

## RESSALVA

Atendendo à solicitação da autora, o texto completo será disponibilizado somente após a publicação desse trabalho.

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 Hsc1 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

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

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

## LISTA DE TABELAS

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

## 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. <sub>600nm</sub> | 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 <sub>4</sub>     | 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 <sup>Met</sup> | 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 |



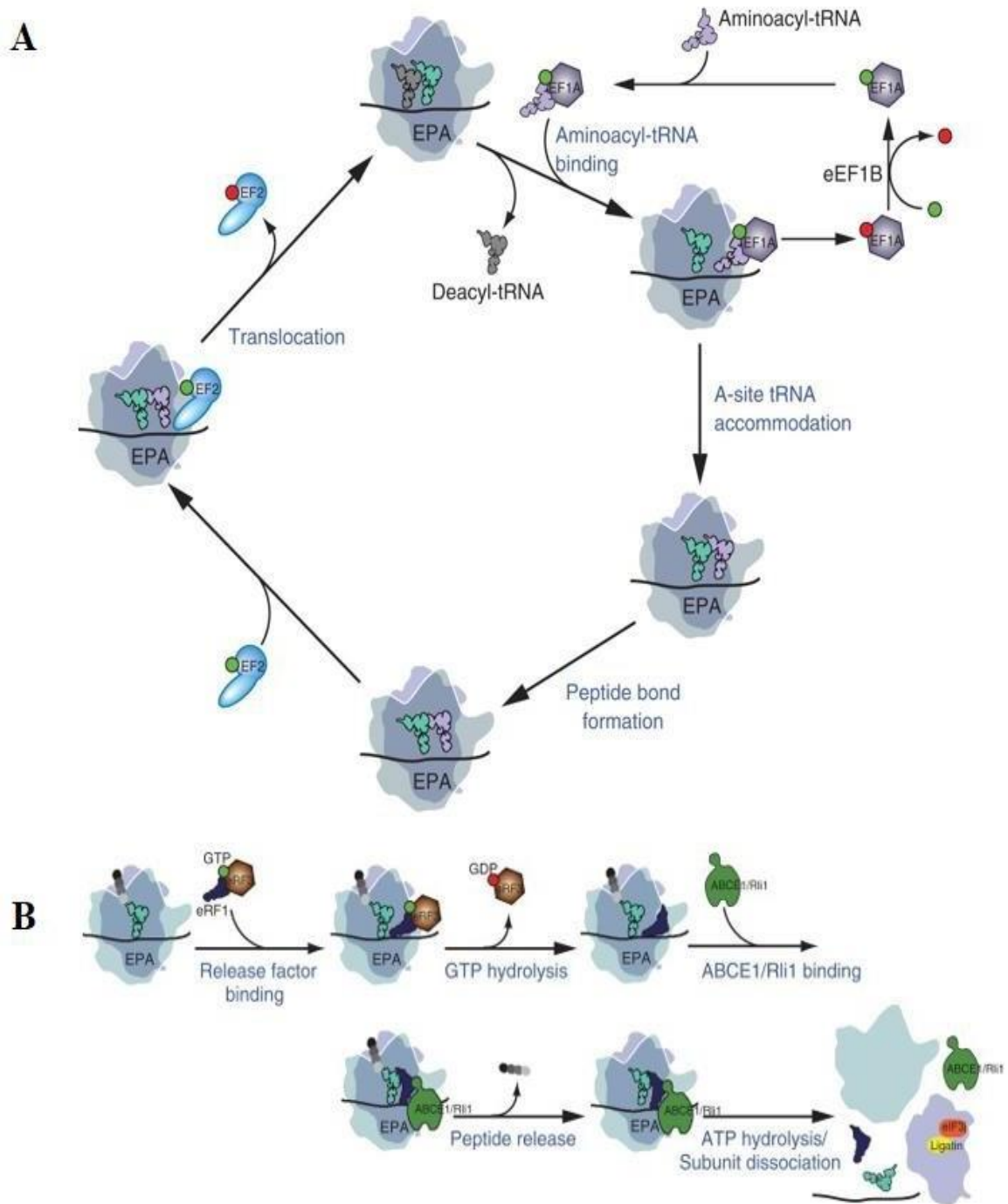
|                                                                                                                  |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.1.1. Análise dos níveis de mRNA de Hac1 em um mutante 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  |
| ANEXO 1 .....                                                                                                    | 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<sup>Met</sup> 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).

