLR385C	YPR101W	YBL069W	YDR410C	YNL167C
YDR077W	YML120C	YNR049C	YNL234W	YOR386W
YGR217W	YIL111W	YLR024C	YKR100C	YDL134C
YJR149W	YIL022W	YOL007C	YML027W	YAL053W
YGR106C	YCR083W	YPL028W	YDR090C	YPR107C
YFR052W	YKL166C	YMR016C	YMR132C	YDR116C
YDL189W	YIL021W	YER056C	YBR253W	YPL110C
YDR392W	YIL056W	YDR465C	YLR346C	YLR356W
YOR001W	YGR021W	YER069W	YFR027W	YGR281W
YDR204W	YFL033C	YKL067W	YJR053W	YOR334W
YOR136W	YHR024C	YDR233C	YKR099W	YBR073W
YPL013C	YOR042W	YOR274W	YLL039C	YML005W
YGL082W	YCR051W	YOR037W	YER163C	YNL278W
YGR019W	YGR233C	YIR035C	YLR191W	YHR138C
YCR018C	YOR206W	YIR021W	YBR263W	YJR133W
YHR118C	YOR147W	YOL138C	YLR020C	YOR286W
YOL049W	YBR255W	YDR184C	YHR129C	YGR042W
YMR200W	YOL047C	YML115C	YDR062W	YMR231W
YLL054C	YBR010W	YHR018C	YHR196W	YPR070W
YGR033C	YOR061W	YHR098C	YAL011W	YGL197W
YMR137C	YML056C	YBR047W	YMR193W	YJR111C

YNL081C	YOR028C	YGR152C	YDR365C	YNL123W
YPL109C	YMR214W	YOR007C	YMR125W	YDR044W
YDR469W	YNL004W	YPR174C	YLR183C	YNL085W
YDR087C	YMR239C	YOR004W	YDR135C	YKL103C
YOR241W	YIL034C	YFR024C	YHR167W	
YDR006C	YHR015W	YNL309W	YBL005W	
YCR011C	YNL322C	YKR014C	YMR310C	
YMR196W	YML094W	YER159C	YPL105C	

ANEXO 3

Lista de genes regulados positivamente por Hac1 presentes a coleção GFP.

YDR528W	YNL044W	YLR350W
YGL250W	YAL012W	YAL014C
YBR066C	YBR093C	YDR476C
YJR022W	YNR030W	YPL094C
YOR236W	YIL048W	YGR244C
YAL007C	YJR073C	YAR002C-A
YKL165C	YML028W	YBR162W-A
YOR099W	YGR295C	YMR184W
YER156C	YFL062W	YDR376W
YOL013C	YDR453C	YBR233W
YJL153C	YAL023C	YDR434W
YKL073W	YGR028W	YHR142W
YOL019W	YOL031C	YNR075W
YJR161C	YJL069C	YAL008W
YDR411C	YBL093C	YMR011W
YMR112C	YNL062C	YAL034W-A
YNR026C	YNL111C	YER072W
YEL059C-A	YOL030W	YDL248W
YOL055C	YGL127C	YGR161C
YJL071W	YOR344C	YNL015W
YOR288C	YIL093C	YCR054C
YFR041C	YAL036C	YMR090W
YPR079W	YAR003W	YAL049C
YCL044C	YGR284C	YGR008C
YDR503C	YDR210W	YNL036W
YBR296C	YGR037C	YLR451W
YDR400W	YCR018C-A	YDR281C

YJL035C	YDR540C
YBR286W	YML074C
YDR217C	YHR179W
YAL009W	YBR137W
YKL187C	YPL019C
YJR055W	YBL033C
YMR214W	YGR255C
YGL126W	YBR014C
YML132W	YDL124W
YNL336W	YOR262W
YIL108W	YLR312W-A
YJL198W	YHL048W
YNR061C	YJR024C
YLR120C	YLR292C
YFL030W	YOR058C
YOR321W	YBL107C
YGR111W	YAL032C
YLR220W	YLR126C
YDL125C	YAL053W
YHR043C	YLR423C
YFR048W	YDR519W
YIR022W	YDL095W
YOR002W	YOR375C
YNR034W-A	YBR302C
YNL217W	YDL146W
YIR015W	YLR100W
YPR183W	YPL010W
YBR005W	
YOR213C	

ANEXO 4

Hits identificados na análise proteômica de GFP/RFP. As ORFs destacadas em negrito correspondem aos genes cuja expressão é induzida por UPR.

ORF	Proteína	Categoria
YAR009C	YAR009C	DTT <i>up</i>
YBL032W	Hek2	DTT <i>up</i>
YBL055C	YBL055C	DTT <i>up</i>
YBL059W	YBL059W	DTT <i>up</i>
YBL082C	Alg3	DTT <i>up</i>
YBL085W	Boi1	DTT <i>up</i>
YBR030W	Rkm3	DTT <i>up</i>
YBR057C	Mum2	DTT <i>up</i>
YBR059C	Akl1	DTT <i>up</i>
YBR069C	Tat1	DTT <i>up</i>
YBR070C	Alg14	DTT <i>up</i>
YBR095C	Rxt2	DTT <i>up</i>
YBR105C	Vid24	DTT <i>up</i>
YBR111C	Ysa1	DTT <i>up</i>
YBR162W-A	Ysy6	DTT <i>up</i>
YBR212W	Ngr1	DTT <i>up</i>
YBR218C	Pyc2	DTT <i>up</i>
YBR221C	Pdb1	DTT <i>up</i>
YBR233W-A	Dad3	DTT <i>up</i>
YCL030C	His4	DTT <i>up</i>
YCL031C	Rrp7	DTT <i>up</i>
YCL045C	Emc1	DTT <i>up</i>
YCR009C	Rvs161	DTT <i>up</i>

