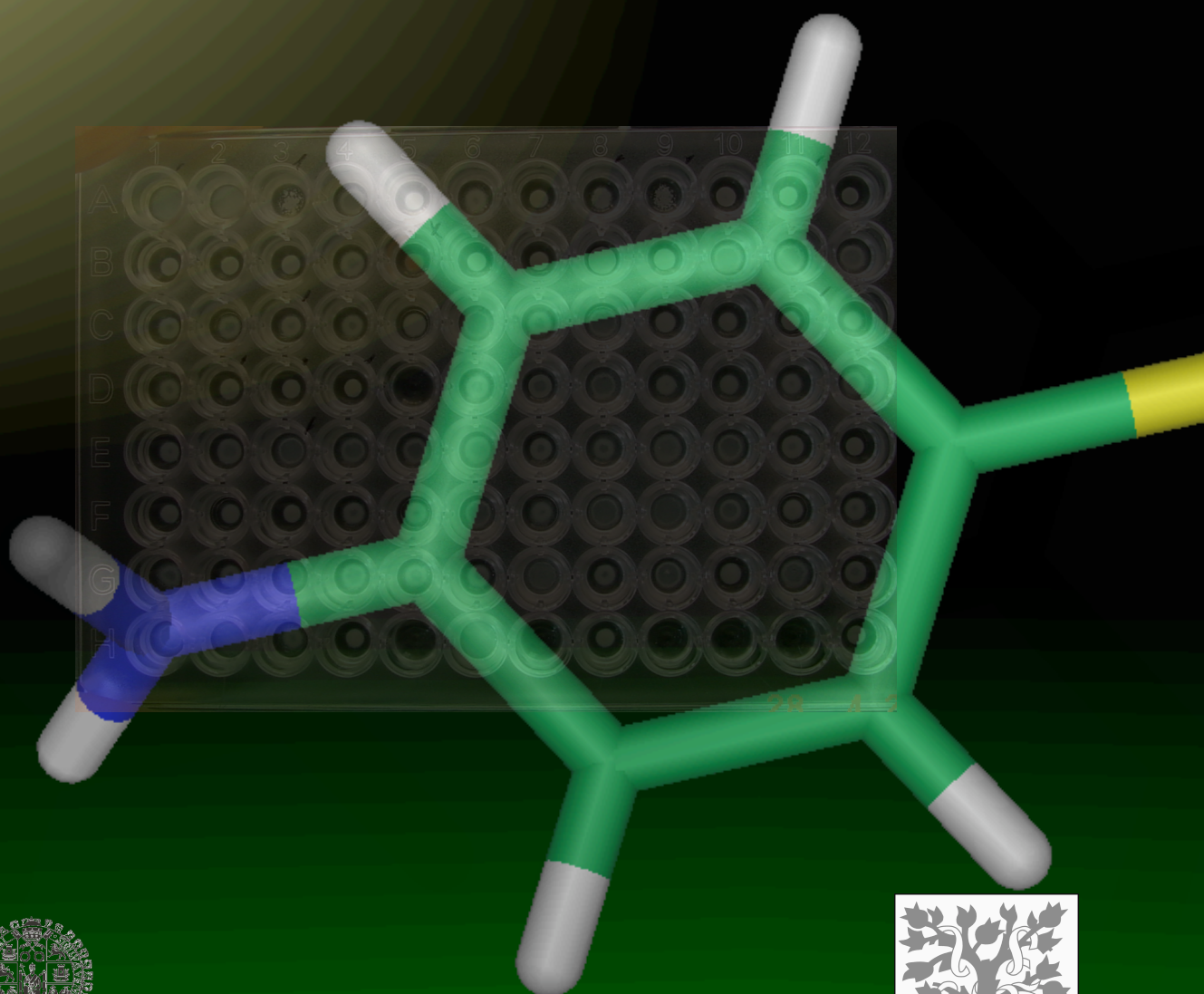


Tesis Doctoral 2009
Javier Botet Rodríguez

Perfiles de Interacción Químico-Genómicos en *Saccharomyces cerevisiae*: Respuesta a Agentes Estresantes



UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA

Universidad de Salamanca-CSIC
Departamento de Microbiología y Genética
Instituto de Microbiología Bioquímica



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Departamento de Microbiología y Genética
Instituto de Microbiología Bioquímica (USAL/CSIC)



Perfiles de Interacción Químico-Genómicos en *Saccharomyces cerevisiae*: Respuesta a Agentes Estresantes

Tesis Doctoral
Javier Botet Rodríguez

Salamanca, 2009

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Departamento de Microbiología y Genética
Instituto de Microbiología Bioquímica (USAL/CSIC)

**Perfiles de Interacción Químico-Genómicos en
Saccharomyces cerevisiae: Respuesta a
Agentes Estresantes**

Memoria presentada por Javier Botet Rodríguez para optar al
grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Salamanca, 16 de Septiembre de 2009

D. Ángel Domínguez Olavarri, Catedrático de Microbiología y Director del Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de Salamanca,

CERTIFICA

Que la memoria titulada “Perfiles de Interacción Químico-Genómicos en *Saccharomyces cerevisiae*: Respuesta a Agentes Estresantes”, presentada por el licenciado Javier Botet Rodríguez para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, ha sido realizada bajo la dirección del Dr. José Luis Revuelta Doval, en el Instituto de Microbiología Bioquímica, centro mixto de la Universidad de Salamanca (Departamento de Microbiología y Genética) y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, firmo el presente certificado en Salamanca, a 16 de Septiembre de 2009.

Fdo. Dr. Ángel Domínguez Olavarri

**D. José Luis Revuelta Doval, Catedrático de Genética del
Departamento de Microbiología y Genética de la Universidad de
Salamanca,**

CERTIFICA

Que el licenciado Javier Botet Rodríguez ha realizado el trabajo titulado “Perfiles de Interacción Químico-Genómicos en *Saccharomyces cerevisiae*: Respuesta a Agentes Estresantes” bajo mi dirección, el Instituto de Microbiología Bioquímica, centro mixto de la Universidad de Salamanca (Departamento de Microbiología y Genética) y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, firmo el presente certificado en Salamanca, a 16 de Septiembre de 2009.

Fdo. Dr. José Luis Revuelta Doval

Agradecimientos

Hoy, día “de la Vega” del año 2009, me dispongo a escribir la última página de esta tesis, que ha costado lo suyo pero aquí está, por fin.

Desde estas páginas me gustaría agradecer a todos aquellos que, de una manera u otra, me han animado a empezar esta aventura de la Ciencia, así como a los que han hecho posible que este trabajo se llevara a término.

Todo comenzó hace muuuuchos años, allá por los 80, cuando mis padres me regalaron un microscopio que acabó de avivar mi, por entonces incipiente, vocación científica. Gracias a mis padres, y en especial a mi madre, por apoyarme y animarme a empezar en esto de la Ciencia. Fueron duros los momentos de incertidumbre, cuando cursaba Económicas, y en los que me replanteaba el futuro. Gracias por su cariño y comprensión, a ellos, a mis hermanos, y a toda la familia.

Me gustaría agradecer al Jefe, la oportunidad de realizar esta tesis en su laboratorio y por su confianza en mí y en el trabajo que aquí se presenta. Aunque los dos primeros años fueron un tanto frustrantes, detrás de la transformación de un “bicho” impronunciable, ese “batacazo” me permitió entrar en este proyecto, arduo, pero apasionante. Gracias José Luis por darme la oportunidad de trabajar en él.

Especial agradecimiento a todo el Laboratorio 323, allí donde empecé “mi carrera” científica. A todos mis compañeros y maestros de poyata: desde los que empezamos juntos (Mon, Laura, Cristinita), compañeros de alegrías y adversidades; a los “veteranos” que nos introdujeron en el día a día del laboratorio (Rocío, Alberto, Jorge, J. Antonio), siempre dispuestos ayudarnos; y a los que con su buen hacer nos hicieron el trabajo más fácil (Montse, Lola). Y en especial a Angie, por todos sus consejos, su dedicación, paciencia y lecciones de genética. Gracias a todos por los momentos buenos que pasamos dentro y fuera del laboratorio.

A toda la gente de mi “segundo” laboratorio. A Sergio, por darme la oportunidad de seguir haciendo lo que me gusta, por seguir enseñándome ciencia y por acercarme el mundo “pombiano”. A todas “las niñas”, presentes y pasadas, por su alegría y los buenos ratos que me han hecho pasar en el laboratorio, por su ayuda, sus consejos y su apoyo...y a ti también Juan.

A todos los compañeros del IMB y del CIC, vecinos de laboratorio y de pasillo, que en distinta medida han contribuido a que el día a día fuera más ameno, con los que he compartido charlas, comidas, cafés y celebraciones. Gracias al equipo de fútbol de Precarios por esos derbis tan emocionantes; y a Quimera por introducirme en el mundo del Ultimate, una de las mejores terapias para despejar cuerpo y mente.

A todos mis amigos, por estar siempre ahí. A los que están cerca y a los que están lejos (se os echa de menos...). Por todas las buenas experiencias que hemos compartido, las conversaciones animadas en “el Homer”, las reuniones gastronómicas, las “mojitadas” del Badahó, los debates existenciales, las fiestas de disfraces, las jamonadas, las excursiones y, como no, la peregrinación anual a Navarredonda (¡que locura de verbenas!). Gracias también por vuestro ánimo y apoyo en los momentos menos buenos, por las risas y por alegrarnos la vida. Es una suerte el haber dado con tanta buena gente.

Objetivos

A los “malaguitas”, amigos desde el cole y que aún no saben que demonios hago en el laboratorio. Aliquindoi!!!.

A mi familia “Salmantina”, Isabel, Paco y Paula, por abrirme su casa, cuidarme y “cebarme” como a un hijo durante todos estos años...así estoy de bien criado...

Por último, a María, por su cariño, por animarme siempre, por su apoyo, su paciencia infinita, y por aguantarme en los momentos chungos. ILU amore.

**“Lo que sabemos es una gota de agua;
lo que ignoramos es el océano”**

Isaac Newton

”Sin duda no hay progreso”

Charles Robert Darwin

A María

A mis padres y a mis abuelos

Índice de Contenidos

Introducción	1
I. La levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo	1
II. El genoma de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
III. Tecnologías exhaustivas de alto rendimiento en <i>S. cerevisiae</i> : “Ómica”	5
1.- Componentes	5
1.1- Estrategias Genómicas	5
1.2- Estrategias Transcriptómicas	7
1.3- Estrategias Proteómicas	8
1.4- Estrategias Metabolómicas	8
1.5- Estrategias “Localizómicas”	9
2.- Interacciones o Interactoma	9
2.1- Interacciones Proteína-DNA	9
2.2- Interacciones Proteína-Proteína	10
3.- Estados Funcionales o Fenómica	11
3.1- Colecciones de Mutantes Desarrolladas en la Levadura y su Aplicación a Estudios Fenómicos	11
3.1.1- Colecciones de Mutantes por Transposición	11
3.1.2- Colecciones de Mutantes de Delección	12
3.2- Interacciones Genéticas	22
3.2.1- Sintéticos Letales	22
3.2.2- Supresión y Letalidad Sintética Dependiente de Dosis Génica	26
IV. Integración de datos “ómicos”: métodos bioinformáticos y construcción de bases de datos	28
1.- Bases de Datos Biológicas	28
2.- Métodos Bioinformáticos	29
3.- Herramientas Bioinformáticas	30
V. Análisis químico-genómicos en <i>S. cerevisiae</i>	34
1.- Químico-Genómica: una Estrategia Emergente para Descubrir Nuevas Drogas e Identificar sus Dianas Moleculares	34
2.- La Levadura como Modelo en Escrutinios Químico-Genómicos	35
2.1- Target-Based Screenings. “Químico-Genómica Reversa”	35

2.1.1- Tres Híbridos	35
2.1.2- Chip de Proteínas	36
2.1.3- Escrutinios de Supresión de Toxicidad (TSB, de “ <i>Toxicity-suppression profiling</i> ”)	36
2.2- Cell-Based Screenings. “Químico-Genómica Directa”	36
2.2.1- Escrutinios “Clásicos”	36
2.2.2- Escrutinios Basados en Aproximaciones Fenómicas	37
* Escrutinios Químico-Genómicos Basados en Colecciones de Mutantes	37
* Métodos de Detección:	39
* Interpretación de los Resultados y Estrategias de Análisis	41
* Perspectivas Futuras	43

Objetivos **47**

1.- Contexto del Trabajo 47

2.- Objetivos 48

Estrategia Experimental y Métodos **53**

1.- Experimentos Piloto para Seleccionar las Condiciones y Concentraciones Óptimas que Inducen el Fenotipo de Interés 54

1.1- Condiciones Experimentales 54

1.2- Selección de las Concentraciones de Compuesto Óptimas 54

2.- Escrutinio Sistemático de la Colección de Cepas Deletantes de *Saccharomyces cerevisiae* Frente a Agentes Estresantes 55

3.- Selección y Validación de las Potenciales Dianas y Rutas Biológicas 58

4.- Análisis Bioinformático de los Datos Obtenidos 58

4.1- Bases de Datos 58

4.2- *Gene Ontology (GO)* 59

4.3- Redes de Interacciones Moleculares 60

4.4- Agrupaciones Jerárquicas (“*Hierarchical Clustering*”) 60

5.- Materiales 61

5.1- Compuestos Utilizados 61

5.2- Microorganismos Utilizados 61

6.- Métodos Adicionales 63

6.1- Ensayos de Crecimiento en Sólido: Diluciones en Gota 63

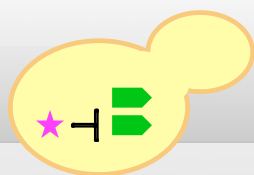
6.2- Escrutinio Sistemático de la Colección de Mutantes de Delección de *S. cerevisiae* en Medio Sólido con Rojo Congo 63

6.3- Ensayos de Fidelidad de la Traducción 64

6.4- Ensayos de Incorporación de Edelfosina-³H a Gran Escala en *S. cerevisiae* 64

Resultados y Discusión	69
Capítulo I: Sulfanilamida	73
1.- Sulfanilamida: Antecedentes y Objetivos	73
3.- Los Folatos y su Biosíntesis	73
2.- Sulfanilamida	74
4.- Caracterización de <i>ORFs</i> de Función Desconocida	76
▶ Artículo (Botet et al., 2007)	77
Capítulo II: Sordarina	89
1.- Sordarina: Antecedentes y Objetivos	89
2.- Efectos de la Sordarina en Hongos y Levaduras	89
3.- La Elongación de la Traducción	90
4.- El Factor de Elongación 2 (eEF2/EF-G)	91
5.- El Mecanismo de Translocación	92
5.1- El Estado Híbrido y el Movimiento de Rotación (“ <i>ratcheting</i> ”) de la SSU	92
5.2- Mecanismo de Hidrólisis del GTP	93
5.3- Rotación de la Cabeza de la SSU, una Etapa Crucial en la Translocación	94
6.- Cambios Estructurales en eEF2 durante la Translocación	94
7.- El Dominio IV de eEF2 y el Residuo de Diftamida	97
8.- El Sitio de Unión de la Sordarina a eEF2	97
8.1- El Bolsillo de Unión de la Sordarina	98
8.2- eEF2•Sordarina en el Contexto Ribosómico	99
9.- Unión de Ribonucleótidos a eEF2	99
▶ Artículo (Botet et al., 2008)	101
• Material Adicional	108
Capítulo II: Sordarina Resultados y Discusión Adicionales	113
1.- La Ruta de Síntesis de Diftamida: Antecedentes y Contexto	113
2.- La Ausencia de Diftamidación No Afecta al Crecimiento de la Levadura	114
3.- Sensibilidad a Aminoglicósidos y a Otros Agentes que Generan Estrés Traduccional	116

4.- Los Cambios de Fase de Lectura durante la Traducción	129
4.1- La Ruta de Duftamidación y el Cambio de Fase de Lectura de la Traducción	129
4.2- La Sordarina y el Cambio de Fase de Lectura de la Traducción	132
5.- Las Dph y el Posible Papel Molecular de la Diftamida	134
5.1- Las Dph	134
5.2- Interacciones Físicas y Genéticas de las Dph	135
5.3- Regulación de los Genes <i>DPH</i> y de las Proteínas que Codifican	136
5.4- Hipótesis acerca del Posible Papel Molecular y Fisiológico de la Diftamida	139
Capítulo III: Ácido Micofenólico y 4-NQO	145
1.- Ácido Micofenólico y 4-Nitroquinolina 1-óxido: Antecedentes y Objetivos	145
2.- El Ácido Micofenólico, un Inhibidor de la IMPDH	145
3.- El 4-NQO, un Carcinógeno Modelo que “Mimetiza” a la Luz UV	146
4.- Reparación de DNA Acoplada a la Transcripción	146
▶ Artículo (Gaillard et al., 2009)	149
• Material Adicional	165
Conclusiones	193
<hr/>	
Bibliografía	197
<hr/>	



Introducción

I. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo

Saccharomyces cerevisiae, comúnmente conocida como la “levadura de gemación”, ha sido empleada durante siglos para la elaboración del pan, la cerveza y el vino, entre otros productos obtenidos por fermentación (Samuel, 1996; Vaughan-Martini and Martini, 1995). Descubierta y nombrada por Meyen (Meyen, 1838), su nombre deriva del griego “*saccharomyces*” que significa “hongo del azúcar” y del latín “*cerevisiae*” que significa “de la cerveza”; no fue hasta los estudios sobre la fermentación, realizados por Pasteur en 1872 (Pasteur, 1872), cuando la levadura comenzó a tener mayor influencia en el mundo científico. En los años 30 y 40 aparecieron los primeros estudios genéticos en la levadura, realizados por Winge y Lindegren, considerados “los pioneros” de la genética de la levadura (revisado por Hall and Linder, 1993)). Uno de los hitos más importantes que han hecho de *S. cerevisiae* un **organismo modelo universal** para estudios genéticos, bioquímicos y biotecnológicos en eucariotas, fue el desarrollo a finales de los 70 de un sistema de transformación en la levadura, que permitió por vez primera, que material genético exógeno en forma de DNA plasmídico se introdujera y se mantuviera de forma estable en células eucariotas (Beggs, 1978; Hinnen et al., 1978). Este hecho abrió el camino para el desarrollo de herramientas genéticas más sofisticadas que han permitido la manipulación de la célula a cualquier nivel estructural y funcional.

El hecho de que *S. cerevisiae* haya sido el organismo modelo empleado en nuestro trabajo, se debe en gran parte a que presenta una serie de **ventajas** (Cuadro 1) que han hecho que este eucariota unicelular sea considerado un organismo modelo para estudios biológicos y genómicos:

- Es un organismo unicelular no patógeno, de crecimiento rápido y en condiciones de cultivo simples, económicas, controladas y reproducibles. Crece como células dispersas en medio líquido o como colonias aisladas en sólido, lo que permite un fácil aislamiento de sus mutantes. Puede crecer tanto aeróbica como anaeróticamente dependiendo de la fuente de carbono empleada, lo que hace de la levadura un organismo ideal para el estudio de proteínas mitocondriales implicadas en la respiración. Además, aunque se trata de un organismo unicelular, se pueden inducir algunas características propias de organismos pluricelulares, como crecimiento pseudohifal, señalización intercelular y muerte celular programada.
- Debido a que puede crecer y dividirse de forma estable como célula haploide, las mutaciones recesivas son fácilmente analizables. Además tiene un ciclo sexual diploide estable, lo que permite a los investigadores realizar análisis genéticos como estudios de complementación, recombinación y epistasia.
- Aunque posee la complejidad genética de los organismos eucariotas, su genética, bioquímica y fisiología está muy bien caracterizada (Broach et al., 1991) y se han desarrollado múltiples herramientas que permiten su sencilla manipulación genética. Entre ellas destaca, como hemos comentado anteriormente, la disponibilidad desde hace varias décadas de un sistema de transformación sencillo, muy eficaz, y versátil; con plásmidos lineales o circulares, en alto o bajo número de copias, con promotores regulables y selección positiva o negativa (Sikorski and Hieter, 1989).