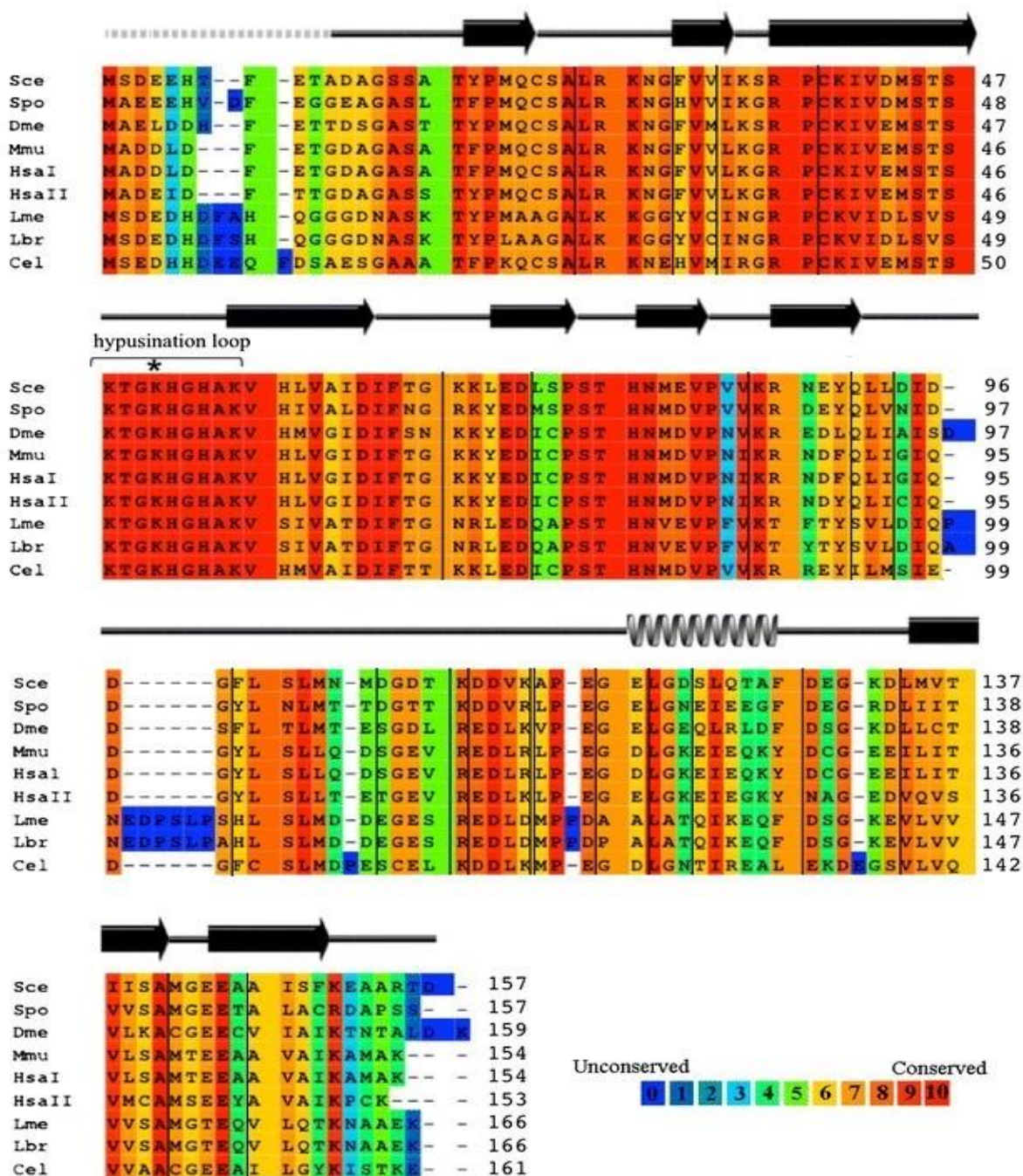
O processo de tradução, assim como outros processos básicos da expressão gênica, apresenta componentes conservados ao longo da evolução (OUZOUNIS; KYRPIDES, 1996; OLSEN; WOESE, 1997). O fator de tradução de eucariotos 5A (eIF5A – *eukaryotic translation initiation factor 5A*) corresponde a um exemplo 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.**