YCR038C	Bud5	DTT <i>up</i>
YDL003W	Mcd1	DTT <i>up</i>
YDL010W	Grx6	DTT <i>up</i>
YDL012C	YDL012C	DTT <i>up</i>
YDL076C	Rxt3	DTT <i>up</i>
YDL080C	Thi3	DTT <i>up</i>
YDL146W	Ldb17	DTT <i>up</i>
YDL182W	Lys20	DTT <i>up</i>
YDL201W	Trm8	DTT <i>up</i>
YDL203C	Ack1	DTT <i>up</i>
YDL226C	Gcs1	DTT <i>up</i>
YDL230W	Ptp1	DTT <i>up</i>
YDR012W	Rpl4b	DTT <i>up</i>
YDR026C	Nsi1	DTT <i>up</i>
YDR036C	Ehd3	DTT <i>up</i>
YDR041W	Rsm10	DTT <i>up</i>
YDR075W	Pph3	DTT <i>up</i>
YDR080W	Vps41	DTT <i>up</i>
YDR118W	Apc4	DTT <i>up</i>
YDR137W	Rgp1	DTT <i>up</i>
YDR152W	Gir2	DTT <i>up</i>
YDR217C	Rad9	DTT <i>up</i>
YDR227W	Sir4	DTT <i>up</i>
YDR229W	Ivy1	DTT <i>up</i>
YDR234W	Lys4	DTT <i>up</i>
YDR258C	Hsp78	DTT <i>up</i>
YDR331W	Gpi8	DTT <i>up</i>
YDR358W	Gga1	DTT <i>up</i>
YDR367W	Kei1	DTT <i>up</i>

YDR379W	Rga2	DTT <i>up</i>
YDR399W	Hpt1	DTT <i>up</i>
YDR440W	Dot1	DTT <i>up</i>
YDR444W	YDR444W	DTT <i>up</i>
YDR453C	Tsa2	DTT <i>up</i>
YDR507C	Gin4	DTT <i>up</i>
YDR532C	Kre28	DTT <i>up</i>
YEL015W	Edc3	DTT <i>up</i>
YER069W	Arg5	DTT <i>up</i>
YER129W	Sak1	DTT <i>up</i>
YER172C	Brr2	DTT <i>up</i>
YFL021W	Gat1	DTT <i>up</i>
YFL031W	Hac1	DTT <i>up</i>
YFL034C-B	Mob2	DTT <i>up</i>
YFR037C	Rsc8	DTT <i>up</i>
YGL028C	Scw11	DTT <i>up</i>
YGL031C	Rpl24a	DTT <i>up</i>
YGL053W	Prm8	DTT <i>up</i>
YGL120C	Prp43	DTT <i>up</i>
YGL225W	Vrg4	DTT <i>up</i>
YGL229C	Sap4	DTT <i>up</i>
YGR024C	Thg1	DTT <i>up</i>
YGR058W	Pef1	DTT <i>up</i>
YGR061C	Ade6	DTT <i>up</i>
YGR132C	Phb1	DTT <i>up</i>
YGR173W	Rbg2	DTT <i>up</i>
YGR189C	Crh1	DTT <i>up</i>
YGR204W	Ade3	DTT <i>up</i>
YGR206W	Mvb12	DTT <i>up</i>

YGR231C	Phb2	DTT <i>up</i>
YGR264C	Mes1	DTT <i>up</i>
YHL001W	Rpl14b	DTT <i>up</i>
YHL027W	Rim101	DTT <i>up</i>
YHL038C	Cbp2	DTT <i>up</i>
YHR037W	Put2	DTT <i>up</i>
YHR059W	Fyv4	DTT <i>up</i>
YHR085W	Ipi1	DTT <i>up</i>
YHR105W	Ypt35	DTT <i>up</i>
YHR132C	Ecm14	DTT <i>up</i>
YHR147C	Mrpl6	DTT <i>up</i>
YHR166C	Cdc23	DTT <i>up</i>
YHR172W	Spc97	DTT <i>up</i>
YHR194W	Mdm31	DTT <i>up</i>
YHR202W	YHR202W	DTT <i>up</i>
YHR206W	Skn7	DTT <i>up</i>
YIL010W	Dot5	DTT <i>up</i>
YIL021W	Rpb3	DTT <i>up</i>
YIL063C	Yrb2	DTT <i>up</i>
YIL109C	Sec24	DTT <i>up</i>
YIL155C	Gut2	DTT <i>up</i>
YIR002C	Mph1	DTT <i>up</i>
YIR010W	Dsn1	DTT <i>up</i>
YJL069C	Utp18	DTT <i>up</i>
YJL074C	Smc3	DTT <i>up</i>
YJL088W	Arg3	DTT <i>up</i>
YJL097W	Phs1	DTT <i>up</i>
YJL112W	Mdv1	DTT <i>up</i>
YJL154C	Vps35	DTT <i>up</i>

YJR014W	Tma22	DTT <i>up</i>
YJR031C	Gea1	DTT <i>up</i>
YJR041C	Urb2	DTT <i>up</i>
YJR138W	Iml1	DTT <i>up</i>
YJR147W	Hms2	DTT <i>up</i>
YJR148W	Bat2	DTT <i>up</i>
YKL017C	Hcs1	DTT <i>up</i>
YKL059C	Mpe1	DTT <i>up</i>
YKL071W	YKL071W	DTT <i>up</i>
YKL086W	Srx1	DTT <i>up</i>
YKL160W	Elf1	DTT <i>up</i>
YKL189W	Hym1	DTT <i>up</i>
YLR055C	Spt8	DTT <i>up</i>
YLR095C	Ioc2	DTT <i>up</i>
YLR113W	Hog1	DTT <i>up</i>
YLR127C	Apc2	DTT <i>up</i>
YLR187W	Skg3	DTT <i>up</i>
YLR218C	Coa4	DTT <i>up</i>
YLR333C	Rps25b	DTT <i>up</i>
YLR345W	YLR345W	DTT <i>up</i>
YLR372W	Sur4	DTT <i>up</i>
YLR373C	Vid22	DTT <i>up</i>
YLR404W	Fld1	DTT <i>up</i>
YML018C	YML018C	DTT <i>up</i>
YML022W	Apt1	DTT <i>up</i>
YML035C	Amd1	DTT <i>up</i>
YML069W	Pob3	DTT <i>up</i>
YML078W	Cpr3	DTT <i>up</i>
YML079W	YML079W	DTT <i>up</i>