- La existencia de este tipo de herramientas, hace posible la expresión controlada de proteínas heterólogas bajo condiciones de cultivo definidas, convirtiendo a la levadura en un organismo modelo ideal para el análisis funcional de genomas. En cuanto a su utilización biotecnológica como fábrica de moléculas recombinantes, la levadura ha sido de gran utilidad para la preparación de proteínas recombinantes de uso comercial. Su importancia queda ilustrada por el hecho de que la primera vacuna recombinante para humanos aprobada contra la hepatitis B (McAleer et al., 1984), y el primer producto alimentario recombinante aprobado, la renina, utilizado en la fabricación de queso (Mohanty et al., 1999) fueron producidos en sistemas de levaduras.
- Otra de las ventajas añadidas, es la alta tasa de recombinación homóloga que presenta, lo que permite la integración del DNA transformante en la localización cromosómica exacta reemplazando el gen deseado con un marcador de selección o con un alelo mutante (Rothstein, 1991), o introduciendo promotores regulables o etiquetas moleculares (GFP, GST, 3HA, 13Myc, etc) (Longtine et al., 1998).
- La conservación evolutiva de las rutas biológicas es la base implícita de los modelos genéticos, como el ratón (*Mus musculus*), la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), el nematodo (*Coenorhabditis elegans*), el pez cebra (*Danio rerio*), la levadura de fisión (*Schizosaccharomyces pombe*) y la propia levadura de gemación. La mayoría de los procesos celulares básicos están altamente conservados desde el hombre a la levadura, especialmente en lo que se refiere al metabolismo y la división celular, habiéndose descrito hasta un 30% de genes implicados en enfermedades humanas que están conservados en la levadura (Bassett et al., 1997; Foury, 1997). Esta conservación evolutiva ha convertido a la levadura en un excelente modelo para comprender el desarrollo de enfermedades, como por ejemplo el síndrome de Werner asociado al envejecimiento prematuro (Sinclair et al., 1997), así como para estudiar la respuesta celular a agentes citotóxicos. De hecho, la diana celular de la rapamicina, un agente inmunosupresor empleado para evitar rechazos en operaciones de trasplantes, fue identificada en la levadura y posteriormente verificada en humanos (Heitman et al., 1991).

Cuadro 1. Características que hacen de *S. cerevisiae* un organismo modelo en eucariotas

- Organismo unicelular, con las características propias de eucariotas: orgánulos, regulación del ciclo celular, envejecimiento, apoptosis, transducción de señales, etc.
- Tiempo de generación corto (aproximadamente 1,5 horas), con una alta densidad celular (>10⁸ células/ml)
- Bioquímica y fisiología bien conocidas (enzima="en levadura")
- Genética mendeliana (ciclo de vida sexual, análisis de tétradas)
- Gran variedad de vectores que permiten la expresión condicional o constitutiva de genes homólogos o heterólogos
- >20 años de uso como sistema de expresión de genes heterólogos
- Alta tasa de recombinación homóloga
- Secuencia completa del genoma disponible desde 1996
- Alto grado de conservación de la maquinaria celular básica de eucariotas superiores
- Comunidad científica amplia, bien organizada, abierta al intercambio de datos y material, y cooperativa
- Colección completa de mutantes de delección
- Colección de proteínas marcadas con diferentes epítomos (GFP, GST, 3HA, 13Myc, etc)
- Gran desarrollo de estrategias y tecnologías post-genómicas ("microarrays" de DNA o de proteínas, sintéticos letales, etc.)
- Bases de datos actualizadas, fiables y generalmente de libre acceso. Nomenclatura sencilla y aceptada

II. El genoma de *Saccharomyces cerevisiae*

Durante la última década se ha producido una profunda transformación en el campo de la genómica, fruto en gran parte de un amplio esfuerzo internacional que llevó en 1996, a la **secuenciación del genoma** completo de *Saccharomyces cerevisiae* (Goffeau et al., 1996), constituyendo el primer genoma eucariota secuenciado. En la actualidad se siguen secuenciando los genomas de múltiples organismos, incluido el genoma humano cuyo primer borrador apareció en el año 2001 (Lander et al., 2001; Venter et al., 2001).

S. cerevisiae tiene 16 cromosomas (Cherry et al., 1997), en los que está empaquetado un genoma compacto de **12 megabases** (Mb), un 0,4% del tamaño del genoma humano (3,2 Gb). En él se han identificado un total de **6607 fases de lectura abierta** (ORFs, de “*Open reading frames*”), con un tamaño medio de 1,5 Kb, de las cuales únicamente el 4% presenta intrones, mayoritariamente en forma de un único intrón localizado en el extremo 5' del gen (Goffeau et al., 1996) (Tabla 1). Aproximadamente 500 ORFs se encuentran por duplicado, y son el resultado de la duplicación del genoma y posterior pérdida del 90% de los *loci* que existían en la “levadura ancestral” (Wolfe, 2004). Aproximadamente la mitad de los ORFs identificados durante la secuenciación de su genoma no presentaban genes homólogos en las bases de datos. Esta situación ha cambiado sustancialmente debido a la reciente secuenciación de gran cantidad de genomas eucariotas y procariontes, de modo que se estima que en la actualidad el 90-95% de los ORFs presentan homología con alguna proteína identificada, de los que aproximadamente el 25% corresponde a homólogos únicamente en otros ascomicetos (Malpertuy et al., 2000).

Algunos ascomicetos son patógenos y provocan infecciones, especialmente en individuos inmunocomprometidos, que representan un grave problema hospitalario. Por este motivo, la identificación de **genes específicos** de ascomicetos, y de forma particular aquellos genes que son esenciales para la viabilidad de la levadura pero ausentes en el hombre, es de gran interés ya que representan potenciales dianas contra las que desarrollar nuevos compuestos con actividad antifúngica, que permitirán aplicar tratamientos clínicos más seguros y efectivos contra estas infecciones (Odds et al., 2003). Por otra parte los **genes** de la levadura **conservados en el hombre** son una base importante para adentrarnos en el estudio de enfermedades, y hacen de ésta un sistema modelo para el estudio de procesos celulares

Tabla 1. Organización del genoma de *Saccharomyces cerevisiae*

Características	Total	Cromosoma																Genoma Nuclear	Genoma Mitochondrial
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI		
ORFs Totales	6607	117	456	183	836	324	141	583	321	241	398	348	578	505	435	598	511	6575	28
ORFs verificados	4821	74	334	124	634	228	97	436	224	165	295	271	392	375	322	442	387	4800	17
ORFs sin caracterizar	975	18	66	34	103	45	27	81	53	41	56	41	108	77	68	86	69	973	2
ORFs dudosos	811	25	56	25	99	51	17	66	44	35	47	36	78	53	45	70	55	802	9
Pseudogenes	21	2	0	2	1	0	0	0	0	9	0	0	2	0	1	1	3	21	0
ARS	337	11	38	19	40	19	12	28	16	15	25	16	26	25	21	19	27	337	0
Retrotransposones	50	1	3	2	8	2	1	6	2	1	3	0	5	4	3	4	5	50	0
Elementos Ty	89	2	6	2	17	4	2	10	4	1	6	0	8	8	3	8	8	89	0
Ty LTR	383	9	22	20	36	33	11	44	24	10	24	14	32	24	16	32	32	383	0
Centrómeros	16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	16	0
Telómeros	32	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	32	0
"X_element_core_sequence"	32	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	32	0
Repeticiones teloméricas	31	2	1	2	2	0	2	1	3	2	2	2	5	3	2	2	0	31	0
Repeticiones subteloméricas	28	1	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	28	0
Elementos Y	19	0	1	0	1	2	1	1	2	1	1	0	4	1	1	1	2	19	0
tRNA	299	4	13	10	28	20	10	36	11	10	24	16	21	21	14	20	17	275	24
rRNA	27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25	0	0	0	0	25	2
RNA no codificante	13	1	1	0	0	3	4	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	12	1
snRNA	9	1	1	0	0	3	0	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0	8	1
snoRNA	77	1	2	4	4	5	0	6	2	1	5	5	7	13	5	11	6	77	0
Tamaño cromosoma (Kb)	12157	230	813	317	1532	577	270	1091	563	440	746	666	1078	924	784	1091	948	12071	86

La definición de cada característica se puede encontrar en la sección “Glossary” del SGD. Datos obtenidos del SGD el 21-7-2009.

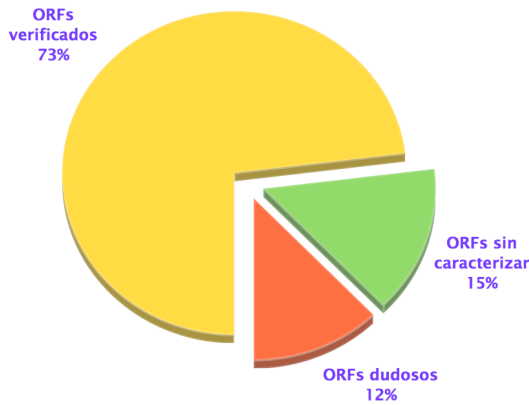


Figura 1. Clasificación de los ORFs identificados en el genoma de *S. cerevisiae*. Entre los 6607 ORFs identificados hasta el momento, el 73% corresponden a ORFs verificados, el 15% a ORFs sin caracterizar y el 12% son dudosos. Se entienden por verificados aquellos ORFs en los que se ha demostrado que codifican una proteína; sin caracterizar son aquellos ORFs que debido a la existencia de ortólogos es probable que sean reales, pero para los que no hay ninguna evidencia experimental que lo demuestre; y son dudosos los ORFs que no están conservados en otras especies del género *Saccharomyces* y para los que no hay ninguna evidencia que avale que codifican una proteína (datos obtenidos del SGD el 21-7-09).

relacionados con enfermedades y de nuevos fármacos que interfieran con estos procesos. Se han descrito alrededor de 2700 genes que codifican proteínas que coinciden al menos en parte de su secuencia primaria con una proteína humana (alrededor 2700 en un *BLASTp* con un *e-value* $<10^{-10}$ y los parámetros por defecto de *BLAST*) (Hughes, 2002), así como cientos de genes de la levadura que tienen ortólogos implicados en enfermedades humanas (Foury, 1997). La mayoría de estos genes son clave en rutas transducción de señales o rutas metabólicas, o cómo se ha descrito recientemente en procesos relacionados con la mitocondria (Steinmetz et al., 2002).

De los 6607 ORFs identificados hasta la fecha, **4821** están **verificados**, **975** están **sin caracterizar** y **811** son **dudosos** (Hirschman et al., 2006) (Fig. 1). El análisis de la distribución de los genes en grupos funcionales, revela que la mayor parte del proteoma de la levadura está implicado en la biogénesis y organización de orgánulos, transporte, transcripción, ciclo celular, síntesis y procesamiento de proteínas, y metabolismo del DNA y RNA. Mientras, otros procesos como la esporulación, la gemación o la meiosis están controlados por un menor número de proteínas. Aunque el número de genes que son caracterizados funcionalmente aumenta rápidamente, todavía existe un **35%** de los que se **desconoce** el **proceso biológico** en el que participan y un **25%** de los que se **desconoce** la **localización** de la proteína que codifican (Fig. 2). Además, para muchos productos génicos, la información biológica disponible es todavía muy escasa y parte de la información obtenida deriva de la comparación de secuencias con otros organismos o de fenotipos poco claros, observados en los correspondientes mutantes.

Uno de los mayores **retos** a los que se enfrenta la **era post-genómica** es la **identificación y caracterización de las funciones** asociadas a todos esos productos génicos; y que puede ser abordado mediante métodos clásicos, bioquímicos y genéticos, o nuevas aproximaciones genómicas.

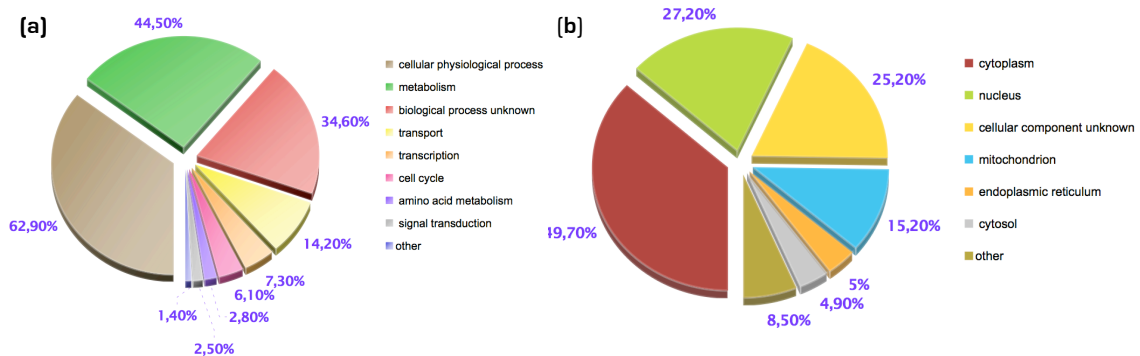


Figura 2. Distribución de los ORFs de *S. cerevisiae* en grupos funcionales generales según el proceso biológico (a), o el componente celular (b), en el que están incluidos en *Gene Ontology*. Se utilizó la opción *Super GO-Slim* de la herramienta *GO Slim Mapper* del SGD.

III. Tecnologías exhaustivas de alto rendimiento en *S. cerevisiae*: “Ómica”

La determinación de cuándo se expresa un gen, dónde se localiza su producto génico en la célula, con quién interacciona y qué ocurre cuando se elimina dicho gen son algunas de las cuestiones básicas que necesitan ser resueltas para determinar la función de todos los productos génicos de un organismo. Todo esto, junto al esclarecimiento de los mecanismos de regulación y las interacciones que se producen, en el espacio y en el tiempo en los diferentes niveles de complejidad permitirá, en última instancia, llegar a comprender el **sistema biológico** desde una perspectiva holística (Ideker et al., 2001; Mustacchi et al., 2006). Obviamente, para acometer dicha tarea se requieren **nuevas aproximaciones experimentales** que proporcionen respuestas a estas cuestiones de una forma rápida, económica y eficiente. La levadura *S. cerevisiae*, por su versatilidad y por las características favorables que han sido comentadas anteriormente, se ha convertido en un excelente modelo para el desarrollo y la implementación de nuevas y avanzadas estrategias y técnicas de análisis a todos los niveles “ómicos”.

El sufijo “-oma” tiene un origen latino que significa “conjunto de”. Así, la adición de este sufijo a diferentes estudios en biología cubre las nuevas aproximaciones masivas en las que se está enfocando ésta disciplina recientemente. Por tanto, la “**ómica**” es el término genérico que describe los grupos de datos a gran escala que están surgiendo como resultado de estudios globales y de alto rendimiento.

La existencia de varios niveles “ómicos” ha conducido a la clasificación de los mismos en tres amplias categorías (Joyce and Palsson, 2006) que se esquematizan en la [Figura 3](#), y que definimos a continuación:

1. Componentes: son los que representan la población de moléculas de la célula o sistema.
2. Interacciones: son las conexiones existentes entre los distintos tipos de moléculas.
3. Estados funcionales: son los que definen sus acciones, los que muestran el comportamiento general o el fenotipo de la célula o sistema.

En esta introducción se pretende proporcionar una guía en el intrincado campo de los escrutinios a gran escala. Por ello, se describirán a continuación las estrategias desarrolladas en *S. cerevisiae* dentro de cada una de las categorías de la “ómica”, y se hará especial hincapié en las distintas aplicaciones basadas en las colecciones de mutantes desarrolladas a lo largo de estos años, ya que han constituido nuestra principal herramienta de trabajo.

1.- Componentes

1.1- Estrategias Genómicas

Se define como **genómica** el estudio de la secuencia del genoma completo y de la información contenida en el mismo, siendo el más maduro de los campos de la “ómica” y el prerequisite para el desarrollo del resto. Los genes son deducidos a partir de la secuencia, traducidos conceptualmente a proteínas y anotados en base a su similitud con proteínas conocidas presentes en las bases de datos. Las secuencias crudas han facilitado el desarrollo de

estudios de **genómica comparada**, que han permitido identificar elementos reguladores y comprender fenómenos de especiación (Cliften et al., 2003; Kellis et al., 2003), y reconstruir en parte la historia evolutiva de los organismos (Delsuc et al., 2005).

La aparición de nuevas tecnologías basadas en la utilización de micromatrices, más conocidas como “*microarrays*”, que abarcan el genoma completo (“*tiling microarrays*”) (Mockler et al., 2005) permiten, entre otros análisis, la identificación de polimorfismos de un solo nucleótido (*SNPs*) entre genomas (Gresham et al., 2006).

Este campo ha sufrido una nueva revolución con la aparición de tecnologías de secuenciación en paralelo a gran escala (“*High-throughput Parallel Sequencing*”), que permiten secuenciar cientos de veces más rápido y a un coste mucho menor que por el método de Sanger (Margulies et al., 2005; Shendure et al., 2005), acercándose al reto de secuenciar un genoma humano por 1000 dólares (Service, 2006).

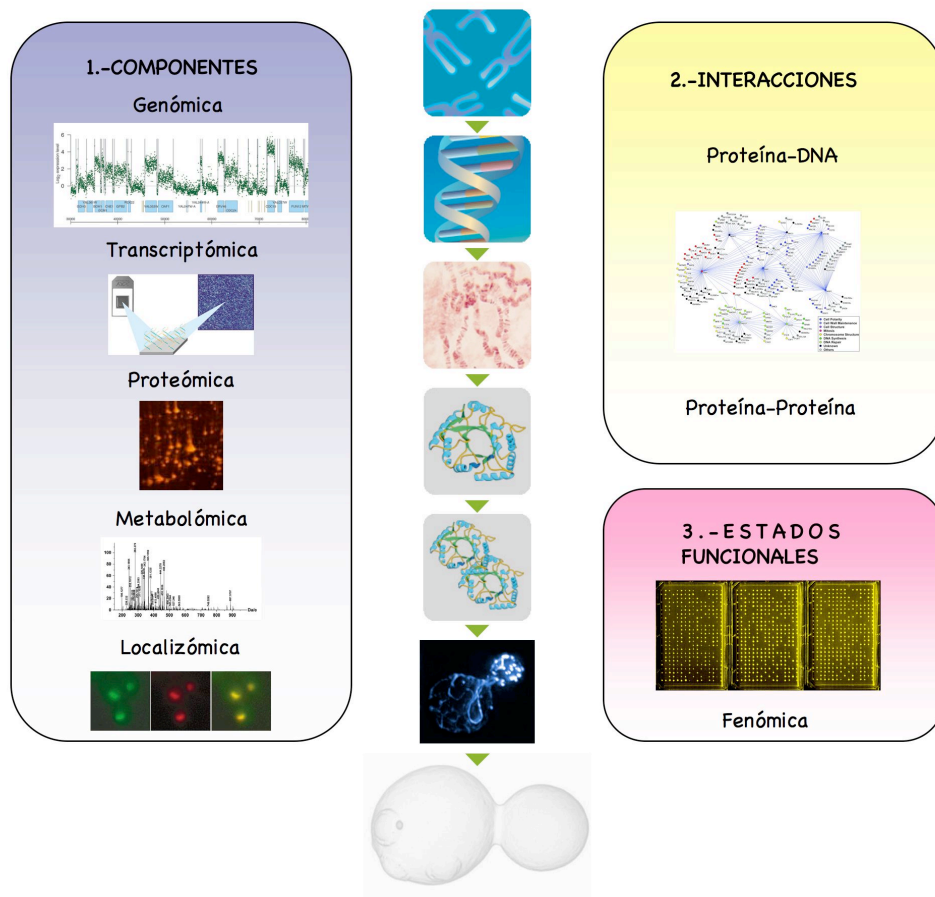


Figura 3. Niveles “Ómicos”. Los datos derivados de estudios “ómicos” proporcionan una descripción exhaustiva de la mayoría de componentes e interacciones celulares. Estos datos pueden ser clasificados en tres categorías generales, cuya definición se incluye en el texto: 1.- Componentes; 2.- Interacciones; y 3.- Estados Funcionales. El diagrama central traza el flujo de información biológica desde el genoma hasta el fenotipo, mientras que los distintos tipos de datos “ómicos” que se emplean para describir estos procesos se indican en los cuadros adyacentes. Desde arriba, el DNA (genómica) se transcribe a RNAm (transcriptómica), el cual se traduce a proteína (proteómica). Las proteínas pueden catalizar reacciones que dan lugar o modifican metabolitos, glicoproteínas y oligosacáridos, y lípidos (metabolómica). Muchos de estos componentes pueden ser etiquetados y localizados en la célula (“localizómica”). Los procesos responsables de generar y modificar los componentes celulares están generalmente dirigidos por interacciones moleculares, proteína-DNA en el caso de la transcripción, y proteína-proteína en cascadas de señalización, en reacciones enzimáticas, etc. Finalmente, las rutas y procesos biológicos forman redes de interacción complejas, los cuales dictaminan el comportamiento celular, o fenotipo (fenómica).