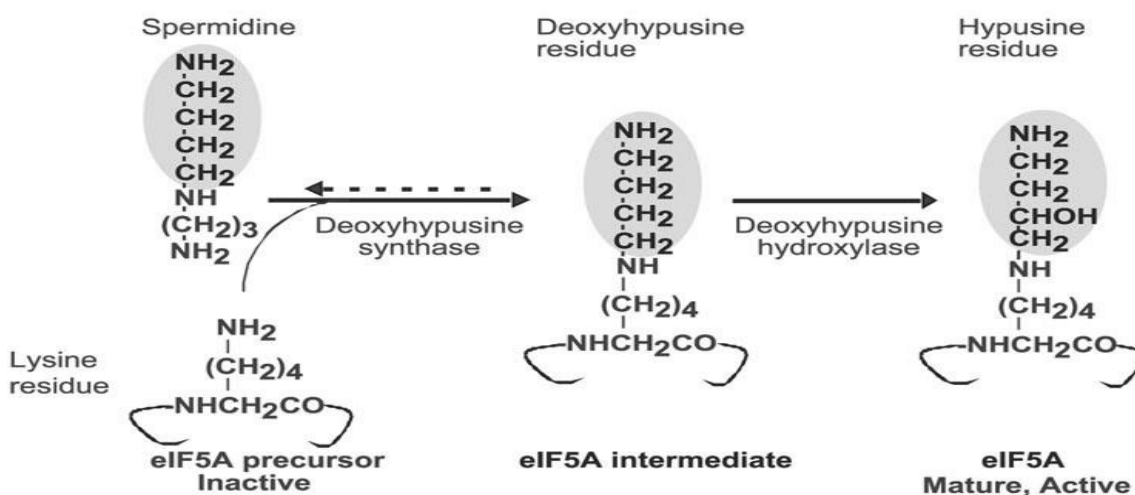


Sequências de aminoácidos da proteína eIF5A dos eucariotos *Saccharomyces cerevisiae* (Sce), *Schizosaccharomyces pombe* (Spo), *Drosophila melanogaster* (Dme), *Mus musculus* (Mmu), *Homo sapiens* (Hsa—isoformas I e II), *Leishmania mexicana* (Lme), *Leishmania braziliensis* (Lbr) e *Caenorhabditis 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.**

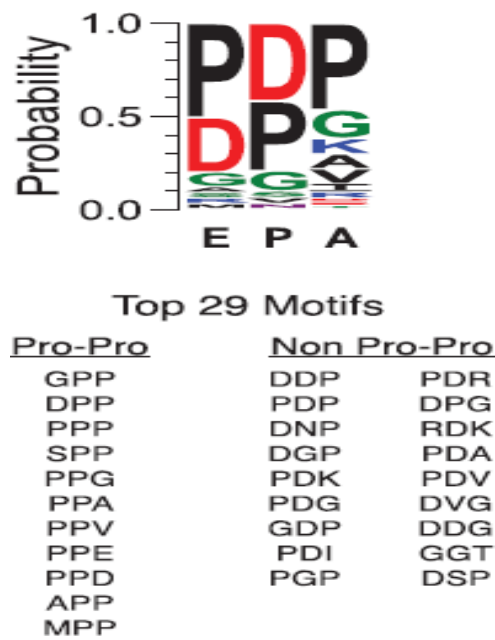


Esquema simplificado da modificação pós-traducional de eIF5A. A porção 4-aminobutil proveniente da poliamina espermidina (região sombreada) é transferida para o resíduo de lisina do precursor inativo de eIF5A, por meio da ação da enzima desoxi-hipusina sintase (Dys1 em *S. cerevisiae*). O intermediário 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<sup>Met</sup> iniciador, atuando na formação da primeira ligação peptídica (BLAHA *et al.*, 2009), e de outros tRNAs, como tRNA<sup>Pro</sup> e tRNA<sup>Gly</sup>, 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).