YML105C	Sec65	DTT <i>up</i>
YMR019W	Stb4	DTT <i>up</i>
YMR067C	Ubx4	DTT <i>up</i>
YMR127C	Sas2	DTT <i>up</i>
YMR129W	Pom152	DTT <i>up</i>
YMR135C	Gid8	DTT <i>up</i>
YMR138W	Cin4	DTT <i>up</i>
YMR183C	Sso2	DTT <i>up</i>
YMR188C	Mrps17	DTT <i>up</i>
YMR273C	Zds1	DTT <i>up</i>
YMR296C	Lcb1	DTT <i>up</i>
YNL049C	Sfb2	DTT <i>up</i>
YNL068C	Fkh2	DTT <i>up</i>
YNL106C	Inp52	DTT <i>up</i>
YNL110C	Nop15	DTT <i>up</i>
YNL136W	Eaf7	DTT <i>up</i>
YNL137C	Nam9	DTT <i>up</i>
YNL155W	YNL155W	DTT <i>up</i>
YNL166C	Bni5	DTT <i>up</i>
YNL176C	Tda7	DTT <i>up</i>
YNL185C	Mrpl19	DTT <i>up</i>
YNR023W	Snf12	DTT <i>up</i>
YNR024W	Mpp6	DTT <i>up</i>
YNR031C	Ssk2	DTT <i>up</i>
YNR055C	Hol1	DTT <i>up</i>
YOL027C	Mdm38	DTT <i>up</i>
YOL041C	Nop12	DTT <i>up</i>
YOL052C	Spe2	DTT <i>up</i>
YOL096C	Coq3	DTT <i>up</i>

YOL111C	Mdy2	DTT <i>up</i>
YOL121C	Rps19a	DTT <i>up</i>
YOR057W	Sgt1	DTT <i>up</i>
YOR110W	Tfc7	DTT <i>up</i>
YOR143C	Thi80	DTT <i>up</i>
YOR224C	Rpb8	DTT <i>up</i>
YOR247W	Srl1	DTT <i>up</i>
YOR265W	Rbl2	DTT <i>up</i>
YOR350C	Mne1	DTT <i>up</i>
YPL079W	Rpl21b	DTT <i>up</i>
YPL089C	Rlm1	DTT <i>up</i>
YPL138C	Spp1	DTT <i>up</i>
YPL144W	Poc4	DTT <i>up</i>
YPL151C	Prp46	DTT <i>up</i>
YPL225W	YPL225W	DTT <i>up</i>
YPR033C	Hts1	DTT <i>up</i>
YPR034W	Arp7	DTT <i>up</i>
YPR062W	Fcy1	DTT <i>up</i>
YPR063C	YPR063C	DTT <i>up</i>
YBR207W	Fth1	DTT <i>up</i>
YBR214W	Sds24	DTT <i>up</i>
YBR274W	Chk1	DTT <i>up</i>
YCR004C	Ycp4	DTT <i>up</i>
YER084W	YER084W	DTT <i>up</i>
YGL010W	YGL010W	DTT <i>up</i>
YGL071W	Aft1	DTT <i>up</i>
YGL164C	Yrb30	DTT <i>up</i>
YIL079C	Air1	DTT <i>up</i>
YIL148W	Rpl40a	DTT <i>up</i>

YJL025W	Rrn7	DTT <i>up</i>
YJL146W	Ids2	DTT <i>up</i>
YLR357W	Rsc2	DTT <i>up</i>
YLR390W-A	Ccw14	DTT <i>up</i>
YMR047C	Nup116	DTT <i>up</i>
YMR149W	Swp1	DTT <i>up</i>
YNL214W	Pex17	DTT <i>up</i>
YPR075C	Opy2	DTT <i>up</i>
YDL105W	Nse4	DTT <i>down</i>
YDL119C	YDL119C	DTT <i>down</i>
YDL150W	Rpc53	DTT <i>down</i>
YDL170W	Uga3	DTT <i>down</i>
YDR127W	Aro1	DTT <i>down</i>
YDR411C	Dfm1	DTT <i>down</i>
YDR434W	Gpi17	DTT <i>down</i>
YER003C	Pmi40	DTT <i>down</i>
YER087C-A	YER087C-A	DTT <i>down</i>
YER176W	Ecm32	DTT <i>down</i>
YFL062W	Cos4	DTT <i>down</i>
YGL023C	Pib2	DTT <i>down</i>
YGL162W	Sut1	DTT <i>down</i>
YGR135W	Pre9	DTT <i>down</i>
YGR238C	Kel2	DTT <i>down</i>
YIR038C	Gtt1	DTT <i>down</i>
YLR098C	Cha4	DTT <i>down</i>
YLR397C	Afg2	DTT <i>down</i>
YMR193W	Mrpl24	DTT <i>down</i>
YNL003C	Pet8	DTT <i>down</i>
YNL025C	Ssn8	DTT <i>down</i>

YNL037C	Idh1	DTT <i>down</i>
YNL129W	Nrk1	DTT <i>down</i>
YNL211C	YNL211C	DTT <i>down</i>
YNL213C	Rrg9	DTT <i>down</i>
YNL312W	Rfa2	DTT <i>down</i>
YOL081W	Ira2	DTT <i>down</i>
YOR148C	Spp2	DTT <i>down</i>
YOR320C	Gnt1	DTT <i>down</i>
YPL141C	Frk1	DTT <i>down</i>
YAL047C	Spc72	DTT <i>down</i>
YAR003W	Swd1	DTT <i>down</i>
YBL023C	Mcm2	DTT <i>down</i>
YBL036C	YBL036C	DTT <i>down</i>
YBL095W	YBL095W	DTT <i>down</i>
YBR028C	Ypk3	DTT <i>down</i>
YBR072W	Hsp26	DTT <i>down</i>
YBR152W	Spp381	DTT <i>down</i>
YBR166C	Tyr1	DTT <i>down</i>
YBR215W	Hpc2	DTT <i>down</i>
YBR230C	Om14	DTT <i>down</i>
YBR247C	Enp1	DTT <i>down</i>
YBR281C	Dug2	DTT <i>down</i>
YBR287W	Zsp1	DTT <i>down</i>
YBR289W	Snf5	DTT <i>down</i>
YBR290W	Bsd2	DTT <i>down</i>
YCL034W	Lsb5	DTT <i>down</i>
YCR021C	Hsp30	DTT <i>down</i>
YCR051W	YCR051W	DTT <i>down</i>
YDL046W	Npc2	DTT <i>down</i>