Los avances en las estrategias genómicas de los últimos años, se han visto materializados, entre otros, en el Proyecto Internacional “HapMap” (de “Haplotype Map”) (<http://www.hapmap.org/>) o en el más reciente Proyecto “de los 1000 genomas” (“1000 Genomes Project”) (<http://www.1000genomes.org>). Ambos proyectos, iniciados en 2002 y 2008 respectivamente, tienen como objetivo registrar las mutaciones y variaciones genéticas humanas (haplotipos), mediante el mapeo y comparación de *SNPs* de numerosas muestras de distintas poblaciones (“A haplotype map of the human genome,” 2005). La finalidad última es asociar dichas variaciones genéticas con un fenotipo determinado, de forma que sea posible asociar determinados patrones de variaciones genéticas con la predisposición a padecer ciertas enfermedades, la respuesta a fármacos o a factores medioambientales, así como realizar estudios de genética de poblaciones y evolución.

1.2- Estrategias Transcriptómicas

El objetivo de la **transcriptómica** es la adquisición de información sobre la presencia y abundancia relativa de transcritos de RNA con el fin de determinar el patrón de expresión de todos los genes en un organismo tras cualquier cambio en su estado celular, ya sea debido a una perturbación genética, fisiológica o ambiental. Los niveles de expresión globales pueden ser obtenidos utilizando diferentes técnicas entre las que se incluyen el análisis “clásico” tipo **SAGE** (“Serial Analysis of Gene Expression”) (Velculescu et al., 1995), la tecnología de “**microarrays**” de expresión (basados en cDNAs o en oligonucleótidos), e incluso aplicando las últimas tecnologías de **secuenciación a gran escala** a la secuenciación de **cDNAs** (RNA-Seq) (Nagalakshmi et al., 2008). La levadura ha sido, de nuevo, pionera en este campo ya que fue el primer organismo para el que se desarrolló un “*microarray*” de expresión completo (Lashkari et al., 1997; Shalon et al., 1996). En estas técnicas, los niveles de transcrito de todos los genes, son medidos simultáneamente, bajo cualquier condición y a varios tiempos, para identificar grupos de genes cuya expresión está inducida o reprimida con respecto a la muestra de referencia.

Las aplicaciones de los análisis de expresión génica se pueden dividir en tres áreas principales:

- Aquellas que generan firmas o perfiles transcripcionales específicos que pueden emplearse como fenotipos moleculares detallados. De esta forma, los perfiles de transcripción se pueden emplear para clasificar mutantes de acuerdo con su similitud en el perfil (Eisen et al., 1998; Hughes et al., 2000a), o para evaluar los efectos secundarios de drogas (Marton et al., 1998). Sus aplicaciones más prometedoras son la clasificación de muestras de pacientes en grupos mediante el reconocimiento de patrones transcripcionales compartidos, lo que permite desarrollar y aplicar predictores en prognosis, diagnosis y tratamiento de enfermedades (Golub et al., 1999).
- Aquellas que analizan la transcripción y su regulación. Estas aplicaciones son utilizadas, por ejemplo, para identificar secuencias reguladoras mediante la localización de elementos comunes en las secuencias promotoras de genes con perfiles de transcripción parecidos (Pilpel et al., 2001). Este tipo de análisis han arrojado luz sobre las complejas redes de regulación que controlan la expresión en diferentes condiciones en distintos organismos modelo.

- Aquellas que pretenden determinar la función de los productos génicos. Con estas estrategias se pretende la clasificación de los genes en grupos funcionales en virtud de la semejanza de sus perfiles de expresión obtenidos en una gran variedad de condiciones (Ihmels et al., 2002; Horak and Snyder, 2002). Estas aproximaciones son indirectas, ya que infieren la función a partir de los niveles de RNAm. La propia naturaleza de los RNAm, como intermediarios y transmisores de la información del genoma al proteoma, determina que las modificaciones post-transcripcionales o post-traduccionales no puedan ser capturadas y que este tipo de estudios sean incompletos o defectuosos. No obstante, recientes mejoras en esta clase de estrategias están soslayando algunos de estos impedimentos (Mata et al., 2005).

1.3- Estrategias Proteómicas

La **proteómica** pretende identificar y cuantificar los niveles celulares de cada proteína codificada en el genoma. Los métodos analíticos basados en la electroforesis bidimensional y espectrometría de masas (*MS*) son las estrategias más empleadas (Patterson and Aebersold, 2003). También se han desarrollado métodos western-blot cuantitativos y de alto rendimiento, aunque para su realización se precisan gran cantidad de medios y esfuerzo (Ghaemmaghami et al., 2003). Otras técnicas basadas en el marcaje de las proteínas con etiquetas y *MS* en tándem, pretenden solventar el problema que supone la detección mayoritaria de las proteínas más representadas en las muestras biológicas (Gygi et al., 1999), mientras que nuevas estrategias pretenden profundizar en los efectos de modificaciones post-traduccionales como el recambio proteico (Pratt et al., 2002) o la fosforilación (Ficarro et al., 2002; Gruhler et al., 2005; Knight et al., 2003).

Muy recientemente, nuevas aproximaciones basadas en la detección mediante citometría de flujo de una colección de cepas de *S. cerevisiae* que expresan cada proteína marcada con GFP bajo el control de su propio promotor y en su locus nativo (Huh et al., 2003), suponen un avance sin precedentes en la cuantificación a gran escala y con alta resolución de la abundancia proteica a nivel de una única célula, y permite caracterizar la respuesta celular a nivel proteico frente a perturbaciones en el medio (Newman et al., 2006).

1.4- Estrategias Metabólicas

La **metabolómica** persigue identificar y cuantificar todos los metabolitos de un sistema (célula, tejido u organismo) en una condición dada, así como las variaciones de los mismos en respuesta a estímulos ambientales o perturbaciones genéticas. El metaboloma es el resultado de la integración celular del genoma, proteoma e interactoma (ver más adelante), de forma que no sólo proporciona una lista de los metabolitos en una determinada condición, sino que es también un reflejo directo del estado funcional celular (Nielsen and Oliver, 2005). Por tanto, es considerado el nivel de análisis que más se aproxima al fenotipo celular. Se trata de una de las disciplinas más nuevas en la que los métodos aún están siendo desarrollados y contrastados. Básicamente, estos métodos se basan en el análisis *MS*, en la cromatografía de gases acoplada a *MS* (*GC-MS*), en la espectroscopía por resonancia magnética nuclear y en la espectroscopía vibracional (Dunn et al., 2005).

El análisis de perfiles metabólicos está siendo empleado cada vez con mayor frecuencia en un número creciente de organismos. En la levadura se han utilizado para determinar tanto

los metabolitos internos (“*metabolic fingerprinting*”) (Castrillo et al., 2003), como los secretados al medio (“*metabolic footprinting*”) (Allen et al., 2003) o los metabolitos de rutas específicas a gran escala (Villas-Boas et al., 2005). Sus aplicaciones van desde la clasificación funcional de mutantes (Allen et al., 2003), o la identificación de nuevas funciones génicas (Famili et al., 2003; Raamsdonk et al., 2001), a la identificación de nuevas drogas (Watkins and German, 2002), toxicidad de las mismas e identificación de biomarcadores (Weckwerth and Morgenthal, 2005).

1.5- Estrategias “Localizómicas”

La “**localizómica**” aspira a conocer la localización subcelular de todas la proteínas en la célula, y proporcionar indicios sobre las moléculas con las que interaccionan y sus posibles funciones biológicas. Es un campo que requiere una gran cantidad de trabajo, ya que cada proteína debe ser etiquetada, visualizada por microscopía y asignada, normalmente de forma manual, a una localización subcelular u orgánulo. La levadura también ha sido el primer eucariota en el que se realizaron este tipo de análisis a gran escala. Kumar *et al.* realizaron una primera aproximación parcial empleando como etiquetas los **epítotos** 3HA y V5 (Kumar et al., 2002) . Hoy día, ya se dispone de un análisis completo de la localización de las proteínas de la levadura utilizando como etiqueta la proteína verde **GFP** (Huh et al., 2003). Los datos derivados de ambos ensayos se pueden consultar en las respectivas bases de datos: <http://ygac.med.yale.edu/triples/triples.htm> y <http://yeastgfp.ucsf.edu/>.

2.- Interacciones o Interactoma

2.1- Interacciones Proteína-DNA

Comprende las interacciones fundamentalmente entre factores de transcripción y sus promotores diana. El conocimiento de la estructura de las interconexiones es importante para comprender cómo las células responden transcripcionalmente durante el desarrollo y en respuesta a señales intracelulares, extracelulares e intercelulares. La técnica de **inmunoprecipitación de la cromatina** (*ChIP*) combinada con su posterior análisis mediante “*microarrays*” que cubren todo el genoma, incluyendo las regiones no codificantes (“*tiling microarrays*”) (Mockler et al., 2005), conocida como **ChIP-chip** (Buck and Lieb, 2004), se ha convertido en la herramienta principal para identificar a gran escala los lugares de unión de factores de transcripción a sus secuencias diana. La aplicación sistemática de este método tiene el potencial de identificar los complejos circuitos de regulación transcripcional que existen en la célula (Harbison et al., 2004; Lee et al., 2002); aunque también ha sido aplicada al estudio de otras interacciones proteína-DNA como son las modificaciones de la cromatina (acetilación de histonas y patrón de metilación) (Pokholok et al., 2005; Robyr et al., 2002), los niveles de ocupación de los nucleosomas (Bernstein et al., 2004), o la identificación de los orígenes de replicación (Wyrick et al., 2001). Muy recientemente ha surgido una nueva técnica basada en la **inmunoprecipitación de DNA genómico**, denominada **DIP-chip** (“*DNA ImmunoPrecipitation*”), que presenta algunas ventajas con respecto al clásico *ChIP-chip* (Liu et al., 2005).

2.2- Interacciones Proteína-Proteína

Las interacciones proteicas, bien implicadas en cascadas de señalización, en complejos enzimáticos o en otros procesos celulares, dirigen muchos de los procesos que ocurren en la célula y reflejan la estructura y función de los circuitos celulares. En los últimos años se ha generado una gran cantidad de información sobre las interacciones entre proteínas que proceden de la aplicación de ensayos de **dos híbridos** (Ito et al., 2001; Uetz et al., 2000), y **copurificación por afinidad acoplada a MS** (Gavin et al., 2002; Ho et al., 2002); así como **aproximaciones computacionales** diseñadas para predecir las interacciones proteína-proteína basándose en interacciones conocidas (Ng et al., 2003), estudios filogenéticos (Ramani and Marcotte, 2003), o en el análisis de la estructura tridimensional (Aloy et al., 2004). El conjunto de datos así generado están siendo empleados para deducir la función de proteínas (Vazquez et al., 2003), inferir nuevas interacciones proteína-proteína (Sharan et al., 2005a), revelar la existencia de ortólogos entre especies (Bandyopadhyay et al., 2006), e incluso para identificar moléculas que bloquean determinadas interacciones proteicas (Huang and Schreiber, 1997; Vidal et al., 1996).

Los mayores problemas de esta clase de ensayos es su escasa sensibilidad, ó existencia de muchos falsos negativos (interacciones que no son detectadas pero que ocurren en la célula), y su poca precisión, o existencia de muchos falsos positivos (interacciones detectadas experimentalmente pero que no ocurren en la célula) (Bader and Hogue, 2002; von Mering et al., 2002). Actualmente, se están tratando de solventar estos inconvenientes contrastando los resultados de diferentes ensayos, en el caso de los falsos positivos, y combinando diferentes estrategias y tecnologías para cubrir el mapa completo de interacciones proteicas y reducir así los falsos negativos. Un ejemplo de estas mejoras son los nuevos ensayos publicados por dos grupos independientes a principios de 2006, los cuales son más fiables y presentan mayor cobertura, a la vez que definen nuevos complejos proteicos y profundizan en el conocimiento de la organización modular de la maquinaria celular de *S. cerevisiae* (Gavin et al., 2006; Krogan et al., 2006). Los resultados de estos ensayos han sido analizados conjuntamente, con objeto de obtener un mapa de interacciones proteicas exhaustivo y fiable (Collins et al., 2007a; Nagalakshmi et al., 2008).

La reciente aparición de una nueva tecnología basada en la construcción de un **chip de proteínas**, que contiene el proteoma completo de la levadura (Zhu et al., 2001), ha supuesto un gran avance en el campo de la proteómica en general. Sus aplicaciones son muy versátiles: se emplearon por primera vez para estudiar interacciones proteína-proteína y fosfolípido-proteína (Zhu et al., 2001); aunque recientemente también se han utilizado para estudiar modificaciones post-traduccionales como la fosforilación (**fosfoproteoma**) (Ptacek et al., 2005); para identificar interacciones droga-proteína y estudiar así su mecanismo de acción (Huang et al., 2004); para identificar interacciones DNA-proteína (Hall et al., 2004) o para investigar la especificidad de anticuerpos (Michaud et al., 2003). Esta tecnología, aunque no exenta de limitaciones que están siendo superadas con nuevas estrategias (Ouyang et al., 2003; Ramachandran et al., 2004), abre la posibilidad de realizar estudios proteómicos a gran escala con multitud de aplicaciones.

3.- Estados Funcionales o Fenómica

El término **fenómica** hace referencia al escrutinio a gran escala del estado celular, la apariencia celular, las características celulares observables o la viabilidad, en respuesta a perturbaciones ambientales y/o genéticas. La fenómica relaciona directamente fenotipo y genotipo, como ocurre en el proyecto *HapMap* que ha sido mencionado anteriormente en el apartado de *Estrategias Genómicas*.

Este tipo de estudios se suele realizar en organismos cuyo genoma ha sido secuenciado y que pueden ser genéticamente modificados, ya sea a nivel genómico (*“knock-out”*), silenciamiento de genes (pérdida de función), a nivel de adición o sobreexpresión de genes (ganancia de función); o en los que se pueden analizar las variaciones genéticas de las poblaciones naturales. El campo de la fenómica es un campo joven y en rápido crecimiento que aún presenta ciertas limitaciones en la valoración, reproducible y a gran escala, de fenotipos complejos como la tasa de crecimiento, tasa de absorción o respiración, u otros.

La levadura es un modelo ideal para estudiar el comportamiento fenotípico celular para un genotipo definido. Esto se debe en parte a las características reseñadas en el primer apartado de la introducción y en parte a las estrategias que se han ido desarrollando conforme se avanzaba en su conocimiento.

A continuación, describiremos de forma cronológica cómo se generaron diferentes colecciones de mutantes a raíz de la secuenciación del genoma de la levadura, y las múltiples estrategias y aplicaciones que de ellas han surgido.

3.1- Colecciones de Mutantes Desarrolladas en la Levadura y su Aplicación a Estudios Fenómicos

3.1.1- Colecciones de Mutantes por Transposición

A mediados de los 90 surgieron una serie de estrategias para el análisis fenotípico a gran escala de poblaciones mutagenizadas, éstas se fundamentan en la creación de mutantes del tipo huella genética (*“genetic footprinting”*) o en la generación de mutaciones al azar; ambos métodos están basados en el uso de elementos transponibles.

Una de las primeras estrategias desarrolladas, denominada *“genetic footprinting”*, se basa en la mutagénesis de poblaciones de células mediante transposición inducida de una copia modificada del transposón *Ty* y una posterior selección de los mutantes en las condiciones que se desean ensayar. A continuación, mediante PCR sobre DNA genómico, se examina la presencia y abundancia relativa de células que contienen el gen de interés mutado en la muestra sometida a selección, en comparación con la muestra control sin tratar. De esta forma, si el gen es necesario para el crecimiento celular en unas determinadas condiciones selectivas, se reflejará en la pérdida o disminución de los productos de PCR correspondientes al gen mutado, detectando no sólo graves defectos de crecimiento sino disminuciones moderadas del mismo (Smith et al., 1995).

Otra estrategia de interrupción génica en masa se basa en el empleo de minitransposones (*mTn*) etiquetados e integrados al azar en el genoma (Ross-Macdonald et al., 1997). El proyecto **TRIPLES** (*“Transposon Insertion Phenotypes, Localization and Expression in Saccharomyces”*) consistió en el empleo de *mTn* con un módulo loxp-LacZ-URA3-3HA-loxp para generar una

colección a gran escala de mutantes en los que estudiar el fenotipo de la disrupción, la expresión génica y la localización proteica en una gran variedad de condiciones (Ross-Macdonald et al., 1999; Kumar et al., 2000).

Otras aproximaciones también basadas en la mutagénesis por inserción han sido desarrolladas en la levadura recientemente, una de ellas se basa en la inserción de T-DNA de *Agrobacterium tumefaciens* (Bundock et al., 2002), mientras que la otra se basa en la inserción no homóloga (NHI) de un módulo de DNA mediante transformación mediada por radiación gamma (Kiechle et al., 2002).

Todos estos abordajes presentan ciertas limitaciones, debidas por un lado a la laboriosidad de los análisis y por otro a que no son saturantes, ya que hay zonas del genoma menos susceptibles a la inserción del mTn mientras que otras son “puntos calientes” de inserción. Además el sitio de integración y el grado de funcionalidad de la proteína mutada tiene que ser determinado para cada mutante de interés. Estas limitaciones fueron resueltas gracias al desarrollo de una estrategia de delección sistemática del genoma de la levadura, que supuso un hito en la genómica funcional.

3.1.2- Colecciones de Mutantes de Delección

La **disrupción génica** es una aproximación muy eficaz para determinar la función biológica de un ORF no caracterizado. En *S. cerevisiae*, gracias a su elevada capacidad recombinogénica, es posible construir una disrupción génica precisa, desde el codón de inicio al codón de parada, y tratar de inferir la función génica a través de la respuesta de la cepa mutada frente a una variedad de condiciones selectivas (nutrientes, estrés, drogas, etc). Así, a finales de los 90 un consorcio internacional de laboratorios europeos, entre los que se encontraba nuestro grupo, y norteamericanos unidos en el proyecto común de **Delección del Genoma de *Saccharomyces*** (SGDP, de “*Saccharomyces Genome Deletion Project*”) http://www-sequence.stanford.edu/group/yeast_deletion_project/deletions3.html) abordó la delección sistemática de los aproximadamente 6000 ORFs de la levadura que estaban anotados (Winzeler et al., 1999). La estrategia empleada implicaba el **reemplazamiento mediante recombinación homóloga** de cada ORF por un módulo de delección generado por PCR. Este módulo consistía en el marcador *kanMX4*, que determina resistencia a geneticina (G418), flanqueado por secuencias cortas (45 bp) idénticas a los extremos de la secuencia genómica diana (Fig. 4). De esta forma se construyeron y verificaron más de 20000 cepas “*knock-out*” isogénicas correspondientes a cuatro colecciones: (i) ~ 6000 cepas diploides heterocigotas (ii) ~ 4800 cepas diploides homocigotas, (iii) ~ 4800 cepas haploides *MATa* y (iv) ~ 4800 cepas haploides *MATα*. En el transcurso del proyecto se identificaron ~ 1150 genes esenciales, por lo que las colecciones de mutantes haploides y de homocigotos contienen únicamente las cepas deletantes en genes no esenciales. Estas colecciones están disponibles en diversas organizaciones o compañías comerciales (ATCC , EUROSCARF (<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/complete.html>), Invitrogen (<http://clones.invitrogen.com/cloneinfo.php?clone=yeast>) y Open Biosystems (<http://www.openbiosystems.com/GeneExpression/Yeast/YKO/>).