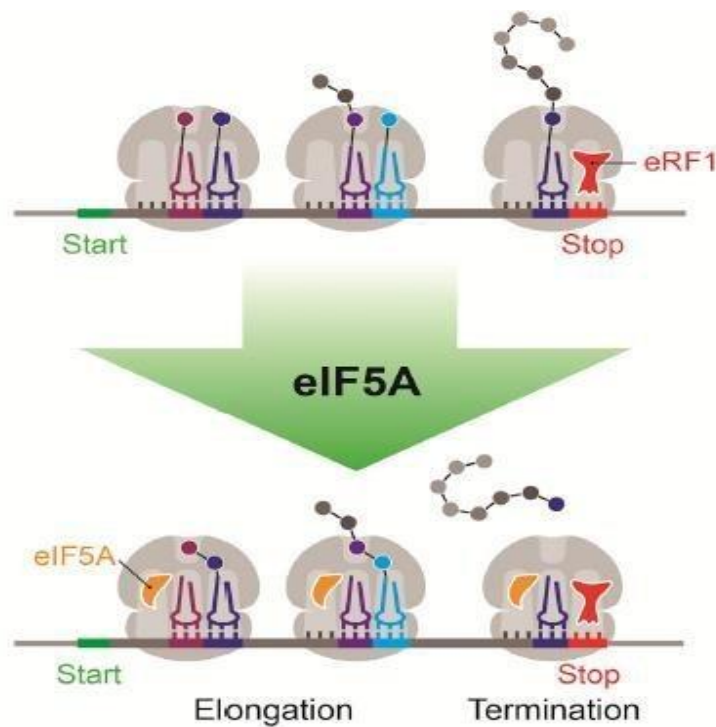
Figura 4 - eIF5A alivia o *stalling* dos ribossomos em vários *motifs* peptídicos além das poliprolinas.



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.

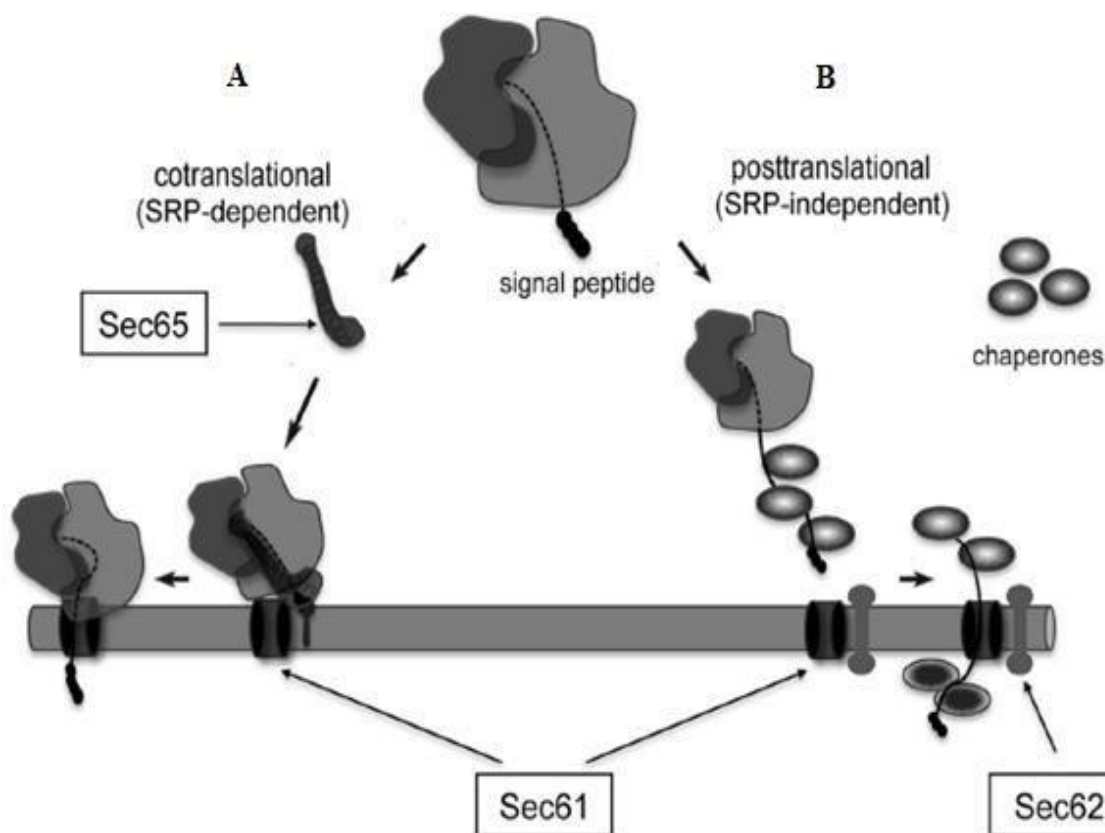
Vale ressaltar ainda que já foram identificadas diversas interações genéticas com eIF5A utilizando-se *S. cerevisiae* como organismo modelo (VALENTINI *et al.*, 2002; ZANELLI; VALENTINI, 2005; FRIGIERI *et al.*, 2007; FRIGIERI *et al.*, 2008; DIAS *et al.*,