YDL056W	Mbp1	DTT <i>down</i>
YDL059C	Rad59	DTT <i>down</i>
YDL097C	Rpn6	DTT <i>down</i>
YDL099W	Bug1	DTT <i>down</i>
YDL104C	Qri7	DTT <i>down</i>
YDL126C	Cdc48	DTT <i>down</i>
YDL161W	Ent1	DTT <i>down</i>
YDL189W	Rbs1	DTT <i>down</i>
YDL204W	Rtn2	DTT <i>down</i>
YDL236W	Pho13	DTT <i>down</i>
YDR001C	Nth1	DTT <i>down</i>
YDR014W	Rad61	DTT <i>down</i>
YDR081C	Pdc2	DTT <i>down</i>
YDR179C	Csn9	DTT <i>down</i>
YDR245W	Mnn10	DTT <i>down</i>
YDR297W	Sur2	DTT <i>down</i>
YDR324C	Utp4	DTT <i>down</i>
YDR330W	Ubx5	DTT <i>down</i>
YDR335W	Msn5	DTT <i>down</i>
YDR363W	Esc2	DTT <i>down</i>
YDR390C	Uba2	DTT <i>down</i>
YDR400W	Urh1	DTT <i>down</i>
YDR451C	Yhp1	DTT <i>down</i>
YDR465C	Rmt2	DTT <i>down</i>
YEL002C	Wbp1	DTT <i>down</i>
YEL017W	Gtt3	DTT <i>down</i>
YER021W	Rpn3	DTT <i>down</i>
YER025W	Gcd11	DTT <i>down</i>
YER035W	Edc2	DTT <i>down</i>

YER054C	Gip2	DTT <i>down</i>
YER072W	Vtc1	DTT <i>down</i>
YER088C	Dot6	DTT <i>down</i>
YER123W	Yck3	DTT <i>down</i>
YER134C	YER134C	DTT <i>down</i>
YER150W	Spi1	DTT <i>down</i>
YER156C	YER156C	DTT <i>down</i>
YER166W	Dnf1	DTT <i>down</i>
YER169W	Rph1	DTT <i>down</i>
YER173W	Rad24	DTT <i>down</i>
YFL027C	Gyp8	DTT <i>down</i>
YFR046C	Cnn1	DTT <i>down</i>
YGL011C	Scl1	DTT <i>down</i>
YGL019W	Ckb1	DTT <i>down</i>
YGL046W	YGL046W	DTT <i>down</i>
YGL090W	Lif1	DTT <i>down</i>
YGL093W	Spc105	DTT <i>down</i>
YGL098W	Use1	DTT <i>down</i>
YGL163C	Rad54	DTT <i>down</i>
YGL207W	Spt16	DTT <i>down</i>
YGL210W	Ypt32	DTT <i>down</i>
YGL226C-A	Ost5	DTT <i>down</i>
YGL255W	Zrt1	DTT <i>down</i>
YGR052W	Fmp48	DTT <i>down</i>
YGR123C	Ppt1	DTT <i>down</i>
YGR129W	Syf2	DTT <i>down</i>
YGR166W	Trs65	DTT <i>down</i>
YGR167W	Clc1	DTT <i>down</i>
YGR178C	Pbp1	DTT <i>down</i>

YGR195W	Ski6	DTT <i>down</i>
YGR211W	Zpr1	DTT <i>down</i>
YGR239C	Pex21	DTT <i>down</i>
YGR241C	Yap1802	DTT <i>down</i>
YGR268C	Hua1	DTT <i>down</i>
YGR279C	Scw4	DTT <i>down</i>
YGR284C	Erv29	DTT <i>down</i>
YHR012W	Vps29	DTT <i>down</i>
YHR034C	Pih1	DTT <i>down</i>
YHR118C	Orc6	DTT <i>down</i>
YHR133C	Nsg1	DTT <i>down</i>
YHR141C	Rpl42b	DTT <i>down</i>
YHR187W	Iki1	DTT <i>down</i>
YHR200W	Rpn10	DTT <i>down</i>
YHR205W	Sch9	DTT <i>down</i>
YHR216W	Imd2	DTT <i>down</i>
YIL004C	Bet1	DTT <i>down</i>
YIL015W	Bar1	DTT <i>down</i>
YIL017C	Vid28	DTT <i>down</i>
YIL042C	Pkp1	DTT <i>down</i>
YIL065C	Fis1	DTT <i>down</i>
YIL107C	Pfk26	DTT <i>down</i>
YIL145C	Pan6	DTT <i>down</i>
YIR011C	Sts1	DTT <i>down</i>
YJL002C	Ost1	DTT <i>down</i>
YJL017W	YJL017W	DTT <i>down</i>
YJL021C	YJL021C	DTT <i>down</i>
YJL053W	Pep8	DTT <i>down</i>
YJL065C	Dls1	DTT <i>down</i>

YJL070C	YJL070C	DTT <i>down</i>
YJL162C	Jjj2	DTT <i>down</i>
YJL171C	YJL171C	DTT <i>down</i>
YJL190C	Rps22a	DTT <i>down</i>
YJL196C	Elo1	DTT <i>down</i>
YJR011C	YJR011C	DTT <i>down</i>
YJR053W	Bfa1	DTT <i>down</i>
YJR077C	Mir1	DTT <i>down</i>
YJR127C	Rsf2	DTT <i>down</i>
YKL047W	Anr2	DTT <i>down</i>
YKL103C	Ape1	DTT <i>down</i>
YKL146W	Avt3	DTT <i>down</i>
YKL154W	Srp102	DTT <i>down</i>
YKL165C	Mcd4	DTT <i>down</i>
YKR022C	Ntr2	DTT <i>down</i>
YKR026C	Gcn3	DTT <i>down</i>
YLL022C	Hif1	DTT <i>down</i>
YLL060C	Gtt2	DTT <i>down</i>
YLR002C	Noc3	DTT <i>down</i>
YLR016C	Pml1	DTT <i>down</i>
YLR025W	Snf7	DTT <i>down</i>
YLR073C	Rfu1	DTT <i>down</i>
YLR136C	Tis11	DTT <i>down</i>
YLR149C	YLR149C	DTT <i>down</i>
YLR183C	Tos4	DTT <i>down</i>
YLR188W	Mdl1	DTT <i>down</i>
YLR204W	Qri5	DTT <i>down</i>
YLR375W	Stp3	DTT <i>down</i>
YLR383W	Smc6	DTT <i>down</i>