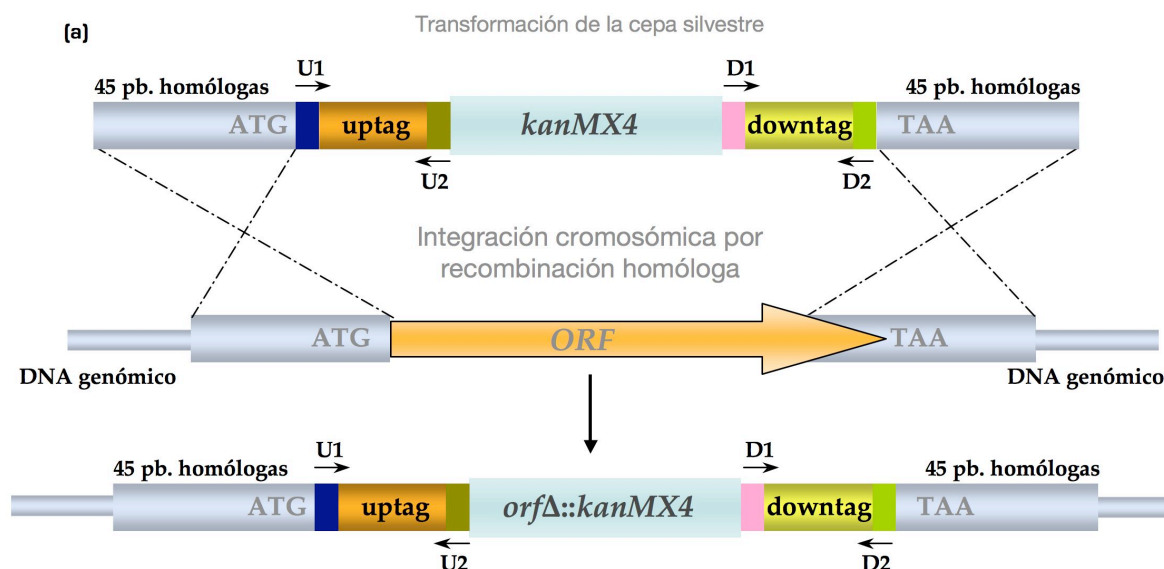


Figura 4. Construcción de la colección de mutantes de delección de *S. cerevisiae*. **(a)** Cada cepa deletante fue creada mediante integración por recombinación homóloga de un módulo de disrupción en el locus génico diana. El módulo, generado por dos reacciones de PCR consecutivas, consta del marcador *kanMX4*, de resistencia a G418, flanqueado por dos secuencias de 45 pb. idénticas a los extremos 5' y 3' de la secuencia genómica diana. Adicionalmente, a cada lado del módulo de resistencia se incorporaron etiquetas moleculares de 20 nucleótidos, únicas y específicas para cada cepa de delección ("uptag" y "downtag"). Estas etiquetas, también llamadas "códigos de barras moleculares", están a su vez flanqueadas por oligonucleótidos universales (U1/U2 y D1/D2) comunes a todas las cepas de delección.

Las colecciones de mutantes de delección así generadas presentaban, además, un componente innovador ideado por el grupo de Ron Davis que consiste en la incorporación sistemática de **etiquetas moleculares únicas y específicas para cada mutante** (Shoemaker et al., 1996). Cada mutante contiene a cada lado del módulo *kanMX4* una secuencia de 20 nucleótidos única y exclusiva de cada locus génico. Estas dos secuencias específicas denominadas individualmente "uptag" y "downtag" y conocidas como etiquetas moleculares o "tags", actúan a modo de **código de barras** identificador de la delección que porta cada cepa. Además, cada etiqueta molecular está flanqueada, a su vez, por dos secuencias de 18 pares de bases comunes a todas las cepas (oligonucleótidos universales), de manera que permiten en una única reacción de PCR amplificar todas las etiquetas presentes en una determinada muestra (Fig. 4). La principal ventaja que proporcionan estos códigos de barras, es que permiten realizar **análisis fenotípicos cuantitativos** de todas las cepas de delección de manera **simultánea y en paralelo**. En cada experimento, un cultivo que contiene todas y cada una de las cepas deletantes en la misma proporción ("pool" de cepas), se incubaba en las condiciones de tratamiento deseadas y en el control sin tratamiento. Después, a partir de DNA genómico aislado de las muestras tratamiento o control, se amplifican y se marcan fluorescentemente las etiquetas moleculares de todas las cepas presentes en la muestra mediante una PCR en la que se utilizan los oligonucleótidos universales. Por último, la abundancia relativa de cada cepa de delección en la población de cepas de la muestra, es determinada cuantitativamente mediante la hibridación de las etiquetas amplificadas a un "**microarray de DNA de alta densidad**, que contiene **oligonucleótidos complementarios a las secuencias de todas las etiquetas moleculares**" ("TAG microarray"). Estos ensayos de crecimiento competitivo en paralelo y a gran escala, permiten identificar cuantitativamente qué genes son necesarios para el crecimiento en las condiciones de selección impuestas (tratamiento) en comparación con la muestra control

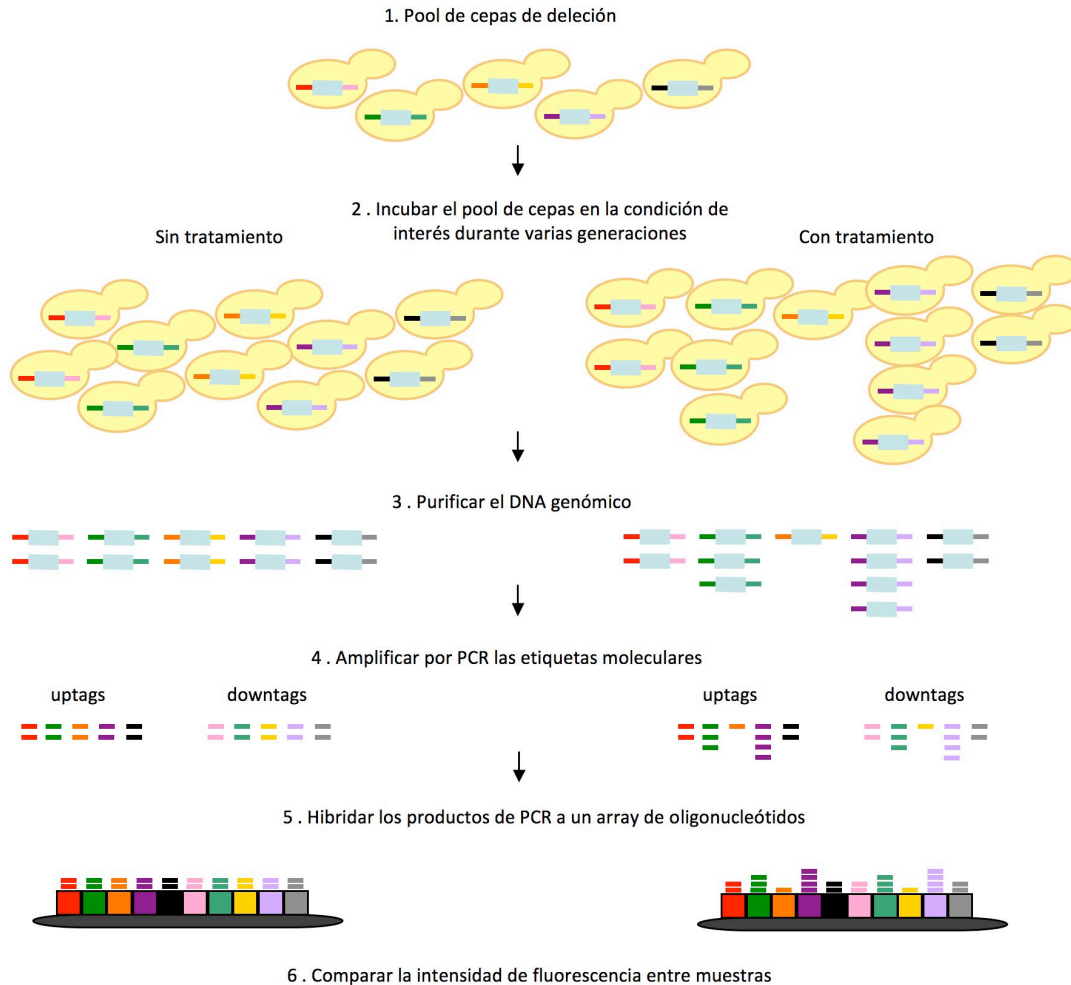


Figura 5. El etiquetado molecular permite realizar escrutinios fenotípicos cuantitativos en paralelo. Un cultivo con todas las cepas en la misma proporción (“pool” de cepas), se incuba en las condiciones de interés y en condiciones control durante un determinado número de generaciones. Tras purificar el DNA genómico, las etiquetas moleculares son amplificadas por PCR, empleando para ello los oligonucleótidos universales marcados con biotina o con cianina (Cy3 y Cy5). La posterior hibridación a “microarrays” que contienen oligonucleótidos complementarios a las secuencias de todas las etiquetas moleculares (“TAG microarray”), permitirá determinar la abundancia relativa de cada cepa deletante en la población total. La comparación de las intensidades de fluorescencia entre las condiciones estudiadas permite determinar la ausencia, presencia, menor o mayor representación de un determinado deletante en la población tras someterlo al tratamiento de interés (en el ejemplo, el mutante violáceo estaría enriquecido tras el tratamiento, mientras que el mutante naranja estaría en menor proporción). Abreviaciones: Cy3 y Cy5, fluoróforos de cianina 3 y cianina 5.

sin tratar, ya que la intensidad de la señal de fluorescencia que se detecta en el “microarray” es proporcional a la abundancia de cada cepa en el cultivo (Fig. 5).

Como acabamos de comentar, uno de los obstáculos que presentan las colecciones de deletantes es la dificultad para estudiar la función de los **genes esenciales**. Aunque, como se detallará más adelante las colecciones de diploides heterocigotos han resultado útiles para estudios de haploinsuficiencia a ciertos compuestos citotóxicos (Giaever et al., 2002; Giaever et al., 1999; Lum et al., 2004), la mayoría de los heterocigotos de genes esenciales no presentan defectos en el crecimiento en condiciones normales. El análisis de los genes esenciales ha recaído tradicionalmente en el uso de mutantes condicionales, normalmente termosensibles. Recientemente, con objeto de realizar el “apagado” de estos genes esenciales a gran escala se

han desarrollado varias estrategias como: i) la **proteólisis condicional** de proteínas esenciales mediante su fusión a un **módulo de degradación** inducible por calor (“*heat-inducible-degron collections*”) (Kanemaki et al., 2003); ii) la utilización de **promotores reprimibles** (“*tet promoter collections*”) (Mnaimneh et al., 2004); iii) la denominada **DAmP** (“*Decreased Abundance by mRNA Perturbation*”) que se fundamenta en la desestabilización del correspondiente mensajero mediante la disrupción de la región 3’ UTR con un marcador de selección dominante (Breslow et al., 2008; Schuldiner et al., 2005; Yan et al., 2008); iv) y, por último, la generación de **mutantes termosensibles** a gran escala que, a pesar de ser más tediosa de realizar, presenta la ventaja de conservar el promotor y terminador nativos (Ben-Aroya et al., 2008).

Últimamente, con objeto de abaratar costes y ahorrar tiempo y reactivos, se tiende a concentrar la colección de mutantes individuales, que normalmente se mantienen en placas de 96 micropocillos, en placas de 384, ó, incluso, de 1536 micropocillos. Varios autores han desarrollado la tecnología necesaria para la **miniaturización** de las colecciones basándose en la creación de micropocillos en fibra óptica (Biran and Walt, 2002), en membranas de éster de celulosa (Xu, 2002) o en portas cubiertos de poli-L-lisina (Narayanaswamy et al., 2006), y en el uso de robots capaces de depositar nanolitros de medio. Como último avance en el proceso de miniaturización, Xie *et al.* han logrado concentrar la colección completa de deletantes individuales hasta una densidad de 9600 cepas por placa. En este caso, las placas utilizadas por estos autores contenían medio YPD sólido y han validado esta tecnología identificando mutantes sensibles y resistentes a rapamicina (Xie et al., 2005). Como se acaba de exponer, las ventajas obvias derivadas de la miniaturización de las colecciones son la minimización de los

Cuadro 2. Ventajas e inconvenientes de las estrategias de delección

Las **ventajas** que ofrecen las estrategias de delección sistemática son:

- 1) Permiten analizar se forma sistemática el fenotipo de delección de TODAS las ORFs anotadas, de forma rápida y exhaustiva.
- 2) La delección de cada ORF es COMPLETA, de forma que se evitan las posibles funciones alteradas o residuales asociadas a productos truncados.
- 3) La identificación de la mutación asociada al fenotipo de interés, es DIRECTA, sin necesidad de posteriores clonaciones ni secuenciaciones. Su verificación es rápida gracias a las etiquetas moleculares únicas que la identifican.
- 4) La verificación del fenotipo observado es fácilmente comprobable mediante el análisis de tétradas, observando la segregación del mismo con el marcador de resistencia.
- 5) Permiten realizar análisis CUANTITATIVOS, ya que es posible detectar fenotipos intermedios que pasarían desapercibidos en otro tipo de estudios.

No obstante, estas estrategias presentan también algunas **limitaciones** a tener en cuenta:

- 1) Únicamente los ORFs anotados están delecionados, por lo que la colección está incompleta.
- 2) Los fenotipos de ORFs solapantes no se pueden diferenciar fácilmente.
- 3) El proceso de transformación es mutagénico y recombinogénico, de forma que puede introducir mutaciones secundarias, las cuales son difíciles de identificar.
- 4) Algunas cepas deletantes pueden ser aneuploides (Hughes et al., 2000b).
- 5) Los genes esenciales son inviables en las colecciones homocigotas.
- 6) La delección de genes funcionalmente redundantes puede no mostrar un fenotipo detectable.
- 7) El fenotipo de delección observado puede variar al cambiar de fondo genético.

materiales y del esfuerzo necesario para llevar a cabo escrutinios de alto rendimiento (HTS, de “*High-throughput Screening*”). No obstante, la ventaja principal que presentan este tipo de desarrollos es que permiten realizar escrutinios con compuestos de los que se disponen cantidades muy escasas como son, por ejemplo, productos naturales de origen marino o de plantas tropicales. Sin embargo, la miniaturización también tiene algunos inconvenientes que no se pueden obviar como son una menor sensibilidad del sistema de escrutinio, ya que las diferencias entre cepas son menos apreciables, y que la tecnología requerida no es asequible para muchos grupos de investigación.

A continuación, se describirán brevemente algunas de las numerosas contribuciones científicas que han empleado las **colecciones de deletantes** de la levadura como herramienta en su trabajo, así como algunas de sus aplicaciones. Para que sirva de referencia, la [Tabla 2a-c](#) trata de recoger de forma ordenada por tipo de escrutinio, las contribuciones más significativas. Como el objeto de este trabajo es el análisis químico-genómico usando la colección de deletantes de la levadura, las contribuciones y aplicaciones producidas en este campo en particular se comentarán más adelante (ver la [Tabla 3](#)).

Las colecciones de deletantes han sido usadas en numerosos escrutinios exhaustivos en los que las levaduras han sido sometidas a una gran variedad de condiciones fisiológicas y agentes estresantes, drogas, virus e incluso a la expresión de proteínas endógenas y exógenas (una amplia revisión puede ser consultada en (Scherens and Goffeau, 2004)). Otros escrutinios más sofisticados comprenden el análisis de colonias individuales y la detección de los mutantes implicados por métodos específicos (Bonangelino et al., 2002; Kushner et al., 2003), como ocurre con la tinción con vapores de yodo para la detección de mutantes que acumulan glicógeno (Wilson et al., 2002). Además, últimamente se han llevado a cabo análisis morfológicos de todos los deletantes en los que se han determinado su tamaño y forma celular (Giaever et al., 2002; Jorgensen et al., 2002; Zhang et al., 2002) patrón de gemación (Ni and Snyder, 2001) y otras características morfológicas (Ohya et al., 2005).

Las **aplicaciones** surgidas de todos estos estudios son muy amplias y variadas, e incluyen: a) la **identificación de genes funcionalmente relevantes** para un determinado proceso fisiológico o ruta molecular; b) la **identificación de las dianas de nuevas moléculas**; c) la **determinación de los mecanismos de sensibilidad/resistencia a drogas**; y d) la **caracterización funcional de ORFs de función desconocida**.

En resumen, las colecciones de cepas deletantes han impulsado de forma determinante a la levadura como modelo para realizar todo tipo de escrutinios y han contribuido significativamente al avance en el conocimiento de numerosos procesos biológicos.

Las colecciones de mutantes de delección también han permitido el desarrollo de nuevos abordajes genéticos para la detección a escala genómica de genes supresores o potenciadores de fenotipos mutantes. A continuación, y bajo el epígrafe *Interacciones Genéticas*, se describirán los más representativos, así como sus variaciones y aplicaciones.

Tabla 2a. Escriturarios fenotípicos con la colección de mutantes de delección de *S. cerevisiae*

Condicción, tratamiento o fenotipo	Tipo de ensayo	Fondo	Medio de cultivo	genes que responden a la condición	Referencia
CuSO ₄ (4 mM), FeSO ₄ (5 mM), MnCl ₂ (2 mM), ZnSO ₄ (2 mM) y EDTA. Sensibilidad	Individual	~4800 cepas haploides MATa	YPG	334	(Wang et al., 2007)
Esporulación (< Eficiencia / > Eficiencia)	Individual	~4800 cepas diploides homocigotas	SD	~500	(Enyehin and Saunders, 2003)
Respuesta salina (NaCl 0.85 M)	Individual	~4800 cepas haploides MATa	YPD / SC	33	(Warringer et al., 2003)
Supresión de la acumulación de mutaciones	Individual	~4800 cepas haploides MATa	(+canavanina)		(Huang et al., 2003)
pH Alcalino (6.2, 7.2 y 7.5)	Individual	~4800 cepas haploides MATa		118	(Serrano et al., 2004)
Segregación cromosómica en meiosis	Individual	~4800 cepas diploides homocigotas, marcadas con GFP en ambas copias del cromosoma III			(Marston et al., 2004)
Morfología celular alterada (microscopía)	Individual	2531 cepas ?			(Saito et al., 2004)
Morfología celular alterada (microscopía)	Individual: triple tinción con isothiocyanate-Corr A, rhodaminephalloidin, y 4',6'-diamidino-2-	~4800 cepas haploides MATa			(Ohya et al., 2005)
Fenotipo Low dye binding (ldb), asociado con una menor incorporación de grupos manosil fosfato en oligosacáridos unidos a manoproteínas (0.1% alcian blue en 50mM ácido	Individual	~4800 cepas haploides MATa y ~4800 cepas haploides MATa	YPD líquido	198	(Corbacho et al., 2005)
Acumulación de glicógeno (baja, alta)	Individual: tinción con vapores de Yodo	~4600 cepas diploides homocigotas		324, 242	(Wilson et al., 2002)
Absorción de hierro, sideróforo ferrioxamina B (FOB) (marcado con ⁵⁵ Fe 1 μM)	Individual	~4800 cepas haploides MATa	YPD	197	(Lesuisse et al., 2005)
Morfología mitocondrial aberrante (esenciales)	Individual: tinción con 0.1 μM rodamina B hexyl ester	768 cepas esenciales con promotor Tet regulable (YTHC collection)		119	(Altman and Westermann, 2005)
Crecimiento filamentosos	Individual: microscopía	~4800 cepas haploides MATa	SC-Hidroxitiurea 200 mM	16	(Kang and Jiang, 2005)
Exposición de β-glucano (anticuerpo primario anti-β-Glucano, específico para β-1,3-Patón de gemación bipolar	Individual: inmunofluorescencia con anti-β-Glucano	~4800 cepas haploides MATa	YPD	76	(Wheeler and Fink, 2006)
Distribución del tamaño celular	Individual: microscopía (Catofluor)	4168 cepas diploides homocigotas		127	(Ni and Snyder, 2001)
Distribución del tamaño celular	Individual: FACS	~4800 cepas haploides MATa		500	(Jorgensen et al., 2002)
Distribución del tamaño celular	Individual: FACS	~4800 cepas diploides homocigotas y 1166 diploides heterocigotos esenciales		49	(Zhang et al., 2002)
Distribución del tamaño celular (esenciales)	Individual: FACS	602 cepas esenciales con promotor Tet regulable (YTHC collection)			(Mnaimneh et al., 2004)
Morfología celular Esenciales (esenciales)	Individual: FACS	602 cepas esenciales con promotor Tet regulable (YTHC collection)			(Mnaimneh et al., 2004)
Ciclo celular (esenciales)	Individual: FACS	800 cepas esenciales con promotor Tet regulable (YTHC collection)			(Yu et al., 2006)
Longitud de los telómeros (acortados, alargados)	Individual: extracción de DNA, Digestión, Marcaje y Visualización	~4800 cepas haploides MATa y ~4800 cepas diploides homocigotas	YPD	72, 80	(Garbonton et al., 2006)
Defectos en el crecimiento tras crecimiento en: YPD, Medio Mínimo, alta concentración de sal (NaCl 1 M), Galactosa, Sorbitol (1.5 M), pH 8, Heat Shock, Nistatina (10 μM)	TAG3 array (Affymetrix)	Pool de cepas de delección diploides homocigotas			(Gaever et al., 2002)
Crecimiento en fuentes de carbono no fermentables (Glicerol, Lactato y Etanol)	TAG3 array (Affymetrix)	Pool de cepas de delección diploides homocigotas y pool de cepas diploides heterocigotas		466	(Steinmetz et al., 2002)
Esporulación (< Eficiencia / > Eficiencia)	TAG3 array (Affymetrix)	Pool de cepas de delección diploides homocigotas	YPD	261, 102	(Deutschbauer et al., 2002)
Efectos sobre el crecimiento producidos por el almacenamiento	TAG3 array (Affymetrix)	Pool de cepas de delección diploides homocigotas	YPD	146	(D'Elia et al., 2005)
Vacuolar protein sorting	Individual: secreción de CPY mediante un ensayo de inmunoblot de colonias	~4653 cepas diploides homocigotas			(Bonangelino et al., 2002)