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.**

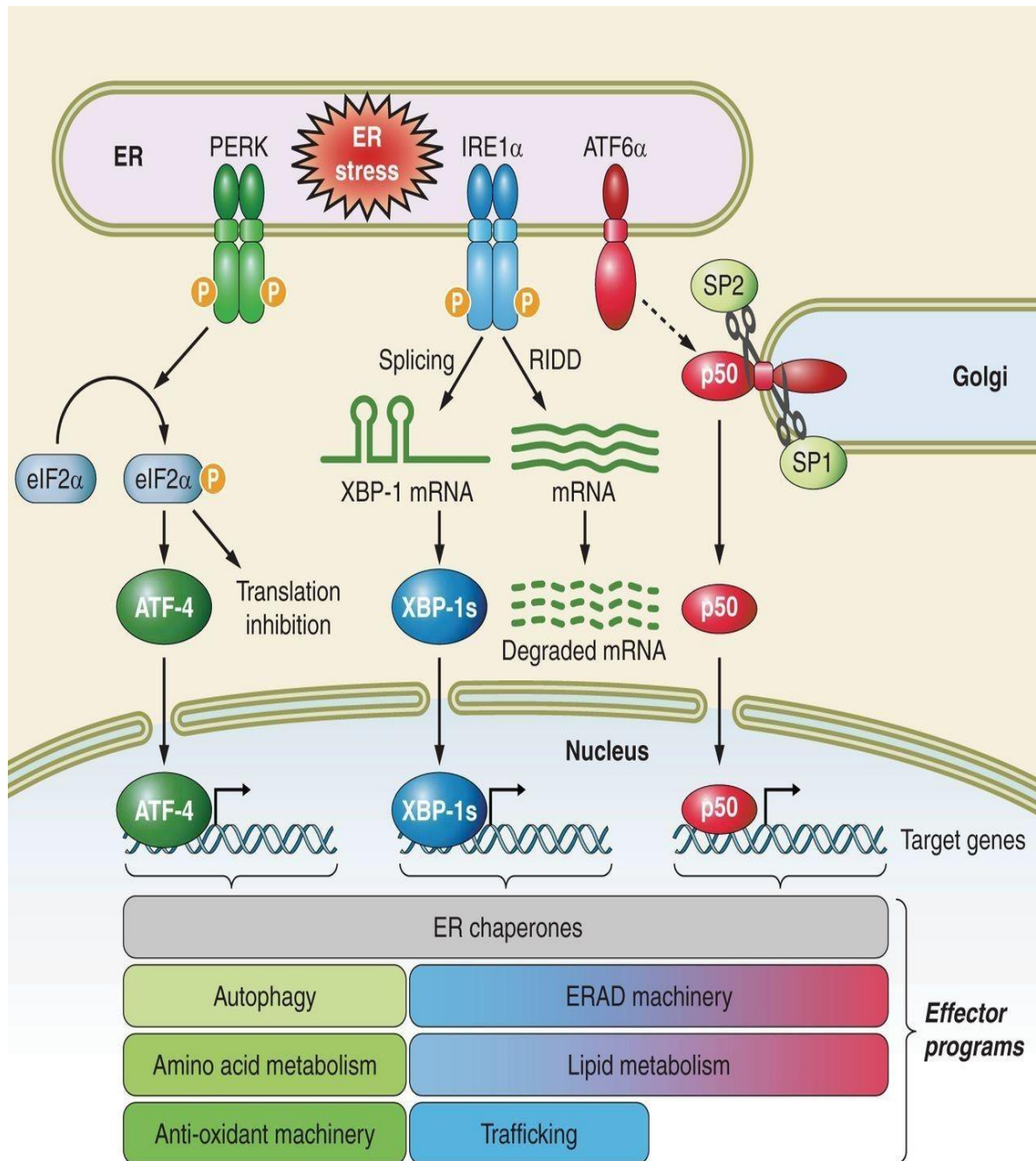


**(A)** Via co-traducional. A sequência sinal sintetizada sinaliza para ligação com o complexo SRP (*signal recognition particle*), que executa uma parada temporária na elongação da tradução. Em seguida, SRP interage com seu receptor na membrana do RE e promove a interação ribossomo-translocon. Uma vez 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 $\alpha$ , 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).