YLR447C	Vma6	DTT <i>down</i>
YLR453C	Rif2	DTT <i>down</i>
YML027W	Yox1	DTT <i>down</i>
YML043C	Rrn11	DTT <i>down</i>
YML098W	Taf13	DTT <i>down</i>
YML121W	Gtr1	DTT <i>down</i>
YMR080C	Nam7	DTT <i>down</i>
YMR089C	Yta12	DTT <i>down</i>
YMR097C	Mtg1	DTT <i>down</i>
YMR102C	YMR102C	DTT <i>down</i>
YMR131C	Rrb1	DTT <i>down</i>
YMR134W	YMR134W	DTT <i>down</i>
YMR143W	Rps16a	DTT <i>down</i>
YMR163C	Inp2	DTT <i>down</i>
YMR164C	Mss11	DTT <i>down</i>
YMR166C	YMR166C	DTT <i>down</i>
YMR171C	Ear1	DTT <i>down</i>
YMR189W	Gcv2	DTT <i>down</i>
YMR198W	Cik1	DTT <i>down</i>
YMR199W	Cln1	DTT <i>down</i>
YMR201C	Rad14	DTT <i>down</i>
YMR208W	Erg12	DTT <i>down</i>
YMR227C	Taf7	DTT <i>down</i>
YMR239C	Rnt1	DTT <i>down</i>
YMR240C	Cus1	DTT <i>down</i>
YMR259C	Trm732	DTT <i>down</i>
YMR277W	Fcp1	DTT <i>down</i>
YMR305C	Scw10	DTT <i>down</i>
YMR313C	Tgl3	DTT <i>down</i>

YNL006W	Lst8	DTT <i>down</i>
YNL022C	YNL022C	DTT <i>down</i>
YNL071W	Lat1	DTT <i>down</i>
YNL084C	End3	DTT <i>down</i>
YNL098C	Ras2	DTT <i>down</i>
YNL157W	Igo1	DTT <i>down</i>
YNL162W-A	YNL162W-A	DTT <i>down</i>
YNL168C	Fmp41	DTT <i>down</i>
YNL194C	YNL194C	DTT <i>down</i>
YNL230C	Ela1	DTT <i>down</i>
YNL246W	Vps75	DTT <i>down</i>
YNL254C	Rtc4	DTT <i>down</i>
YNL275W	Bor1	DTT <i>down</i>
YNL278W	Caf120	DTT <i>down</i>
YNR013C	Pho91	DTT <i>down</i>
YNR017W	Tim23	DTT <i>down</i>
YNR061C	YNR061C	DTT <i>down</i>
YOL013C	Hrd1	DTT <i>down</i>
YOL017W	Esc8	DTT <i>down</i>
YOL034W	Smc5	DTT <i>down</i>
YOL064C	Met22	DTT <i>down</i>
YOL105C	Wsc3	DTT <i>down</i>
YOL112W	Msb4	DTT <i>down</i>
YOL124C	Trm11	DTT <i>down</i>
YOL136C	Pfk27	DTT <i>down</i>
YOR016C	Erp4	DTT <i>down</i>
YOR037W	Cyc2	DTT <i>down</i>
YOR059C	YOR059C	DTT <i>down</i>
YOR065W	Cyt1	DTT <i>down</i>

YOR094W	Arf3	DTT <i>down</i>
YOR132W	Vps17	DTT <i>down</i>
YOR157C	Pup1	DTT <i>down</i>
YOR201C	Mrm1	DTT <i>down</i>
YOR236W	Dfr1	DTT <i>down</i>
YOR239W	Abp140	DTT <i>down</i>
YOR279C	Rfm1	DTT <i>down</i>
YOR285W	Rdl1	DTT <i>down</i>
YOR288C	Mpd1	DTT <i>down</i>
YOR293W	Rps10a	DTT <i>down</i>
YOR296W	YOR296W	DTT <i>down</i>
YOR315W	Sfg1	DTT <i>down</i>
YOR352W	Tfb6	DTT <i>down</i>
YOR362C	Pre10	DTT <i>down</i>
YPL018W	Ctf19	DTT <i>down</i>
YPL026C	Sks1	DTT <i>down</i>
YPL047W	Sgf11	DTT <i>down</i>
YPL076W	Gpi2	DTT <i>down</i>
YPL091W	Glr1	DTT <i>down</i>
YPL140C	Mkk2	DTT <i>down</i>
YPL166W	Atg29	DTT <i>down</i>
YPL175W	Spt14	DTT <i>down</i>
YPL181W	Cti6	DTT <i>down</i>
YPL190C	Nab3	DTT <i>down</i>
YPL234C	Vma11	DTT <i>down</i>
YPL249C-A	Rpl36b	DTT <i>down</i>
YPL269W	Kar9	DTT <i>down</i>
YPL271W	Atp15	DTT <i>down</i>
YPR003C	YPR003C	DTT <i>down</i>

YPR055W	Sec8	DTT <i>down</i>
YPR065W	Rox1	DTT <i>down</i>
YPR131C	Nat3	DTT <i>down</i>
YIL063C	Yrb2	Tunicamicina <i>up</i>
YLR406C	Rpl31b	Tunicamicina <i>up</i>
YJL194W	Cdc6	Tunicamicina <i>up</i>
YFR032C-A	Rpl29	Tunicamicina <i>up</i>
YPL038W	Met31	Tunicamicina <i>up</i>
YDR528W	Hlr1	Tunicamicina <i>up</i>
YPL271W	Atp15	Tunicamicina <i>up</i>
YJR148W	Bat2	Tunicamicina <i>up</i>
YOR214C	YOR214C	Tunicamicina <i>up</i>
YML111W	Bul2	Tunicamicina <i>up</i>
YGL031C	Rpl24a	Tunicamicina <i>up</i>
YKL086W	Srx1	Tunicamicina <i>up</i>
YNR023W	Snf12	Tunicamicina <i>up</i>
YDR453C	Tsa2	Tunicamicina <i>up</i>
YGR264C	Mes1	Tunicamicina <i>up</i>
YEL036C	Anp1	Tunicamicina <i>up</i>
YDL089W	Nur1	Tunicamicina <i>up</i>
YER116C	Slx8	Tunicamicina <i>up</i>
YDR423C	Cad1	Tunicamicina <i>up</i>
YIL129C	Tao3	Tunicamicina <i>up</i>
YDR075W	Pph3	Tunicamicina <i>up</i>
YKL181W	Prs1	Tunicamicina <i>up</i>
YGR231C	Phb2	Tunicamicina <i>up</i>
YOL108C	Ino4	Tunicamicina <i>up</i>
YJR085C	YJR085C	Tunicamicina <i>up</i>
YOR335C	Ala1	Tunicamicina <i>up</i>