Tabla 2b. Escriturios de letalidad sintética y epistasia, con la colección de mutantes de delección de *S. cerevisiae*

Condición, tratamiento o fenotipo	Tipo de ensayo	Fondo	Medio de cultivo	Número de genes que responden a la condición	Referencia
Factores implicados en la ubiquitinación mediada por Doa10	SGA: transformación con Deg1-Ura3-3HA	~4800 cepas haploides MAT α (SGA)	SD-ura	4	(Ravid et al., 2006)
Respuesta a la pérdida de los controles de re-replicación	SGA: transformación con ORC6- <i>ori</i> GAL-CDC6 NT- <i>His</i> y ORC6- <i>his</i> - <i>ori</i> GAL-CDC6 NT- <i>His</i>	~4800 cepas haploides MAT α (SGA)	YPGal	29	(Aichambault et al., 2005)
SL: interacción con genes de procesamiento de las horquillas de replicación	SGA: SL con las cepas <i>mms1Δ</i> o <i>mms4Δ</i>	4600 cepas haploides MAT α (SGA)		7	(Bellaoui et al., 2003)
SL: interacción con genes de procesamiento de las horquillas de replicación	SGA: SL con la cepa <i>elg1Δ</i>	4600 cepas haploides MAT α (SGA)		36	(Bellaoui et al., 2003)
132 ecruinos de SL (SGA) enfocados a genes implicados en polaridad celular dependiente de actina, síntesis de pared celular, segregación cromosómica dependiente de microtúbulos, y síntesis y reparación de DNA	SGA: SL con 132 cepas mutantes	~4800 cepas haploides MAT α (SGA)		4000	(Tong et al., 2004)
<i>erg11Δ</i> /HFRts, <i>cnb1Δ</i> , <i>luz-403</i> (Dianas de Fluconazol; FK506 y Ciclosporina A; y Benomilo, respectivamente)	SGA	~4800 cepas haploides MAT α (SGA)		27, 38, ?	(Parsons et al., 2004)
Dinámica de rRNA núcleo-citoplasma	SGA: SL con la cepa <i>lss1Δ</i>	~4800 cepas haploides MAT α (SGA)		131	(Hurtado et al., 2007)
Supresores de GCR ("Gross Chromosomal Rearrangements", Rearrangement cromosómicos)	SGA: SL con la cepa <i>prr1Δ</i>	4644 cepas haploides MAT α (SGA)		10	(Smith et al., 2004)
Efectores de SecurinPds1p (inhibidor de la separasa Esp1p, activadora de la anafase)	SGA modificado: la mutación de interés (<i>pds1</i>) se combina con las cepas de delección de la colección en presencia del plásmido centromérico pPDS1 (con URA3 y una copia silvestre de PDS1)	~4800 cepas haploides MAT α (SGA)		21	(Sarin et al., 2004)
Efectores de Rad27 (exonucleasa con un papel importante en replicación y reparación del DNA)	SGA: SL con la cepa <i>rad27Δ</i>	~4800 cepas haploides MAT α (SGA)		59	(Loellier et al., 2005)
Elongación de la transcripción y metabolismo de la cromatina	SGA: SL con las cepas <i>elg1Δ</i> , <i>seiz2Δ</i> , <i>cdc73Δ</i> , y <i>dst1Δ</i>	~4800 cepas haploides MAT α (SGA)		5	(Krogan et al., 2003)
Complejos remodeladores de la cromatina	SGA: SL con la cepa <i>rsc7Δ</i>	~4800 cepas haploides MAT α (SGA)		45	(Wilson et al., 2006)
Organización del citoesqueleto (BNI1, ARP2, ARCA0, BNI1), Síntesis y reparación de DNA (SGS1, RAD27), y funciones sin caracterizar (BBC1, NBP2)	SGA: SL	~4800 cepas haploides MAT α (SGA)		291	(Tong et al., 2001)
Segregación cromosómica	SGA: SL con las cepas <i>ctf3Δ</i> , <i>chl9Δ</i> , <i>mcm16Δ</i> , <i>mcm27Δ</i> , <i>mcm22Δ</i> , y en los mutantes <i>cep3-1</i> , <i>cep2</i> , <i>cep4-1</i> , <i>rad70-1</i> , <i>okp1-5</i> , y <i>skp1-3</i>	~4800 cepas haploides MAT α (SGA)		230	(Measday et al., 2005)
SL: interacción con 30 mutantes en procesos variados (esenciales)	SGA	575 cepas esenciales con promotor Tet regulable (YTHC collection)		567	(Davierwala et al., 2005)
Estabilidad genómica (<i>dia2Δ</i>)	SGA	4422 cepas haploides MAT α (SGA)		55	(Blake et al., 2006)
Ruta de transducción de señales de Cbk1 (búsqueda de supresores)	SGAM (synthetic genetic array mapping), SL con las cepas <i>cbf1Δ</i> , <i>mcb2Δ</i> , <i>hym1Δ</i> , <i>kic1Δ</i> , y <i>tao3</i>	~4800 cepas haploides MAT α (SGA)		31	(Jorgensen et al., 2002a)
Inestabilidad geómica (supresores de <i>rmi1Δ</i>)	SGAM (synthetic genetic array mapping), SL con <i>rmi1Δ</i> supX	4600 cepas haploides MAT α (SGA)			(Chang et al., 2005)
Búsqueda de alelos de ganancia de función de TIF6 (supresores del fenotipo de crecimiento lento asociado a <i>sbf1Δ</i>)	SGAM (synthetic genetic array mapping)	~4800 cepas haploides MAT α (SGA)		37	(Menne et al., 2007)
Efectores de Pif1-Sp2 generado por Mms4	SGA: SL con una cepa mutante ts de <i>rms4-</i>	~4800 cepas haploides MAT α (SGA)		~40	(Audiya et al., 2004)
Efectores de Pif1-Sp2 generado por Pif1	SGA: SL con la cepa mutante ts <i>pif1-139</i>	~4800 cepas haploides MAT α (SGA)		~30	(Sciorra et al., 2005)
Efectores de Pif1-Sp2 generado por Sif4	SGA: SL con una cepa mutante ts de Sif4	~4800 cepas haploides MAT α (SGA)		17	(Tabuchi et al., 2006)
Estabilidad cromosómica: interacciones con mutantes ts de miembros de los complejos Ndc80 y Dam1 del cinetocoro	SGA: SL con cepas mutantes ts en tres alelos de SPC24 (<i>spc24-6</i> , <i>spc24-9</i> , <i>spc24-10</i>) y SPC34 (<i>spc34-5</i> , <i>spc34-6</i> , <i>spc34-7</i>)	~4800 cepas haploides MAT α (SGA)			(Montpetit et al., 2005)
Replicación Fidelity del genoma (supresores del mutante ts de DNA2)	SGA: SL con dos alelos mutantes condicionales de DNA2 (<i>dna2-1</i> y <i>dna2-2</i>)	~4800 cepas haploides MAT α (SGA)		56	(Bludd et al., 2005)
Capping de los telómeros (supresores de <i>cdc13-1</i>)	SGA: SL con el mutante letal <i>cdc13-1</i>	~4800 cepas haploides MAT α (SGA)		14	(Downey et al., 2006)
Red de interacción de la DNA helicasa (<i>srz2Δ</i> y <i>sgs1Δ</i>)	SLAMI: <i>srz2Δ</i> -URA3 y <i>sgs1Δ</i> -URA3	Pool de cepas de delección haploides MAT α		3, 5	(Obl et al., 2003)
Identificación de componentes implicados en cohesión de las cromátidas hermanas (<i>chf4Δ</i>)	SLAMI: <i>chf4Δ</i> : <i>URA3</i>	Pool de cepas de delección haploides MAT α		26	(Warren et al., 2004)
Orientación bipolar de los cromosomas, interacciones con <i>msd1Δ</i> (Proteína asociada al cinetocoro)	SLAMI: <i>msd1Δ</i> : <i>URA3</i>	Pool de cepas de delección haploides MAT α		16	(Lee and Spencer, 2004)
Benomilo (0-20 μ g/ml)	dSLAM	Pool de cepas de delección haploides MAT α		450	(Pan et al., 2004)
<i>crz2Δ</i> , <i>bim1Δ</i> y <i>sgs1Δ</i>	dSLAM	Pool de cepas de delección diploides heterozigotas "convertibles"		116,159, 60	(Pan et al., 2004)
<i>slm1Δ</i> (supresores)	dSLAM	Pool de cepas de delección diploides heterozigotas "convertibles"		3	(Pan et al., 2004)
Alelo condicional de CDC102 (esencial), <i>cdc102-1</i>	dSLAM	Pool de cepas de delección diploides heterozigotas "convertibles"		80	(Pan et al., 2004)
Sobrexpresión de LC01 (SLL)	dSLAM	Pool de cepas de delección diploides heterozigotas "convertibles"		10	(Pan et al., 2004)
Haploinsuficiencia "sinéctica" con <i>ttb1Δ</i>	dSLAMI	Pool de cepas de delección diploides heterozigotas "convertibles"		2	(Pan et al., 2004)
Funciones celulares de FKBP12 (proteína de unión a FK506)	dSLAM: <i>tpk1Δ</i>	Pool de cepas de delección diploides heterozigotas "convertibles"		9	(Azevalo-Rodriguez et al., 2004)
Red de integridad del DNA (74 mutantes)	dSLAM	Pool de cepas de delección diploides heterozigotas "convertibles"		4956	(Pan et al., 2006)
Interacciones entre mutantes implicados en la ruta de secreción temprana	E-MAP	424 mutantes			(Schuldiner et al., 2005)
Interacciones entre mutantes implicados en la biología del cromosoma	E-MAP	754 mutantes			(Collins et al., 2007b)
Interacciones entre 26 mutantes sensibles a MMS (MMS 0.002%)	E-MAP	26 mutantes			(St Onge et al., 2007)

Tabla 2c. Escrutinios de Supresión y Letalidad (sintética) dependiente de dosis genética y escrutinios basados en la transformación, con la colección de mutantes de delección de *S. cerevisiae*

Condición, tratamiento o fenotipo	Tipo de ensayo	Fondo	Medio de cultivo	Número de genes que responden a la condición	Referencia
Reparación de daño en el DNA por unión de extremos no homólogos (NHEJ)	TAG3 array (Allymetrix): transformadas con un plásmido linealizado para realizar ensayos de NHEJ	Pool de cepas de delección haploides <i>MATa</i> y pool de cepas diploides homocigotas	SC y SC-Ura	~30	(Ooi et al., 2001)
Ensamblaje de estructuras membranosas del retículo endoplásmico (Karmellae) (sensibilidad a altos niveles de HMG-CoA reductasa)	TAG3 array (Allymetrix): transformación de cada cepa con varios plásmidos "reporter"	1557 cepas diploides homocigotas		120	(Wright et al., 2003)
Respuesta a la expresión de proteínas humanas: Huntingtina (fragmento) y α -sinucleína (potenciadores)	Transformación del Pool de cepas de delección con pSAL4-HDS3C (2mm ori) o pRS428GAL- α -syn (2um ori)	~4800 cepas haploides <i>MATa</i>	SC-Ura-Cu ²⁺ y SC-Ura-Gal	52, 86	(Willingham et al., 2003)
Respuesta a la expresión de proteínas humanas: Huntingtina (fragmento) (supresores)	Transformación del Pool de cepas de delección con pYES2-Htt103Q-GFP	~4800 cepas haploides <i>MATa</i>	SC-Ura (Glu) y SC-Ura (Gal)	28	(Giorgini et al., 2005)
Ciclo de retrotransposición de Ty1	Individual: transformación de cada cepa con el plásmido pAR100	~4800 cepas diploides homocigotas	SC y SC-Ura	101	(Griffith et al., 2003)
Fenotipo Opi- (sobrepone y excreta inositol)	Individual: suspensión de cada cepa en presencia de la cepa indicadora BRS1005 (mot1 Δ diploide homocigota)	~4800 cepas haploides <i>MATa</i>	SC-Inositol-Colina sólido	89	(Hancock et al., 2006)
Respuesta a la expresión de proteínas humanas: α -sinucleína (supresores y potenciadores de la toxicidad)	Individual: transformación de la cepa que expresa α -syn-WT con cada uno de los plásmidos de la colección	3000 genes escogidos al azar de la colección de sobreexpresión (en la que cada ORF está bajo el control de un promotor inducible por galactosa, sin epítopos añadidos)	SD (Glu) y SD (Gal)	34, 20	(Cooper et al., 2006)
Gpa1 (Galpina subunit) efectores	Individual: transformación de cada cepa con un plásmido expresando la forma constitutivamente activa de Gpa1 (Gpa1Q323L)	~4800 cepas haploides <i>MATa</i>		7	(Slessareva et al., 2006)
Segregación cromosómica	SGA, SDL: transformación de cada cepa con pGAL1-SKP1 (BPH662), pGAL1-CTF13 (pKF88), pGAL1-NDC10 (pKH2)	?		141	(Measday et al., 2005)
Ciclo celular en sobreexpresión	Individual: FACS	184 cepas con fenotipo morfológico del experimento previo	SD (Glu) y SD (Gal)	120	(Sopko et al., 2006)
SDL (<i>pho85Δ</i>)	SGA: SDL	<i>pho85Δ</i> transformado con la colección de ORF sobreexpresados	SD (Glu) y SD (Gal)	65	(Sopko et al., 2006)
Repamicina en sobreexpresión (sensibilidad y resistencia)	TAG array: SDL/SDS	3900 plásmidos de sobreexpresión con cada ORF bajo el control de un promotor inducible por galactosa (cada uno con etiquetas moleculares)	SD-Ura (Glu) y SD-Ura (Gal)	130, 134	(Butcher et al., 2006)
Supresores de LY85583 (molécula supresora del efecto inhibitorio sobre el crecimiento que produce la repamicina)	TAG array: SDL/SDS	3900 plásmidos de sobreexpresión con cada ORF bajo el control de un promotor inducible por galactosa (cada uno con etiquetas moleculares)	SD-Ura (Glu) y SD-Ura (Gal)	10, 8	(Butcher et al., 2006)
Identificación de substratos de Pho85-Pct1 quinasas dependiente de ciclina	Ensayos knasa en pools conteniendo 6 cepas	4250 cepas haploides <i>MATa</i> expresando cada ORF marcado con el epítopo TAP	YPD líquido	24	(Dephoure et al., 2005)
Genotoxina bacteriana CdtB (sensibilidad, sensibilidad cruzada a endonucleasa HO)	Individual: transformación de cada cepa con un plásmido expresando CdtB	~4800 cepas diploides homocigotas	SD (Glu) y SD (Gal)	61, 28	(Kitagawa et al., 2007b)
Efecto bacteriano de tipo III: IpgB2 (supresores)	SGA: transformación con pGAL1-IpgB2	~4800 cepas haploides <i>MATa</i>		3	(Aito et al., 2006)
Efecto bacteriano de tipo III: OspF (Shigella) (sensibilidad)	Individual: transformación de cada cepa con pRS316-GAL10-GFP-OspF-CN y con pRS316-GAL10-GFP-CN	~4800 cepas haploides <i>MATa</i>	SD-Ura (Glu) y SD-Ura (Gal)	83	(Kramer et al., 2007)
Efectores de Rim101	Individual: transformación de cada cepa con un plásmido "reporter" de represión de Rim101p	~4800 cepas haploides <i>MATa</i>		40	(Barwell et al., 2005)
Supresores de Ste11 constitutivamente activo	Individual: transformación de cada cepa con un plásmido pGAL-STE11-D53	4433 cepas diploides homocigotas	SD-Ura (Glu) y SD-Ura (Gal)	22	(Kitagawa et al., 2007a)
Mutantes afectados en la herencia del retículo endoplásmico cortical	Individual: transformación de cada cepa con un plásmido Hmg1p-GFP	~4800 cepas ?		9	(Estrada et al., 2003) y (Du et al., 2006)
Mutantes en ERAD (degradación asociada al retículo endoplásmico)	Individual: transformado con un plásmido que expresa el dominio de CPY-ER-luminal mal plegado fusionado a Leu2, bajo el control de <i>GAL4</i>	~4800 cepas diploides homocigotas	SC-leu	100	(Kushmer et al., 2003)
Replicación de virus RNA de cadena positiva (Brome mosaic virus (BMV))	Individual: transformación de cada cepa con un plásmido que expresa los factores de replicación de RNA de BMV	~4800 cepas ?		96	(Panavas et al., 2005)
Replicación de virus RNA de cadena positiva (tomato bushy stunt virus (TBSV))	Individual: transformación de cada cepa con un plásmido expresando el replicón de TBSV	800 cepas esenciales con promotor Tet regulable (YTHC collection)		16	(Serviene et al., 2006)
Replicación de virus RNA de cadena positiva (tomato bushy stunt virus (TBSV)) (Esenociales)	Individual: transformación de cada cepa con un plásmido expresando el replicón de TBSV	~4800 cepas ?		11	(Serviene et al., 2005)
Replicación de virus RNA de cadena positiva (tomato bushy stunt virus (TBSV))	Individual: transformación de cada cepa con un plásmido expresando el "reporter" Trm11l-GFP7 visualización por microscopía de fluorescencia	~4800 cepas no esenciales ?		4	(Murthi and Hopper, 2005)

Tabla 3. Escriturios químicos-genómicos con la colección de mutantes de delección de *S. cerevisiae*