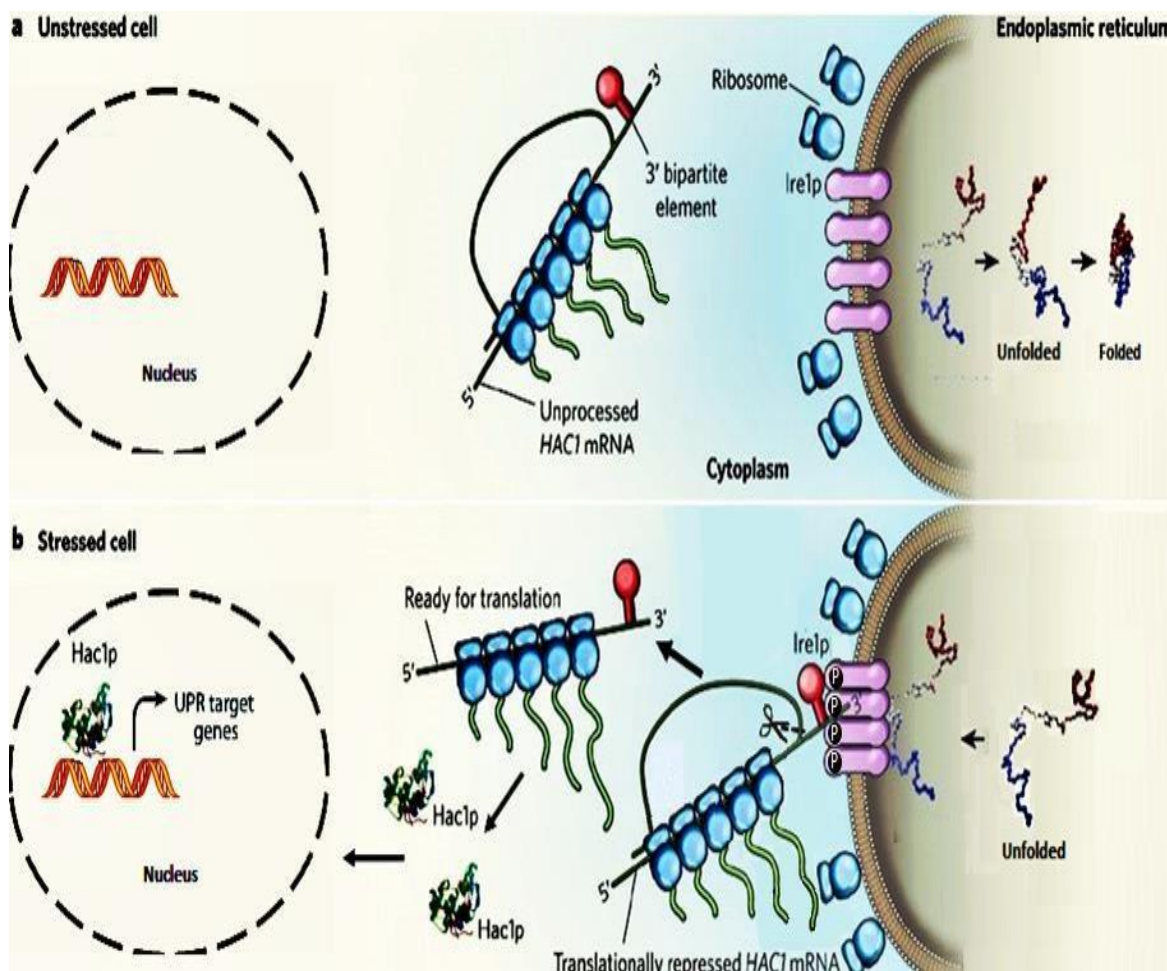
**Figura 7 - Mecanismo de ação dos três principais braços da via UPR em eucariotos superiores.**



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.

## 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](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)- $\beta$ -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](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](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](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](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](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](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> >.