YDR118W	Apc4	Tunicamicina <i>up</i>
YNL055C	Por1	Tunicamicina <i>up</i>
YDR471W	Rpl27b	Tunicamicina <i>up</i>
YLR396C	Vps33	Tunicamicina <i>up</i>
YIR002C	Mph1	Tunicamicina <i>up</i>
YDR036C	Ehd3	Tunicamicina <i>up</i>
YDL105W	Nse4	Tunicamicina <i>up</i>
YNL176C	Tda7	Tunicamicina <i>up</i>
YDL173W	Par32	Tunicamicina <i>up</i>
YKL019W	Ram2	Tunicamicina <i>up</i>
YHR202W	YHR202W	Tunicamicina <i>up</i>
YCR082W	Ahc2	Tunicamicina <i>up</i>
YBR057C	Mum2	Tunicamicina <i>up</i>
YNR053C	Nog2	Tunicamicina <i>up</i>
YCR028C	Fen2	Tunicamicina <i>up</i>
YAR015W	Ade1	Tunicamicina <i>up</i>
YML079W	YML079W	Tunicamicina <i>up</i>
YKL071W	YKL071W	Tunicamicina <i>up</i>
YLR075W	Rpl10	Tunicamicina <i>up</i>
YBL039C	Ura7	Tunicamicina <i>up</i>
YKR094C	Rpl40b	Tunicamicina <i>up</i>
YLR153C	Acs2	Tunicamicina <i>up</i>
YBR092C	Pho3	Tunicamicina <i>up</i>
YLR044C	Pdc1	Tunicamicina <i>up</i>
YBR269C	Fmp21	Tunicamicina <i>up</i>
YBR114W	Rad16	Tunicamicina <i>up</i>
YMR171C	Ear1	Tunicamicina <i>up</i>
YMR062C	Arg7	Tunicamicina <i>up</i>
YOR205C	Gep3	Tunicamicina <i>up</i>

YNL136W	Eaf7	Tunicamicina <i>up</i>
YNR012W	Urk1	Tunicamicina <i>up</i>
YMR138W	Cin4	Tunicamicina <i>up</i>
YAL012W	Cys3	Tunicamicina <i>up</i>
YOR110W	Tfc7	Tunicamicina <i>up</i>
YIL155C	Gut2	Tunicamicina <i>up</i>
YBR103W	Sif2	Tunicamicina <i>up</i>
YHR012W	Vps29	Tunicamicina <i>up</i>
YOR143C	Thi80	Tunicamicina <i>up</i>
YBR179C	Fzo1	Tunicamicina <i>up</i>
YGR204W	Ade3	Tunicamicina <i>up</i>
YFR013W	Ioc3	Tunicamicina <i>up</i>
YPL129W	Taf14	Tunicamicina <i>up</i>
YKL182W	Fas1	Tunicamicina <i>up</i>
YDR227W	Sir4	Tunicamicina <i>up</i>
YLR345W	YLR345W	Tunicamicina <i>up</i>
YEL059C-A	Som1	Tunicamicina <i>up</i>
YJL128C	Pbs2	Tunicamicina <i>up</i>
YMR173W	Ddr48	Tunicamicina <i>up</i>
YIL019W	Faf1	Tunicamicina <i>up</i>
YML093W	Utp14	Tunicamicina <i>up</i>
YER102W	Rps8b	Tunicamicina <i>up</i>
YIL039W	Ted1	Tunicamicina <i>up</i>
YIR010W	Dsn1	Tunicamicina <i>up</i>
YGL140C	YGL140C	Tunicamicina <i>up</i>
YHL018W	YHL018W	Tunicamicina <i>up</i>
YBR218C	Pyc2	Tunicamicina <i>up</i>
YEL046C	Gly1	Tunicamicina <i>up</i>
YDR172W	Sup35	Tunicamicina <i>up</i>

YJL207C	Laa1	Tunicamicina <i>up</i>
YOR304W	Isw2	Tunicamicina <i>up</i>
YBR160W	Cdc28	Tunicamicina <i>up</i>
YLR342W	Fks1	Tunicamicina <i>up</i>
YJL036W	Snx4	Tunicamicina <i>up</i>
YOR112W	Cex1	Tunicamicina <i>up</i>
YML097C	Vps9	Tunicamicina <i>up</i>
YGR010W	Nma2	Tunicamicina <i>up</i>
YJL151C	Sna3	Tunicamicina <i>up</i>
YNL096C	Rps7b	Tunicamicina <i>up</i>
YDR138W	Hpr1	Tunicamicina <i>up</i>
YGR060W	Erg25	Tunicamicina <i>up</i>
YOR229W	Wtm2	Tunicamicina <i>up</i>
YNL158W	Pga1	Tunicamicina <i>up</i>
YLR357W	Rsc2	Tunicamicina <i>up</i>
YIL077C	YIL077C	Tunicamicina <i>up</i>
YNL053W	Msg5	Tunicamicina <i>up</i>
YDL076C	Rxt3	Tunicamicina <i>up</i>
YML030W	Rcf1	Tunicamicina <i>up</i>
YMR061W	Rna14	Tunicamicina <i>up</i>
YDR229W	Ivy1	Tunicamicina <i>up</i>
YKL053C-A	Mdm35	Tunicamicina <i>up</i>
YOR070C	Gyp1	Tunicamicina <i>up</i>
YDR077W	Sed1	Tunicamicina <i>up</i>
YGR175C	Erg1	Tunicamicina <i>up</i>
YOR181W	Las17	Tunicamicina <i>up</i>
YIL145C	Pan6	Tunicamicina <i>up</i>
YFL049W	Swp82	Tunicamicina <i>up</i>
YER003C	Pmi40	Tunicamicina <i>down</i>