Condición, tratamiento o fenotipo	Tipo de ensayo	Fondo genético	Medio de cultivo	Número de genes que responden a la condición	Referencia
Ácido sólbico (sensibilidad: 2 mM pH 4.5, resistencia: 5 mM pH 4.5)	Individual	-4800 cepas diploides?	YPD líquido	237, 34	(Mollapour et al., 2004)
pH 7.5 en 60 mM CaCl ₂	Individual	-4800 cepas haploides MATa	YPD sólido	64	(Sambade et al., 2005)
Minisato. Oleato. Acetato	Individual	-4800 cepas haploides MATa	YPD sólido	212	(Smith et al., 2006)
Farnesol (5-500 µM) (Sensibles pero no a Geranol)	Individual	-4800 cepas haploides MATa	SC sólido	48	(Fallm et al., 2007)
Tolerancia a Aluminio (AlCl ₃ 1 mM)	Individual	-4800 cepas haploides MATa	Medio bajo en fosfatos	37	(Kakimoto et al., 2005)
Furtural (50 mM) (inhibidor de la fermentación) (sensibilidad)	Individual	-4800 cepas haploides MATa	YPD sólido	62	(Gorisch et al., 2006)
Alcoholes (Etanol 10%, 1-propanol 4% y 1-pentanol 5%)	Individual	4500 cepas diploides homocigotas	YPD sólido	137, 122, 48	(Fujita et al., 2006)
Etanol (6%)	Individual	-4800 cepas haploides MATa	YPD sólido	34	(van Voors et al., 2006)
Rapamicina (25 nM)	Individual	2216 cepas no esenciales?	YPD	106	(Chan et al., 2000)
Rapamicina (10 y 30 nM) (sensibilidad, resistencia)	Individual	-4800 cepas haploides MATa y 1175 cepas diploides heterocigotas esenciales	YPD sólido	281, 101	(Xie et al., 2005)
FK506 (125 nM)+ NaCl (0.8 M) (resistencia)	Individual	-4800 cepas haploides MATa	YPD líquido	29	(Butcher and Schreiber, 2004)
SFK2 (molécula supresora de FK506) (sensibilidad)	Individual	-4800 cepas haploides MATa	YPD líquido	3	(Butcher and Schreiber, 2004)
SFK1 (5 µM) (molécula supresora de FK506) (sensibilidad)	Individual	-4800 cepas haploides MATa?	YPD líquido	36	(Butcher and Schreiber, 2003)
Peroxido de Hidrógeno (2 mM), Menadiona (67 µM), Ibuprofeno (50 µM) y Mefloquina (235 µM)	Individual	-4800 cepas haploides MATa	SC líquido		(Tucker and Fields, 2004)
DTT (32 mM)	Individual	-4800 cepas diploides homocigotas (no esenciales)	YPD sólido	195	(Rand and Grant, 2006)
DmAMP1 (8 µM) ("defensina" antifúngica de plantas)	Individual	4385 cepas haploides MATa	YMM	2	(Thevissen et al., 2005)
Amiodarona (7 µM) (droga antiaritmias, aunque también es antifúngico)	Individual	-4800 cepas haploides MATa	SC líquido	36	(Gupta et al., 2003)
Caspofungina (sensibilidad y resistencia) (500 ng/ml y 5 µg/ml)	Individual	4600 cepas haploides MATa y 1100 cepas diploides heterocigotas esenciales	YPD sólido (25°C)	52, 39	(Lesage et al., 2004)
Caspofungina (sensibilidad y resistencia) (30 ng/ml, 60 ng/ml y 120 ng/ml)	Individual	-4800 cepas haploides MATa	YPD	20, 9	(Markovich et al., 2004)
Toxina killer K1 (5 ul K1 (1000x stock diluido 1:10), sensibilidad cruzada a Higromicina B (30 o 80 µg/ml), Calcofluor (25 o 50 µg/ml) y SDS (sodium dodecyl sulfate) (0.05%)	Individual	-4800 cepas haploides MATa y 4800 cepas diploides homocigotas (las cepas diploides heterocigotas también se analizaron)	YPD sólido	268	(Page et al., 2003)
Inhibidor de la angiogénesis: arsenical 4-(N-(S-glutathionylacetyl) amino) phenylarsenoxide (GSAO) (0.5 y 2 mM)	Individual	-4800 cepas diploides homocigotas	YPD líquido	88	(Dilda et al., 2005)
Wortmannina (2 y 3.5 µM) (sensibilidad y resistencia)	Individual	-4800 cepas haploides MATa y 1175 cepas diploides heterocigotas esenciales	SC sólido	476, 591	(Zewail et al., 2003)
6-Azauracilo (200 µg/ml), sensibilidad cruzada a Ácido Micofenólico (100 µg/ml)	Individual: cada cepa mutante transformada a Ura+	2804 cepas diploides homocigotas	SD-ura sólido	42	(Riles et al., 2004)
Ácido Micofenólico (30 y 100 mg/l)	Individual	-4800 cepas haploides MATa	SD y SC	102, 2	(Desmoucelles et al., 2002)
Artemisinina (droga antimalaria) (3-5 µM)	Individual	-4800 cepas diploides homocigotas	YPG (2% Glicerol) o YPE (3% Etanol) sólido	4?	(Li et al., 2005)
Dihidromotopramina C (molécula en desarrollo preclínico que inhibe la angiogénesis y la metástasis (60 µM) (sensibilidad)	Individual	? cepas diploides heterocigotas	YPD sólido	21	(Baetz et al., 2004)
Amiodarona (10 µM), BAPTA (1.5 mM) y MnCl ₂ (10 mM)	Individual	-4800 cepas haploides MATa	SC		(Yadav et al., 2007)
82 compuestos (Agentes quimioterapéuticos y Extractos naturales)	TAG array (Agilent)	-4800 cepas haploides MATa	YPD o SC		(Parsons et al., 2006)
78 compuestos (Agentes quimioterapéuticos y Agentes de control biológico en agricultura)	TAG3 array (Affymetrix)	3503 cepas diploides heterocigotas	SC		(Lum et al., 2004)
Clustering de 51 condiciones (algunas de otros escrutinios, otras nuevas)	TAG3 array (Affymetrix)	-4800 cepas diploides homocigotas	YPD		(Brown et al., 2006)
21 Condiciones: Fuentes de carbono: 2% Galactosa/1 mg/ml Antimicina A, 2% Rafinosa/1 mg/ml Antimicina A, 3% Glicerol, y 2% Lactato. Limitación de nutrientes: YPD bajo en fosfatos y YPD bajo en hierro (200 mM batofenamina). Estrés general Etanol (YPD 6% Etanol), pH bajo (pH 3), sal (1.2 M NaCl), Sorbitol (1.2M), y estrés oxidativo (1 mM Paraquat). Condiciones asociadas con inhibición de funciones celulares: microtubulos (15 mg/ml Benomilo), replicación y reparación del DNA (100 J/m ² UV y 11.4 mg/ml Hidroxurea), elongación de la transcripción (20 mg/ml Ácido micofenólico), y síntesis proteica (0.18 mg/ml Clotrimidol y 0.1 mg/ml Rapamicina). Otras condiciones: cationes divalentes (0.7M CaCl ₂), metales pesados (55 mM CdCl ₂), aminoglicósidos (50 mg/ml Higromicina B y Cafeína (2 mg/ml))	Individual	-4800 cepas diploides homocigotas	YPD sólido		(Dudley et al., 2005)

Tabla 3 (Cont.). Escrutinios químico-genómicos con la colección de mutantes de delección de *S. cerevisiae*

Condición, tratamiento o fenotipo	Tipo de ensayo	Fondo genético	Medio de cultivo	Número de genes que responden a la condición	Referencia
12 compuestos: Benomilo (15 µg/ml), Ciclosporina A (100 µg/ml), FK506 (2 µg/ml), Hidroxiurea (100 mM), Camptotecina (15 µg/ml), Flucanazol (15 µg/ml), Cicloheximida (0.1 µg/ml), Rapamicina (0.015 y 0.01 µg/ml), Tunicamicina (5 y 0.5 µg/ml), Wortmannina (1.3 µg/ml), Sulfometurón (3 µg/ml) y Catena (0.15%)	Individual	~4800 cepas haploides MATa	YPD o SC sólido		(Parsons et al., 2004)
Agentes antifúngicos (Metotrexato (250 µM), 5-Fluorouracilo, Cisplatino); Antifúngicos (Miconazol, Flucanazol y Fenpropomorph (2,3 µM)); Estériles (Atrvastatina y Lovastatina); Citrato de alevrina; Diclina.	TAG3 array (Affymetrix)	Pool de cepas de delección diploides heterocigotas	YPD		(Glaever et al., 2004)
5 Agentes oxidantes (Dióxido de Hidrógeno, Menadiona, Hidroperóxido de Cumeno, 3-hidroperóxido de ácido linoleico) (Sensibilidad a los 5; Resistencia a los 2 primeros) (3 concentraciones de cada uno para determinar sensibilidad y 1 concentración para determinar resistencia)	Individual	4516 cepas diploides homocigotas	SC sólido		(Thorpe et al., 2004)
Hidroxiurea (100 mM), Benomilo (15 µg/ml), Tunicamicina (1 µg/ml), Rapamicina (50 µg/ml), 6-azauracilo (100 µg/ml), Cicloheximida (0.1 µg/ml), Cafena (8 mM), 5-fluorouracilo (20, 40, 80 mM), Glucosamina (3%), Sorbitol (1.5 M, YPGlicerol e YPGalactosa (Esenciales)	Individual	602 cepas esenciales con promotor Tet regulable (YTHC collection)			(Mnamme et al., 2004)
Amoxicilina, Gentamicina, Penicilina G, (oxy)Tetraciclina, Rifampicina, Tetraciclina, Vancomicina (256 µg/ml)	Individual	~4800 cepas haploides MATa	YPD sólido	0, 17, 0, 4, 0, 2, 0	(Blackburn and Avery, 2003)
Geldanamicina (Inhibidor de Hsp90) (20 µg/ml)	TAG3 array (Affymetrix)	Pool de cepas de delección haploides MATa	YPD	200	(Zhao et al., 2005)
Cincresina (inhibidor del "checkpoint" del huso mitótico) (200 µM)	Individual	~4800 cepas haploides MATa	YPD	124	(Dorer et al., 2005)
Cincresina (inhibidor del "checkpoint" del huso mitótico) (200 µM y 400 µM)	TAG3 array (Affymetrix)	Pool de cepas de delección diploides heterocigotas	YPD	53, 106	(Dorer et al., 2005)
PS-341 (inhibidor del proteasoma) (260 µM)	TAG3 array (Affymetrix)	Pool de cepas de delección diploides homocigotas	YPD	52	(Fleming et al., 2002)
Quitosan (25 µg/ml) Sensibilidad No Esenciales / Esenciales a 5h y 9h.	TAG3 array (Affymetrix)	Pool de cepas de delección diploides homocigotas y pool de cepas diploides heterocigotas esenciales	SC	184, 153 / 11, 3	(Zakrzewska et al., 2007)
1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) (250 µM) and N,N-dimethyl-4,4-bipiridinium (paraquat) (2000 µM) (sensibilidad)	TAG3 array (Affymetrix)	Pool de cepas de delección diploides homocigotas	YPD	96, 141	(Doostzadeh et al., 2007)
Arsénico 1 mM, 2 mM y 5 mM	TAG3 array (Affymetrix)	Pool de cepas de delección diploides homocigotas	YPD		(Haugen et al., 2004)
Agentes que causan daño al DNA MMS (4-NQO, H ₂ O ₂ y UV 254 nm (sensibilidad) (4 concentraciones de cada agente) (MMS: 0.01%, 0.02%, 0.025%, 0.03%), (4-NQO: 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 µg/ml), (t-BUOOH: 0.5, 0.75, 1, 1.25 mM), (UV 40, 80, 100, 125 J/m ²)	Individual	~4800 cepas haploides MATa	YPD sólido	1441, 819, 447, 288	(Begley et al., 2004)
Hidroxiurea (sensibilidad y resistencia a 50 mM), (sensibilidad y resistencia a 150 mM)	Individual	~4800 cepas haploides MATa	SC sólido	(42 y 18), (52 y 4)	(Hartman and Tippery, 2004)
Hidroxiurea (sensibilidad y resistencia a 50 mM), (sensibilidad y resistencia a 150 mM)	Individual	~4800 cepas diploides homocigotas	SC sólido	(66 y 76), (213 y 72)	(Hartman and Tippery, 2004)
Hidroxiurea (100 mM)	Individual	~4800 cepas haploides MATa	YPD sólido	49	(Woolstencroft et al., 2006)
MMS 0.035% (Metil Melanosulfonato)	Individual	~4800 cepas haploides MATa	YPD sólido	103	(Chang et al., 2002)
MMS (0.02%) (inducción)	Individual; FACS	4156 cepas con cada ORF marcado con GFP (en su localización cromosómica?)	YPD	157	(Lee et al., 2007)
Bleomicina (2 y 7.5 µg/ml) (hipersensibilidad)	Individual	~4800 cepas haploides MATa	YPD sólido	231	(Aouida et al., 2004)
Cisplatino (0.80 mM)	Individual	~4800 cepas diploides homocigotas	YPD sólido	76	(Liao et al., 2007)
Cisplatino (160 µM) (resistencia)	Pool	4637 cepas diploides homocigotas	SD sólido	22	(Huang et al., 2005)
Bases purínicas mutagénicas (análogos 6-hidroxiyaminopurine (HAP) y 2-amino-HAP (AHA))	Individual	~4800 cepas haploides MATa	YPD sólido	16, 3	(Stepchenikova et al., 2005)
Tirapazamina (TP2) (droga anti-tumoral cuya diana es la topoisomerasa II) ((300 y 750 µM)(sensibilidad, resistencia)	Individual	4600 cepas haploides MATa	YPD sólido	73, 117	(Hellauer et al., 2005)
Radiación ionizante (Rayos γ, 80 Krad)	Individual	~4800 cepas diploides homocigotas	YPD / YPG	107	(Bennett et al., 2001)
Radiación ionizante	TAG3 array (Affymetrix)	Pool de cepas de delección no esenciales (?)			(Game et al., 2003)
Radiación ionizante (Rayos γ, 200Gy) , Radiación UV (UV-C, 200 J/m ²), Cisplatino (1 mM), Peróxido de hidrógeno (1 mM)	TAG3 array (Affymetrix)	Pool de cepas de delección diploides homocigotas	YPD		(Birrell et al., 2002)
Radiación UV (UV-C, 200 J/m ² ; UV-B: 6400 J/m ²)	TAG3 array (Affymetrix)	Pool de cepas de delección diploides homocigotas	YPD	31	(Birrell et al., 2001)
UV (7 intensidades desde 110 a 270 J/m ²) y MMS (0.001% y 0.01%)	TAG3 array (Affymetrix)	Pool parcial de cepas de delección diploides heterocigotas (2827 cepas)	YPD	164, 147	(Hanway et al., 2002)
Radiación UVB de baja intensidad (continua) (1.04 J/m ²)	TAG3 array (Affymetrix)	Pool de cepas de delección diploides homocigotas	YPD	8	(O'Neill et al., 2004)
Cisplatino (1 mM), Oxaliplatin (10 mM) y Mitomicina C (0.5 mM) (sensibilidad, resistencia)	TAG3 array (Affymetrix)	Pool de cepas de delección diploides homocigotas	YPD	130, 100	(Wu et al., 2004)
12 agentes: Cisplatino (500 µM), Carboplatino (15 mM), Oxaliplatin (4 mM), Paclitaxel (0.5 µM), Angelicina (62.5 µM), Estreptozocina (2 mM), 2-DMAEC (240 mM), Meclorexamina (62.5 µM), MMS (0.02%), Camptotecina (30 µg/ml), 4-NQO (0.0313 µM) y Mitomicina C (1 mM)	TAG array (?)	Pool de cepas de delección haploides MATa	YPD o SC		(Lee et al., 2005)
Inestabilidad Genómica (3 ensayos específicos)	Individual; 3 test específicos de inestabilidad genómica	~4800 cepas haploides MATa y 4800 cepas haploides MATa		130	(Yuen et al., 2007)

3.2- Interacciones Genéticas

3.2.1- Sintéticos Letales

Un nuevo tipo de escrutinios globales se basa en el fenómeno conocido como letalidad sintética, que es conceptualmente opuesto al fenómeno de supresión (Guarente, 1993). La letalidad sintética (SL, de “*synthetic lethality*”) se aplica a cualquier combinación de mutaciones que por separado son viables pero que combinadas en la misma célula generan un mutante inviable. De forma similar, el término “*synthetic sick*” (SS) (sintéticos deletéreos) hace referencia al fenómeno por el que la combinación de mutaciones no letales dan lugar a un fenotipo crecimiento lento mucho más severo que el que correspondería a la adición de los fenotipos de cada una de las mutaciones por separado. En el primer caso, su interpretación biológica refleja una interacción génica esencial para la viabilidad celular; mientras que el segundo correspondería a una interacción importante para la célula, pero no esencial.

Cuando la letalidad sintética es aplicada a las interacciones entre alelos mutantes nulos, puede desvelar la existencia de genes con actividades redundantes que actúan en paralelo en la misma ruta biológica, la existencia de dos genes que pertenecen a rutas diferentes pero funcionalmente redundantes, o la existencia de dos genes que codifican componentes de un mismo complejo proteico y entre los que existen relaciones o mecanismos compensatorios (“*buffer*”). Estos fenómenos son el resultado de la robustez de los circuitos biológicos, que permiten a la célula responder a las diferentes situaciones de estrés ambiental ó genético a las que se enfrentan las poblaciones naturales (Hartman et al., 2001; Tucker and Fields, 2003).

Cuando el análisis de letalidad sintética es aplicado a la interacción entre alelos mutantes condicionales en los que la pérdida de función no es total (p. ej. mutantes termosensibles, de expresión inducible, etc), la interpretación biológica de las interacciones genéticas es más compleja. En este caso, el fenotipo de letalidad puede ser debido a interacciones entre genes con un orden de acción lineal en la misma ruta biológica; sirviendo como ejemplo el de mutaciones que reducen el flujo parcialmente de forma que la reducción combinada de dos mutaciones genera letalidad.

Los análisis de letalidad sintética son muy útiles para identificar la función de los genes y las rutas biológicas o los complejos proteicos en los que participan. Por ejemplo, Tong *et al.* desarrollaron un método para la **construcción sistemática de dobles mutantes**, llamado **SGA** (de “*Synthetic Genetic Array*”) (Tong et al., 2001), en el que se parte de la colección de mutantes de delección de la levadura. El método consiste en cruzar cepas haploides *MAT α* con la mutación no letal “de interés”, con cada una de las cepas de la colección de cepas deletantes *MAT α* ; tras la selección de los diploides diheterocigotos resultantes se induce su esporulación y, por último, se seleccionan los dobles mutantes haploides y se analiza su capacidad de crecimiento ó el fenotipo de la interacción génica en estudio (Fig. 6).

En el año 2004 fue publicado el primer escrutinio SGA masivo (Tong et al., 2004). En este trabajo se emplearon 132 mutantes de interés implicados en procesos como la biosíntesis de la pared celular, la organización del citoesqueleto, la segregación de cromosomas dependiente de microtúbulos y la síntesis y reparación de DNA. Como resultado, se identificaron una media de 34 interacciones para cada mutante y un total de 4000 interacciones que implicaban unos 1000 genes. La red de interacciones génicas generada muestra que: los genes pertenecientes a la misma ruta o complejo suelen presentar perfiles de letalidad sintética parecidos y, además, sus

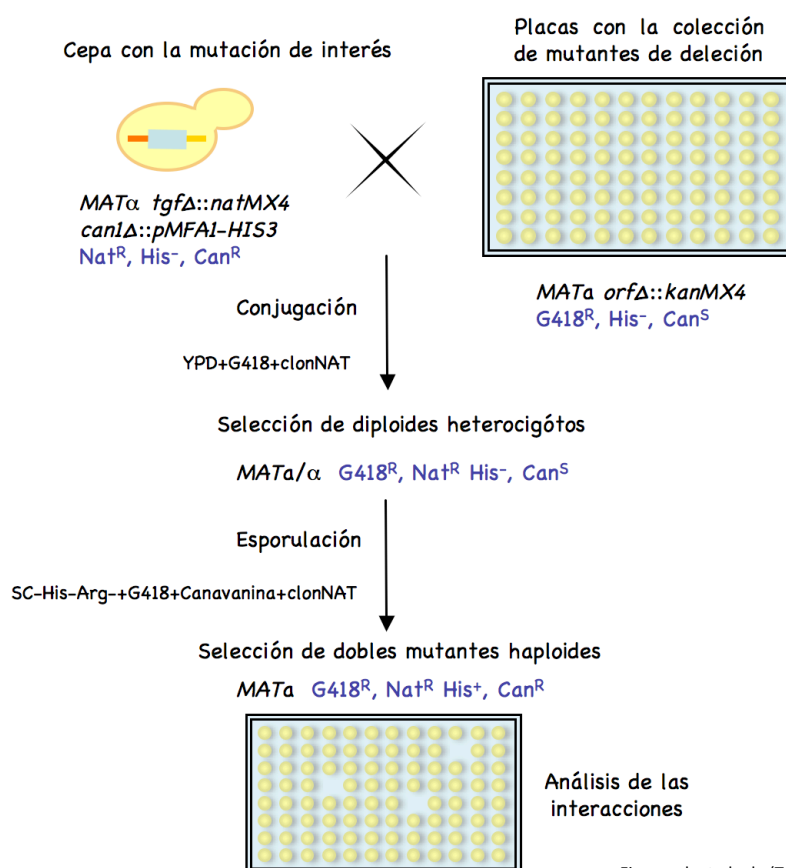


Figura adaptada de (Tucker and Fields, 2003)

Figura 6. Análisis de interacciones genéticas: letalidad sintética. Construcción sistemática de dobles mutantes mediante SGA. La mutación de interés se introduce en la colección de mutantes de delección haploides *MAT α* mediante conjugación con la cepa *MAT α* , portadora de la mutación de interés (*tgf Δ ::natMX4*) y del módulo SGA ("SGA reporter") *can1 Δ ::pMFA1-HIS3*. Posteriormente, tras seleccionar los diploides heterocigotos en un medio con nourseotricina y geneticina, se transfieren a un medio de esporulación para inducir la formación de las esporas meióticas haploides. Éstas, son transferidas a un medio sintético con canavanina y carente de histidina donde únicamente la progenie haploide *MAT α* es capaz de germinar. Esto es así ya que el módulo *can1 Δ ::pMFA1-HIS3*, consiste en el gen *HIS3* bajo el control del promotor *MFA1* insertado en el locus *CAN1*, únicamente es activo en células *MAT α* , y debido a la delección del locus *CAN1*, son resistentes a canavanina. Por último, la progenie haploide *MAT α* portadora de la doble delección es seleccionada en un medio con nourseotricina y geneticina, en la que se analizan las interacciones. Abreviaciones: *tfg*, "tu gen favorito" mutado; G418, geneticina; clonNAT, nourseotricina; Nat^R, resistente a nourseotricina; Can^R, resistente a canavanina; G418^R, resistente a geneticina; His⁻, incapaz de crecer en medio mínimo carente de histidina.

vecinos inmediatos tienden a interactuar entre ellos. Estas características de las redes genéticas pueden ser aprovechadas para predecir las interacciones genéticas y la función biológica de genes sin caracterizar.