YLL022C	Hif1	Tunicamicina <i>down</i>
YLR176C	Rfx1	Tunicamicina <i>down</i>
YPR108W	Rpn7	Tunicamicina <i>down</i>
YER141W	Cox15	Tunicamicina <i>down</i>
YGR239C	Pex21	Tunicamicina <i>down</i>
YDL189W	Rbs1	Tunicamicina <i>down</i>
YPL145C	Kes1	Tunicamicina <i>down</i>
YBR072W	Hsp26	Tunicamicina <i>down</i>
YNL168C	Fmp41	Tunicamicina <i>down</i>
YJR145C	Rps4a	Tunicamicina <i>down</i>
YMR164C	Mss11	Tunicamicina <i>down</i>
YDL066W	Idp1	Tunicamicina <i>down</i>
YBR211C	Ame1	Tunicamicina <i>down</i>
YPL051W	Arl3	Tunicamicina <i>down</i>
YER123W	Yck3	Tunicamicina <i>down</i>
YDL001W	Rmd1	Tunicamicina <i>down</i>
YNL098C	Ras2	Tunicamicina <i>down</i>
YOR001W	Rrp6	Tunicamicina <i>down</i>
YLR397C	Afg2	Tunicamicina <i>down</i>
YNL223W	Atg4	Tunicamicina <i>down</i>
YPL120W	Vps30	Tunicamicina <i>down</i>
YKL051W	Sfk1	Tunicamicina <i>down</i>
YGR271C-A	Efg1	Tunicamicina <i>down</i>
YKL075C	YKL075C	Tunicamicina <i>down</i>
YBR215W	Hpc2	Tunicamicina <i>down</i>
YOR315W	Sfg1	Tunicamicina <i>down</i>
YKL046C	Dcw1	Tunicamicina <i>down</i>
YJL065C	Dls1	Tunicamicina <i>down</i>
YPR171W	Bsp1	Tunicamicina <i>down</i>

YMR313C	Tgl3	Tunicamicina <i>down</i>
YNL252C	Mrpl17	Tunicamicina <i>down</i>
YGL167C	Pmr1	Tunicamicina <i>down</i>
YMR189W	Gcv2	Tunicamicina <i>down</i>
YOR046C	Dbp5	Tunicamicina <i>down</i>
YPL047W	Sgf11	Tunicamicina <i>down</i>
YNR017W	Tim23	Tunicamicina <i>down</i>
YML125C	Pga3	Tunicamicina <i>down</i>
YDR245W	Mnn10	Tunicamicina <i>down</i>
YLL060C	Gtt2	Tunicamicina <i>down</i>
YGR027C	Rps25a	Tunicamicina <i>down</i>
YDR074W	Tps2	Tunicamicina <i>down</i>
YDR194C	Mss116	Tunicamicina <i>down</i>
YOR052C	YOR052C	Tunicamicina <i>down</i>
YGR241C	Yap1802	Tunicamicina <i>down</i>
YPL139C	Ume1	Tunicamicina <i>down</i>
YHR049W	Fsh1	Tunicamicina <i>down</i>
YHR196W	Utp9	Tunicamicina <i>down</i>
YNL044W	Yip3	Tunicamicina <i>down</i>
YMR239C	Rnt1	Tunicamicina <i>down</i>
YMR002W	Mic17	Tunicamicina <i>down</i>
YDR171W	Hsp42	Tunicamicina <i>down</i>
YMR199W	Cln1	Tunicamicina <i>down</i>
YGL011C	Scl1	Tunicamicina <i>down</i>
YER122C	Glo3	Tunicamicina <i>down</i>
YKR006C	Mrpl13	Tunicamicina <i>down</i>
YML107C	Pml39	Tunicamicina <i>down</i>
YCR051W	YCR051W	Tunicamicina <i>down</i>
YOL147C	Pex11	Tunicamicina <i>down</i>

YJL183W	Mnn11	Tunicamicina <i>down</i>
YBL095W	YBL095W	Tunicamicina <i>down</i>
YGR129W	Syf2	Tunicamicina <i>down</i>
YML080W	Dus1	Tunicamicina <i>down</i>
YDR451C	Yhp1	Tunicamicina <i>down</i>
YKR063C	Las1	Tunicamicina <i>down</i>
YNL278W	Caf120	Tunicamicina <i>down</i>
YDL126C	Cdc48	Tunicamicina <i>down</i>
YNR028W	Cpr8	Tunicamicina <i>down</i>
YCL034W	Lsb5	Tunicamicina <i>down</i>
YGL195W	Gcn1	Tunicamicina <i>down</i>
YLR222C	Utp13	Tunicamicina <i>down</i>
YOL112W	Msb4	Tunicamicina <i>down</i>
YLR148W	Pep3	Tunicamicina <i>down</i>
YDR011W	Snq2	Tunicamicina <i>down</i>
YDR335W	Msn5	Tunicamicina <i>down</i>
YGL147C	Rpl9a	Tunicamicina <i>down</i>
YNL267W	Pik1	Tunicamicina <i>down</i>
YHR041C	Srb2	Tunicamicina <i>down</i>
YBR287W	Zsp1	Tunicamicina <i>down</i>
YHR170W	Nmd3	Tunicamicina <i>down</i>
YNL025C	Ssn8	Tunicamicina <i>down</i>
YHR187W	Iki1	Tunicamicina <i>down</i>
YJL190C	Rps22a	Tunicamicina <i>down</i>
YPL150W	YPL150W	Tunicamicina <i>down</i>
YGR080W	Twf1	Tunicamicina <i>down</i>
YER169W	Rph1	Tunicamicina <i>down</i>
YGR118W	Rps23a	Tunicamicina <i>down</i>
YOR033C	Exo1	Tunicamicina <i>down</i>

YJL166W	Qcr8	Tunicamicina <i>down</i>
YOL124C	Trm11	Tunicamicina <i>down</i>
YOL034W	Smc5	Tunicamicina <i>down</i>
YLR188W	Mdl1	Tunicamicina <i>down</i>
YOL030W	Gas5	Tunicamicina <i>down</i>
YCR009C	Rvs161	Tunicamicina <i>down</i>
YPL066W	Rgl1	Tunicamicina <i>down</i>
YBR152W	Spp381	Tunicamicina <i>down</i>
YDR081C	Pdc2	Tunicamicina <i>down</i>
YLR390W-A	Ccw14	Tunicamicina <i>down</i>
YOR227W	Her1	Tunicamicina <i>down</i>
YDL208W	Nhp2	Tunicamicina <i>down</i>
YLR136C	Tis11	Tunicamicina <i>down</i>
YDL123W	Sna4	Tunicamicina <i>down</i>
YLR413W	YLR413W	Tunicamicina <i>down</i>
YDR390C	Uba2	Tunicamicina <i>down</i>
YNL095C	YNL095C	Tunicamicina <i>down</i>
YOR259C	Rpt4	Tunicamicina <i>down</i>
YPR079W	Mrl1	Tunicamicina <i>down</i>
YKR026C	Gcn3	Tunicamicina <i>down</i>
YOR059C	YOR059C	Tunicamicina <i>down</i>
YOR045W	Tom6	Tunicamicina <i>down</i>
YPR073C	Ltp1	Tunicamicina <i>down</i>
YDL204W	Rtn2	Tunicamicina <i>down</i>
YMR131C	Rrb1	Tunicamicina <i>down</i>
YML115C	Van1	Tunicamicina <i>down</i>
YNL326C	Pfa3	Tunicamicina <i>down</i>
YML062C	Mft1	Tunicamicina <i>down</i>
YDL195W	Sec31	Tunicamicina <i>down</i>

YDR059C	Ubc5	Tunicamicina <i>down</i>
YDR400W	Urh1	Tunicamicina <i>down</i>
YDR167W	Taf10	Tunicamicina <i>down</i>
YDR465C	Rmt2	Tunicamicina <i>down</i>
YDR170C	Sec7	Tunicamicina <i>down</i>
YDL225W	Shs1	Tunicamicina <i>down</i>
YPR029C	Apl4	Tunicamicina <i>down</i>
YGR135W	Pre9	Tunicamicina <i>down</i>
YGL023C	Pib2	Tunicamicina <i>down</i>
YKL064W	Mnr2	Tunicamicina <i>down</i>
YGL221C	Nif3	Tunicamicina <i>down</i>
YBR290W	Bsd2	Tunicamicina <i>down</i>
YGR209C	Trx2	Tunicamicina <i>down</i>
YHR200W	Rpn10	Tunicamicina <i>down</i>
YNL258C	Dsl1	Tunicamicina <i>down</i>
YBL051C	Pin4	Tunicamicina <i>down</i>
YER157W	Cog3	Tunicamicina <i>down</i>
YDL134C	Pph21	Tunicamicina <i>down</i>
YDL119C	YDL119C	Tunicamicina <i>down</i>
YMR208W	Erg12	Tunicamicina <i>down</i>
YDR087C	Rrp1	Tunicamicina <i>down</i>
YOR286W	Rdl2	Tunicamicina <i>down</i>
YHR143W-A	Rpc10	Tunicamicina <i>down</i>
YOR187W	Tuf1	Tunicamicina <i>down</i>
YLR110C	Ccw12	Tunicamicina <i>down</i>
YNR056C	Bio5	Tunicamicina <i>down</i>
YEL002C	Wbp1	Tunicamicina <i>down</i>
YMR193W	Mrpl24	Tunicamicina <i>down</i>
YKL142W	Mrp8	Tunicamicina <i>down</i>

YBL082C	Alg3	Tunicamicina <i>down</i>
YBL058W	Shp1	Tunicamicina <i>down</i>
YGR046W	Tam41	Tunicamicina <i>down</i>
YPL141C	Frk1	Tunicamicina <i>down</i>
YJL066C	Mpm1	Tunicamicina <i>down</i>
YKL130C	She2	Tunicamicina <i>down</i>
YDL185W	Vma1	Tunicamicina <i>down</i>
YOR129C	Afi1	Tunicamicina <i>down</i>
YER088C	Dot6	Tunicamicina <i>down</i>
YMR201C	Rad14	Tunicamicina <i>down</i>
YKR046C	Pet10	Tunicamicina <i>down</i>
YPR169W	Jip5	Tunicamicina <i>down</i>
YLR407W	YLR407W	Tunicamicina <i>down</i>
YEL050C	Rml2	Tunicamicina <i>down</i>
YGR244C	Lsc2	Tunicamicina <i>down</i>
YNL162W-A	YNL162W-A	Tunicamicina <i>down</i>
YNL015W	Pbi2	Tunicamicina <i>down</i>
YGR195W	Ski6	Tunicamicina <i>down</i>
YOR305W	Rrg7	Tunicamicina <i>down</i>
YGL068W	Mnp1	Tunicamicina <i>down</i>
YGL141W	Hul5	Tunicamicina <i>down</i>
YDR258C	Hsp78	Tunicamicina <i>down</i>
YDR062W	Lcb2	Tunicamicina <i>down</i>
YNL218W	Mgs1	Tunicamicina <i>down</i>
YOR138C	Rup1	Tunicamicina <i>down</i>
YIL156W	Ubp7	Tunicamicina <i>down</i>
YMR125W	Sto1	Tunicamicina <i>down</i>
YIL074C	Ser33	Tunicamicina <i>down</i>
YPL175W	Spt14	Tunicamicina <i>down</i>

YDR434W	Gpi17	Tunicamicina <i>down</i>
YOR241W	Met7	Tunicamicina <i>down</i>
YMR097C	Mtg1	Tunicamicina <i>down</i>
YML072C	Tcb3	Tunicamicina <i>down</i>
YNL004W	Hrb1	Tunicamicina <i>down</i>
YGL162W	Sut1	Tunicamicina <i>down</i>
YDL236W	Pho13	Tunicamicina <i>down</i>
YDR226W	Adk1	Tunicamicina <i>down</i>
YNL077W	Apj1	Tunicamicina <i>down</i>
YER107C	Gle2	Tunicamicina <i>down</i>
YNL213C	Rrg9	Tunicamicina <i>down</i>