Como alternativa al SGA, en 2003 fue desarrollada una nueva técnica denominada **SLAM** ("Synthetic Lethality Analysis by Microarray"). Esta técnica consiste en integrar la mutación de interés en cada uno de los mutantes de la población ("pool") de deletantes haploides. Tras la extracción de DNA genómico de la población de transformantes, sus etiquetas moleculares son amplificadas y marcadas fluorescentemente mediante PCR, y analizadas por hibridación a un "microarray" de oligonucleótidos complementarios (Fig. 7a), de forma análoga a lo descrito anteriormente en el apartado 3.1.2. La ausencia de hibridación positiva de determinadas etiquetas permite identificar aquéllos genes que muestran letalidad sintética con el gen objeto del análisis (Ooi et al., 2003).

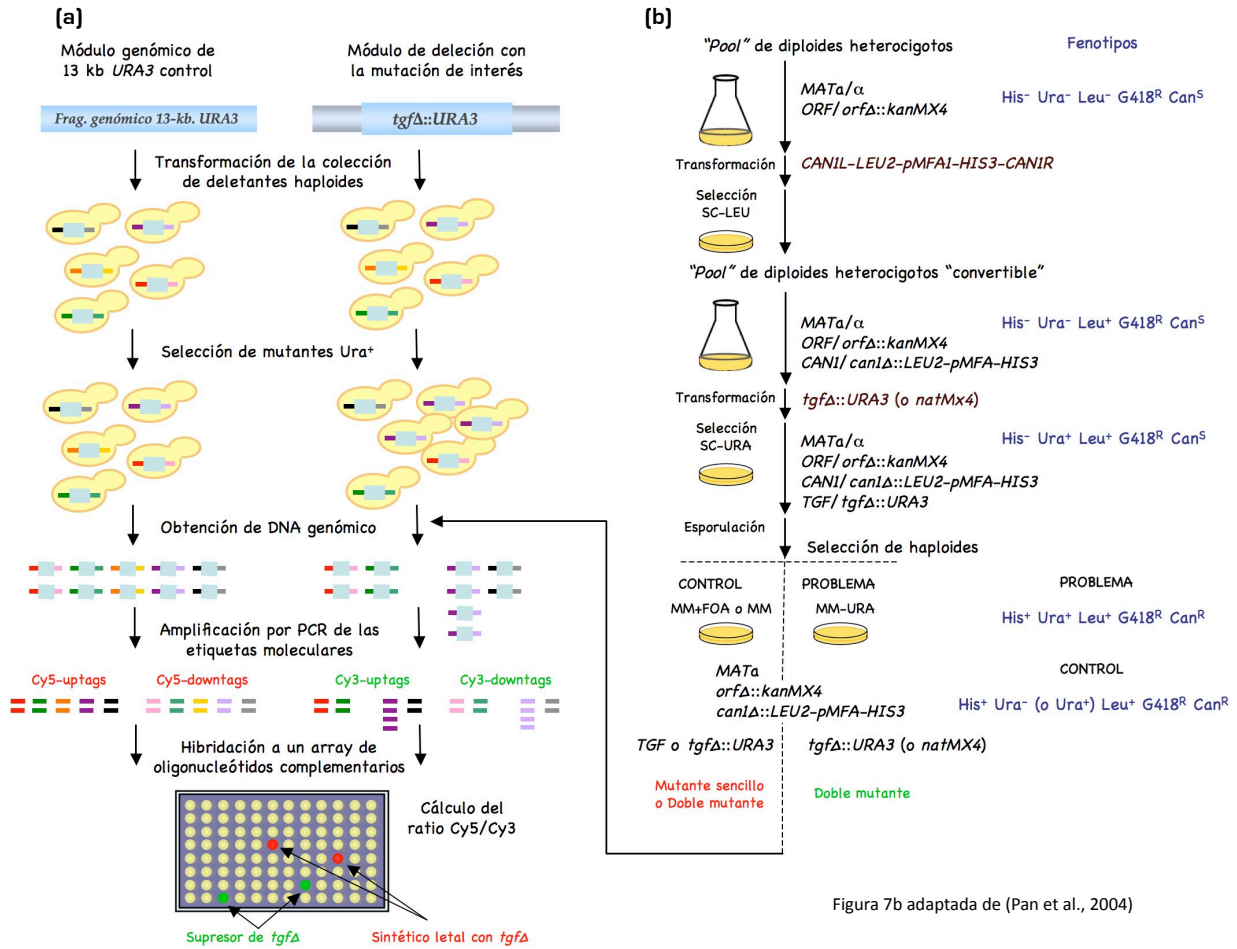


Figura 7b adaptada de (Pan et al., 2004)

Figura 7. Análisis de interacciones genéticas: *SLAM* y *dSLAM*. **(a)** *SLAM* (“*Synthetic Lethality Analysis by Microarray*”). Análisis en paralelo de las interacciones genéticas entre la colección de mutantes de delección y *tgf*. El “*pool*” de deletantes haploides *MATA* se transforma en paralelo con un fragmento genómico de 13-kb. del locus *URA3* y un módulo de interrupción de *TGF* con el marcador *URA3*. Tras seleccionar los transformantes en placas SC-ura, se extrae el DNA genómico y se amplifican por PCR las etiquetas moleculares, marcando las correspondientes al DNA genómico control con Cy5 (rojo) y las del DNA genómico problema con Cy3 (verde). Estas sondas fluorescentes se co-hibridan a un “*array*” de oligonucleótidos complementarios y se analiza la abundancia relativa de cada cepa en la población control y problema, revelando las interacciones entre cada uno de los mutantes de delección con *tgf*. Un ratio elevado Cy5/Cy3 (C/P) indica que *tgfΔ::URA3* es sintético letal con el correspondiente deletante haploide (mutante naranja en la figura), mientras que lo opuesto indica un fenómeno de supresión (mutante violáceo en el ejemplo). **(b)** *dSLAM* (“*Diploid-based Synthetic Lethality Analysis by Microarray*”). Esta estrategia se basa en la utilización de la colección de deletantes diploides heterocigotos por, mediante una transformación *en masse* con una construcción derivada del módulo *SGA*, obtener una población de deletantes heterocigotos “convertible” en haploides. Este “*pool*” de mutantes puede ser alicuoteado y almacenado a -80°C para futuro uso. En un típico experimento para estudiar las interacciones genéticas con *tgf*, se introduce en el “*pool*” de mutantes, mediante transformación integrativa, la construcción *tgfΔ::URA3* (o *natMX4*) con flancos largos (~ 1,5 kb.). Esta construcción es previamente obtenida mediante amplificación por PCR del DNA genómico del mutante haploide *tgfΔ::URA3* (o *natMX4*), que resulta del reemplazamiento del marcador de selección *kanMX4* por el marcador *URA3* (o *natMX4*) en el mutante *tgfΔ::kanMX4*, valiéndose para ello de las secuencias promotoras y terminadoras comunes (*pTEF/tTEF*) que comparten los marcadores. El “*pool*” de mutantes heterocigotos generado, se transfiere a un medio de esporulación con objeto de inducir la formación de los productos meióticos haploides. Posteriormente, las esporas se seleccionan de forma paralela en MM-Ura para obtener la población de mutantes haploides *MATA* dobles (Problema), y en MM o MM+FOA para obtener la población control de mutantes sencillos y dobles (en MM) o únicamente de mutantes sencillos (en MM+FOA). A continuación, y tras purificar el DNA genómico de cada población, se siguen los pasos ya descritos en la estrategia *SLAM*. Estas estrategias son muy versátiles y pueden ser fácilmente modificadas para estudiar otros tipos de interacciones genéticas, como se indica en el texto. Abreviaciones: *tgf*, “tu gen favorito” mutado; *Nat^R*, resistente a nourseotricina; *Can^R*, resistente a canavanina; *G418^R*, resistente a geneticina; *His⁻*, incapaz de crecer en medio mínimo carente de histidina; *Leu⁻*, incapaz de crecer en medio mínimo carente de leucina; SC, medio sintético completo; MM, “medio mágico”: SC-Leu-His-Arg+Canavanina+G418; FOA, 5-ácido fluoro orótico; Cy3 y Cy5, fluoróforos de cianina 3 y cianina 5.

Más recientemente se ha desarrollado una nueva estrategia denominada **dSLAM** (“*Diploid-based Synthetic Lethality Analysis by Microarray*”) que es el resultado de la **combinación** de los análisis **SGA** con el potencial de las etiquetas moleculares que identifican cada deletante y los “**microarrays**” de **oligonucleótidos de DNA complementarios**. En este método se emplea un “*pool*” de cepas mutantes **diploides heterocigotas** que contienen un **marcador especial**, variante del “*SGA reporter*”, que permite, tras seguir un proceso de selección similar al que tiene lugar en *SGA*, “**convertirlas**” en **deletantes haploides** (Pan et al., 2007; Pan et al., 2004) (Fig. 7b). Según sus autores, este método es más robusto y produce un menor número de falsos negativos, potencialmente menos falsos positivos, y mayor reproducibilidad que las estrategias *SGA* y *SLAM*. Esto es así debido fundamentalmente, al menor error experimental al realizar un único proceso de transformación en masa, y a una mayor calidad genética de las cepas diploides heterocigotas, puesto que son sometidas a una menor presión selectiva. El potencial de esta técnica es enorme, ya que hasta el momento se ha aplicado al estudio de interacciones genéticas, interacciones químico-genéticas, supresión de defectos en el crecimiento por una segunda mutación, interacciones genéticas con un alelo condicional de un gen esencial, interacción sintética dependiente de dosis, supresión dependiente de dosis y haploinsuficiencia sintética (interacción genética poco común en la que dos mutaciones que en heterocigosis carecen de fenotipo, dan lugar a fenotipo cuando se combinan en la misma célula) (Pan et al., 2006; Pan et al., 2004). No obstante, todas estas estrategias basadas en “*microarrays*” presentan algunas debilidades técnicas asociadas al proceso de hibridación, debidas a mutaciones en las etiquetas moleculares o a la adquisición de estructuras secundarias en dichas etiquetas que dificultan su hibridación.

Una extensa revisión sobre letalidad sintética y las técnicas comentadas se puede consultar en (Ooi et al., 2006).

Los estudios realizados aplicando estas estrategias han mostrado que las interacciones de letalidad sintética entre genes no esenciales son a menudo difíciles de interpretar, ya que tienen lugar con más frecuencia entre genes que participan en distintos procesos, generalmente paralelos (Kelley and Ideker, 2005). La letalidad sintética representa de hecho un caso concreto del fenómeno de **epistasia**, por el cual el fenotipo asociado a un gen, se ve alterado por la presencia o ausencia de otro/s gen/es no alélicos. Este fenómeno, incluye:

- a) **Interacciones negativas** (sinérgicas), en las cuales el fenotipo del doble mutante es más grave que el de los mutantes individuales, y que en el caso extremo lleva a la letalidad sintética. Normalmente, como ya hemos comentado, reflejan actividades en rutas separadas pero compensatorias (Hartman et al., 2001; Kelley and Ideker, 2005; Zeyl, 2007).
- b) **Interacciones positivas** (antagonistas), en las cuales el fenotipo del doble mutante es menos grave que el fenotipo del mutante individual menos viable. Ocurren, normalmente entre productos génicos que operan en conjunto o forman parte de la misma ruta lineal (Ye et al., 2005; Zeyl, 2007).

Con objeto de estudiar cuantitativamente y de forma exhaustiva ambos tipos de interacciones genéticas, han surgido muy recientemente nuevas estrategias, también basadas en modificaciones del *SGA* y denominadas por algunos autores **E-MAPs** (de “*Epistatic Miniarray Profiles*”) (Schuldiner et al., 2005), que se fundamentan en la selección de grupos de mutantes funcionalmente relacionados, entre los que la densidad de interacciones genéticas es

mayor (Drees et al., 2005; Schuldiner et al., 2005; St Onge et al., 2007). Este tipo de análisis ha sido empleado para estudiar en profundidad las interacciones entre mutantes implicados en la ruta de secreción temprana (Schuldiner et al., 2005), en la biología del cromosoma (Collins et al., 2007b), en subunidades del proteasoma (Laribee et al., 2007) y entre mutantes implicados en el crecimiento filamentoso invasivo (Drees et al., 2005), o más recientemente entre mutantes sensibles a metil metanosulfonato (MMS) (St Onge et al., 2007). Un compendio de los escrutinios basados en letalidad sintética y epistasia, se puede consultar en la [Tabla 2b](#). Asimismo, una excelente revisión de Charlie Boone *et al.* (Boone et al., 2007) repasa aspectos relacionados con este tema, así como con el siguiente apartado, correspondiente a supresión y letalidad (sintética) dependiente de dosis génica.

3.2.2- Supresión y Letalidad Sintética Dependiente de Dosis Génica

La **supresión dependiente de dosis génica** es el fenómeno por el cual la sobreexpresión de un gen **compensa** el fenotipo de la mutación en otro gen, mientras que la **letalidad sintética dependiente de dosis génica** hace referencia al fenómeno por el cual la sobreexpresión de un gen **potencia** el fenotipo de la mutación de otro gen.

Para estudiar estos fenómenos, se han realizado análisis que emplean algunas de las estrategias comentadas previamente. Así, la transformación de todas las cepas de delección ya sea de forma individual o en “*pool*”, y la consiguiente expresión o sobreexpresión de la proteína/s de interés ha sido empleado en numerosos estudios con diferentes objetivos ([Tabla 2c](#)).

La **transformación de las cepas deletantes de manera individual** ha sido empleada en estudios de expresión de proteínas heterólogas; como es el caso de la expresión de proteínas humanas relacionadas con desórdenes neurodegenerativos (huntingtina y α -sinucleína) y la identificación de mutantes que provocan letalidad sintética (Willingham et al., 2003). En otros trabajos se han expresado virus de RNA e identificado mutantes supresores y potenciadores de la replicación de los mismos (Panavas et al., 2005; Serviene et al., 2006; Serviene et al., 2005). Con anterioridad, ya se habían estudiado los genes que afectan a la expresión del retrotransposón Ty (Griffith et al., 2003).

También se han realizado análisis de expresión de proteínas “*reporter*” con una localización específica y marcadas con GFP u otro epítipo, con objeto de identificar aquellos mutantes de delección en los que la proteína no se localiza correctamente (Murthi and Hopper, 2005; Proszynski et al., 2005).

Por otra parte, la **transformación de las cepas de delección de forma masiva (en “*pool*”)** ha sido empleada en numerosos análisis, y de este modo se han logrado identificar genes cuya delección suprime el fenotipo de toxicidad inducido por la huntingtina (Giorgini et al., 2005). También ha sido utilizada, en **combinación con los “microarrays de TAGs”**, para identificar genes necesarios en el sistema de reparación de daño en el DNA por unión de extremos no homólogos (“*non-homologous DNA end-joining*”) (Ooi et al., 2001), genes necesarios para la formación de unas estructuras membranosas del retículo endoplásmico (Wright et al., 2003), ó genes que causan letalidad sintética en combinación con la sobreexpresión de proteínas del cinetócoro (Measday et al., 2005).

Así mismo, el fenómeno de **haploinsuficiencia**, normalmente explotado en la identificación de las dianas de compuestos químicos y caracterización de su mecanismo de

acción (Giaever et al., 2002; Giaever et al., 1999; Lum et al., 2004), es otro ejemplo de variación, en este caso de disminución, de la dosis génica.

Muy recientemente ha surgido una nueva estrategia, conceptualmente opuesta a las colecciones de deletantes, para estudiar de forma exhaustiva y a gran escala los fenotipos derivados de **ganancia de función**. Estos ensayos consisten en la **sobreexpresión condicional de todos los genes de la levadura**, y han sido desarrollados por diferentes grupos empleando diferentes estrategias (Butcher et al., 2006; Niu et al., 2008; Sopko et al., 2006).

Así, Sopko *et al.* han construido una colección de 5280 cepas, cada de las cuales sobreexpresa condicionalmente un único gen de la levadura. Con este **“array de sobreexpresión”** se han identificado, de forma sistemática, genes cuya sobreexpresión es tóxica para la célula. Además, y con objeto de estudiar la **letalidad sintética dependiente de dosis génica** en una cepa mutante (*pho85Δ*), se ha **combinado** esta estrategia con el análisis **SGA** (Sopko et al., 2006).

A su vez, el grupo de Schreiber ha construido una colección de ~ 3900 plásmidos capaces de sobreexpresar de forma condicional una determinada proteína de la levadura. De manera análoga a los **“TAGS”** de las cepas de delección, cada una de las construcciones está marcada con una **secuencia identificativa única** que permite determinar su abundancia relativa mediante la hibridación a **“microarrays” de oligonucleótidos complementarios**. Tras la transformación de una cepa de tipo silvestre con el **“pool”** de plásmidos obtuvieron conjuntos de transformantes que fueron sometidos a una condición selectiva, en este caso tratamiento con una droga. A continuación, aislaron los plásmidos y amplificaron y marcaron fluorescentemente las etiquetas moleculares para proceder a su análisis por hibridación a **“microarrays”** de secuencias complementarias. De esta forma, lograron identificar aquellas proteínas cuya sobreexpresión afecta al crecimiento en presencia de la droga en comparación con el control sin tratar (Butcher et al., 2006).

En resumen, todas estas colecciones suponen una revolución, en cuanto a cobertura, rapidez y coste de los ensayos, frente a los escrutinios tradicionales de identificación de la mutación responsable de la resistencia o sensibilidad de un mutante a una determinada condición selectiva. Tradicionalmente, se han seleccionado mutantes resistentes a un determinado compuesto o condición de cultivo plaqueando la cepa silvestre a altas concentraciones del compuesto y seleccionando los clones resistentes que surgían producto de alguna mutación espontánea o inducida. La transformación de estas cepas resistentes con una genoteca genómica permite la identificación del clon que devuelve la sensibilidad al compuesto. Otra forma para identificar genes que determinan resistencia a una droga o supervivencia en una determinada condición consiste en la selección de los clones de una genoteca genómica que son capaces de crecer en las condiciones selectivas. Estos clones resistentes deben ser posteriormente acotados y secuenciados para identificar el gen o genes cuya sobreexpresión es responsable de la resistencia. Estos escrutinios “tradicionales” a pesar de que han evolucionado, por ejemplo con la construcción de un **“array”** de cepas sobreexpresando una genoteca genómica (Luesch et al., 2005), son lentos y tediosos, y además, no suelen ser saturantes.

IV. Integración de datos “ómicos”: métodos bioinformáticos y construcción de bases de datos

El crecimiento exponencial en el volumen de información continuamente generada en los distintos estudios “ómicos” comentados en el apartado anterior, está proporcionando a los científicos una visión mucho más amplia y compleja de los sistemas biológicos. No obstante, y debido a la naturaleza de los datos y al gran volumen generado, éstos deben ser almacenados, filtrados y procesados eficientemente con objeto de extraer la mayor cantidad de información biológica relevante. En este sentido, se están continuamente implementando nuevos y avanzados métodos bioinformáticos, bases de datos y herramientas de gestión y visualización de datos, que permitan afrontar las exigencias de la era post-genómica.

A continuación, se expondrán los **principales recursos** desarrollados en cada uno de estos campos:

1.- Bases de Datos Biológicas

Las **bases de datos biológicas** son colecciones o repositorios de datos ordenados que permiten realizar búsquedas de variada complejidad para extraer determinada información útil. Los datos deben ser almacenados de forma eficiente, ordenada, flexible, escalable, en formato estandarizado y de acceso simple y público, que permita su fácil manejo e interpretación por los investigadores y su comparación con otras bases de datos. Así, han surgido **estándares comunitarios** de presentación (como, p. ej. información mínima sobre un experimento de “*microarray*”, *MIAME* (Brazma et al., 2001)), de anotación y de verificación de datos biológicos (como, p. ej. estándar de datos de “*microarrays*” de expresión génica, *MGED* (Brazma et al., 2001)). También han surgido iniciativas como *Gene Ontology* (GO) (Ashburner et al., 2000), que será descrito ampliamente más adelante en la sección *Estrategia Experimental y Métodos*, con la intención de representar los datos biológicos de forma estructurada y empleando un lenguaje común para todos los organismos. Otros estándares y vocabularios estructurados desarrollados en otros campos, se pueden consultar en el *Open Biomedical Ontologies* (OBO; <http://obo.sourceforge.net/>).

Para *S. cerevisiae* existen tres bases de datos generales que almacenan toda la información, organizada fundamentalmente por ORFs. Dos de ellas son de acceso libre, **SGD** (*Saccharomyces Genome Database* con base en la Universidad de Stanford) (Cherry et al., 1998) y **CYGD** (*Comprehensive Yeast Genome Database* con base en el *MIPS*) (Guldener et al., 2005) y han sido empleadas de forma extensiva en este trabajo para consultar la información que en ellas está depositada. La tercera, **YPD** (*Yeast Proteome Database*, propiedad de Incyte) (Hodges et al., 1998) es de acceso restringido sujeto a suscripción.

Existen, así mismo, muchas otras bases de datos que recopilan información especializada con mayor detalle. El **Cuadro 3** pretende mostrar algunas de las **bases de datos, recursos y métodos** disponibles para *S. cerevisiae*.

Cuadro 3. Algunas bases de datos y otros recursos para *S. cerevisiae*

<input checked="" type="checkbox"/>	General: SGD: http://www.yeastgenome.org/ CYGD: http://mips.gsf.de/genre/proj/yeast/ YPD: https://www.proteome.com/proteome/
<input checked="" type="checkbox"/>	Interacciones: BIND: http://www.bind.ca/Action BioGrid: http://www.thebiogrid.org/ Yeast protein complex database: http://yeast.cellzome.com/ Tap published data: http://tap.med.utoronto.ca/search_pub.php
<input checked="" type="checkbox"/>	Rutas biológicas: Yeast Biochemical Pathways: http://www.yeastgenome.org/biocyc/
<input checked="" type="checkbox"/>	Microarrays: Gene Expression Omnibus: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/ ArrayExpress: http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/ yMGV: http://transcriptome.ens.fr/ymgv/ Stanford Microarray database: http://genome-www5.stanford.edu/
<input checked="" type="checkbox"/>	Localización proteica: Yeast GFP Fusion Localization database (yeastgfp): http://yeastgfp.ucsf.edu/ Yeast Protein Location Database (YPLdb): http://ypl.uni-graz.at/pages/home.html
<input checked="" type="checkbox"/>	Fenotipo: PROPHECY: http://prophecy.lundberg.gu.se/ Saccharomyces Cerevisiae Morphological Database (SCMD): http://scmd.gi.k.u-tokyo.ac.jp/datamine/
<input checked="" type="checkbox"/>	Ortólogos: Inparanoid: http://inparanoid.cgb.ki.se/ YOGY: http://www.sanger.ac.uk/PostGenomics/S_pombe/YOGY/

2.- Métodos Bioinformáticos

La ingente cantidad de datos generados en los estudios “ómicos” deben de ser **procesados, normalizados y analizados estadísticamente**, con objeto de eliminar el “ruido” debido a factores técnicos o de procedimiento (formato del ensayo, errores de pipeteo, errores en la concentración de compuestos, errores de réplica, etc) y maximizar la sensibilidad y precisión del ensayo (Malo et al., 2006). Para ello, además de optimizar los factores técnicos y de procedimiento, introduciendo en el ensayo controles internos y réplicas, se han implementado, especialmente en el campo de los análisis transcripcionales, una serie de métodos y herramientas destinadas a procesar, normalizar los datos y analizar su significancia (Fang et al., 2003; Tilstone, 2003).

Paralelamente, se han desarrollado un gran número de métodos bioinformáticos cuyo propósito es **extraer la máxima información biológica** posible de los datos. Con este fin, se han diseñado diversos **algoritmos** y nuevas **aproximaciones computacionales** para predecir, inferir, simular, validar y mejorar nuestra comprensión del comportamiento de los sistemas biológicos. La mayoría de éstas aproximaciones se pueden dividir en tres niveles de análisis:

- Métodos de extracción de información biológica basados en **la comparación de datos entre diferentes especies**. Engloba tanto métodos comparativos “clásicos” para la identificación de secuencias conservadas ya sean de DNA (Kellis et al., 2003) o de proteína (Remm et al., 2001); como métodos más novedosos aplicados a la

comparación entre especies de las interacciones proteicas (Bandyopadhyay et al., 2006; Gavin and Superti-Furga, 2003; Kelley et al., 2004; Marcotte et al., 1999; Sharan et al., 2005b), de las redes metabólicas (Forst and Schulten, 2001; Yamada et al., 2006), o de los perfiles de transcripción (Bergmann et al., 2004; Stuart et al., 2003), o incluso de los perfiles proteicos filogenéticos (Date and Marcotte, 2003; Pellegrini et al., 1999).

- b) Nuevas estrategias para profundizar en el conocimiento de las complejas redes de regulación a cada uno de los niveles específicos de análisis (genoma, transcriptoma, proteoma, metaboloma, etc) y explorar las intrincadas relaciones entre ellos. Estos estudios se basan fundamentalmente en **conectar y agrupar patrones específicos** de expresión génica (Eisen et al., 1998), de interacciones proteicas (Valencia and Pazos, 2002) o genéticas (de la Fuente et al., 2002), o de metabolitos (Steuer et al., 2003), aplicando diferentes algoritmos y criterios (métodos supervisados o no supervisados).
- c) Adicionalmente, en el novedoso campo de la biología de sistemas, han emergido numerosas aproximaciones holísticas diseñadas para elucidar la complejidad biológica, mediante el **análisis combinado e integral** de datos provenientes **de diferentes estudios “ómicos”** o de estudios realizados en paralelo. Así, han aparecido estrategias que combinan los datos provenientes de análisis masivos (tipo “High-throughput”) en todas sus posibilidades: metabólicos y fenotípicos (Segre et al., 2005), transcripcionales y proteómicos (Ge et al., 2001), transcripcionales y de localización (Drawid et al., 2000), fenotípicos y de interacciones proteicas (Said et al., 2004), de interacciones genéticas e interacciones proteicas (Kelley and Ideker, 2005), o de la combinación de datos de varias aproximaciones “ómicas” (Bader et al., 2004; Castrillo et al., 2007; Herrgard et al., 2006; Lee et al., 2004; Schlitt et al., 2003; Tanay et al., 2004; Wong et al., 2004; Zhang et al., 2005; Zhong and Sternberg, 2006). Sharan e Ideker han publicado muy recientemente una revisión sobre este emergente campo de la bioinformática (Sharan and Ideker, 2006).

3.- Herramientas Bioinformáticas

Este apartado pretende servir de orientación ante las diversas herramientas y programas bioinformáticos surgidos para ayudar a analizar y procesar la información resultante de los análisis masivos. Siendo conscientes de las incontables aplicaciones existentes y la imposibilidad de abordarlas todas, haremos especial hincapié en las relacionadas con este trabajo y omitiremos aquellas que tienen que ver con el análisis de secuencias.

Las herramientas bioinformáticas, se basan en **métodos de exploración, clasificación, agrupación y visualización** empleando modelos y algoritmos matemáticos. Estas herramientas se nutren de los datos generados en los diferentes estudios “ómicos” y depositados en las correspondientes bases de datos, aprovechando la existencia de los estándares comunes como se ha comentado anteriormente.

Algunas de las principales herramientas disponibles, ya sean de uso libre como comercial, se pueden resumir en (el [Cuadro 4](#) muestra las direcciones web de cada una de ellas):

- **Herramientas de visualización de redes biológicas:** sirven para organizar y visualizar los datos como redes bidimensionales. Para ello se pueden emplear visores gráficos

generales como *Pajek* (Batagelj and Mrvar, 1998). No obstante, existen programas específicos para datos biológicos como *Osprey* (Breitkreutz et al., 2003), *Cytoscape* (Shannon et al., 2003), *BiobLayout* (Enright and Ouzounis, 2001), *SHARP*, *PIMrider*, o *BioPIXIE* (Myers et al., 2005). Estos programas permiten vincular los datos de interés con las interacciones moleculares descritas para ellos en algunas de las bases de datos biológicos que se han comentado anteriormente, de forma que es posible descubrir rápidamente las relaciones entre los datos y hacer predicciones biológicas relevantes.

- **Herramientas de análisis de datos de “microarrays”:** existe una infinidad de herramientas integradas para analizar, normalizar, filtrar, agrupar y clasificar los datos derivados de los perfiles de expresión génica. Algunos de ellos son de acceso libre como *Cluster* y *TreeView* (Eisen et al., 1998), *Expression Profiler* (Kapushesky et al., 2004), *TMA* (Saeed et al., 2003), *GEPAS* (Herrero et al., 2003), *dChip* (Li and Wong, 2001) y *EXPANDER* (Shamir et al., 2005); mientras que otros son comerciales como *GeneSpring* o *GCOS*. Para usuarios avanzados, existe un proyecto denominado *Bioconductor* (Gentleman et al., 2004), de desarrollo de *software* de código abierto, basado en el lenguaje de programación R, que consta de numerosos paquetes o módulos para el análisis de datos “ómicos” a todos los niveles.
- **Herramientas para el análisis funcional de los datos:** sirven para analizar funcionalmente grupos de datos derivados de los estudios masivos; permitiendo extraer información biológica significativa de los datos. Se basan en extraer y mostrar las características que son comunes al grupo de genes objeto de estudio, ya sea en función de ontologías génicas (“*Gene Ontology*”), motivos proteicos, rutas biológicas, presencia en un determinado tejido, vocablos compartidos, etc. Mientras que la mayoría de las plataformas mencionadas en el apartado de análisis de “microarrays” ya tienen incorporadas algunas de estas funciones, existen herramientas específicas como *FatiGo* (Al-Shahrour et al., 2004), *GoMiner* (Zeeberg et al., 2003), *GOToolBox* (Martin et al., 2004), o específicas para *S. cerevisiae* como *FunSpec* (Robinson et al., 2002) o *GO Term Finder* y *GO Slim Mapper*, ambas del *SGD* (Dwight et al., 2002). También existen plataformas integrales que combinan varias funciones, como *Babelomics* (Al-Shahrour et al., 2005) o *GenePattern*. Esta última constituye una plataforma abierta muy flexible ya que es posible personalizarla a las necesidades del usuario mediante la adición de módulos de análisis ya desarrollados o mediante la programación de módulos en los lenguajes R, Java, y MATLAB. Otra plataforma de análisis, en este caso comercial, es *Spotfire DecisionSite*. Se basa en avanzadas herramientas de visualización interactiva de datos a todos los niveles de conocimiento que ayudan a comprender y analizar los datos. No obstante, contiene paquetes específicamente diseñados para el análisis de datos biológicos a varios niveles. Otra plataforma del mismo estilo es *OmniViz*.
- **Otros recursos específicos para *S. cerevisiae*:** algunas herramientas muy útiles desarrolladas específicamente para la levadura comprenden entre otras, *YETI* (Orton et al., 2004), *T-Profiler* (Boorsma et al., 2005), *MPact* de *MIPS* (Guldener et al., 2006) o *Expression Viewer* y *Expression Connection*, ambas del *SGD* (Ball et al., 2001).
- **Herramientas de minería de datos, o de análisis de metadatos:** estas herramientas permiten extraer información (“*information retrieval*”) y algunas de ellas intentan

inferir relaciones que no aparecen de forma implícita en esa información (“*Data Mining*”). En el contexto biológico, dichas herramientas consultan bases de datos biológicos o de literatura biomédica, y los indexan, clasifican, categorizan y presentan. Algunas de éstas herramientas de libre acceso son: *iHOP* (Hoffmann and Valencia, 2005), *Textpresso* (Muller et al., 2004), *ChiliBot* (Chen and Sharp, 2004), *Pubnet* (Douglas et al., 2005), *MedMiner* (Tanabe et al., 1999), *GoPubMed* (Doms and Schroeder, 2005) o *PubFinder* (Goetz and von der Lieth, 2005).

El maremagnum de datos disponibles, estrategias de análisis, métodos bioinformáticos, aproximaciones matemáticas, y herramientas y programas destinados a analizar dichos datos, ponen de manifiesto la necesidad de disponer de **unidades especializadas de apoyo bioinformático** que ayuden al investigador “de manos” a navegar por el intrincado laberinto que ante él se despliega.

Cuadro 4. Direcciones web de las herramientas comentadas

- ☑ **Herramientas de visualización de redes biológicas**

Pajek: <http://pajek.imfm.si/doku.php>

Osprey: <http://biodata.mshri.on.ca/osprey/servlet/Index>

Cytoscape: <http://www.cytoscape.org/>

PIMWalker™: <http://pim.hybrigenics.com/pimriderext/pimwalker/index.html>

Biolayout: <http://www.biolayout.org/>

SHARP: <http://www.cs.tau.ac.il/~sharp>

bioPIXIE: <http://pixie.princeton.edu/pixie/>
- ☑ **Herramientas de análisis de datos de microarrays**

Cluster y TreeView: <http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>

TM4: <http://www.tm4.org/index.html>

Expression Profiler: <http://ep.ebi.ac.uk/EP/>

GEPAS: <http://www.gepas.org>

dChip: <http://biosun1.harvard.edu/complab/dchip/>

EXPANDER: <http://www.cs.tau.ac.il/~rshamir/expander/expander.html>

GeneSpring: <http://www.silicongenetics.com/cgi/SiG.cgi/Products/GeneSpring/features.smf>

GCOS: <http://www.affymetrix.com/products/software/specific/gcos.affx>

Bioconductor: <http://www.bioconductor.org/>
- ☑ **Herramientas para el análisis funcional de los datos**

GO Term Finder: <http://db.yeastgenome.org/cgi-bin/GO/goTermFinder>

GO Slim Mapper: <http://db.yeastgenome.org/cgi-bin/GO/goTermMapper>

Funspec: <http://funspec.med.utoronto.ca/>

FatiGo: <http://www.fatigo.org>

GoMiner: <http://discover.nci.nih.gov/gominer/index.jsp>

GoToolBox: <http://139.124.62.227/GOToolBox/>

BABELOMICS: <http://www.babelomics.org>

GenePattern: <http://www.broad.mit.edu/cancer/software/genepattern/>

Spotfire: http://www.spotfire.com/solutions/research_analytics/

OmniViz: http://www.omniviz.com/applications/omni_viz.htm
- ☑ **Otras herramientas específicas para *S. cerevisiae***

YETI: <http://www.yetibio.com/>

T-Profiler: <http://www.t-profiler.org/>

MPact: <http://mips.gsf.de/genre/proj/mpact/>

Expression Viewer: <http://pathway.yeastgenome.org:8555/expression.html>

Expression Connection: <http://db.yeastgenome.org/cgi-bin/expression/expressionConnection.pl>
- ☑ **Herramientas de análisis de metadatos:**

iHOP: <http://www.ihop-net.org>

Textpresso: <http://www.textpresso.org/>

PubFinder: <http://zweb.dkfz-heidelberg.de/spec/glycosciences.de/tools/PubFinder/>

Pubnet: <http://pubnet.gersteinlab.org/>

MedMiner: <http://discover.nci.nih.gov/textmining/main.jsp>

ChiliBot: <http://www.chilibot.net/>

GoPubMed: <http://www.gopubmed.org/>

V. Análisis químico-genómicos en *S. cerevisiae*

1.- Químico-Genómica: una Estrategia Emergente para Descubrir Nuevas Drogas e Identificar sus Dianas Moleculares

La **quimiogenómica** (“*chemogenomics*”), también denominada **químico-genómica** (“*chemical genomics*”) o **químico-genética** (“*chemical genetics*”), es un nuevo campo interdisciplinario que conjuga química, biología y bioinformática con el objetivo de **estudiar la respuesta genómica y/o proteómica de un sistema biológico “intacto” frente al tratamiento con un compuesto químico**. Además, la química-genómica es la encargada de estudiar **la capacidad de interacción de los compuestos químicos con sus dianas moleculares** (Bredel and Jacoby, 2004).

Al igual que en genética, podemos distinguir dos tipos de estrategia, directa o inversa, dependiendo de si el proceso de investigación va desde el fenotipo a la diana o viceversa. Cuando se habla de diana, nos referimos normalmente a un gen o el producto de un gen, mientras que cuando se habla de ligando nos referimos a cualquier molécula capaz de interactuar con la diana con cierto grado de especificidad. En la “**químico-genómica inversa**” (“*reverse chemical genomics*”), los genes de interés, normalmente de una misma familia de proteínas, son expresados como proteínas diana y son analizados mediante escrutinios “*target-based*” de alto rendimiento frente a una amplia colección de compuestos. El objetivo, es la **identificación de nuevos ligandos que tengan como blanco la diana o dianas objeto de estudio**. Estos ensayos tienen lugar normalmente *in vitro*, en un sistema libre de células (“*cell-free system*”), en el que o bien las dianas o bien los compuestos, son inmovilizados en un soporte o aislados en placas multipocillo, a los que posteriormente, se añaden los compuestos o las proteínas diana, respectivamente. La interacción diana-ligando puede ser detectada empleando diversas tecnologías de monitorización, como fluorescencia o espectrometría de masas. Una vez identificados los compuestos más prometedores, éstos pueden ser optimizados mediante la síntesis de compuestos análogos, que presenten las propiedades más favorables.

Por el contrario, en la “**químico-genómica directa**” (“*forward chemical genomics*”), el mecanismo de acción de los compuestos es, normalmente, desconocido. Este tipo de escrutinios, también denominados **escrutinios fenotípicos**, se llevan a cabo generalmente *in vivo*, empleando células u organismos modelo (“*cell-based screenings*”). El objetivo es **identificar compuestos biológicamente activos** en base al fenotipo condicional deseado que dichas moléculas producen y tratar de identificar **el mecanismo de acción de los mismos**. La medición de la respuesta biológica frente a los compuestos se realiza empleando diferentes herramientas genómicas que pueden estar basadas en ensayos con “*microarrays*”, colecciones de mutantes, ensayos basados en marcadores, o ensayos basados en la identificación de cambios morfológicos mediante innovadoras técnicas microscópicas y de captura automatizada de imágenes. El fenotipo identificado puede deberse a ganancia de función o pérdida de función como, por ejemplo, la parada en el crecimiento de un tumor. Además, este tipo de escrutinios, también pueden ser empleados en la **identificación de la función**, o al menos de la ruta o complejo biológico en el que participan, **de proteínas de función desconocida**. Esto es así debido a que los compuestos, actúan como inhibidores específicos transitorios de determinadas dianas, de forma análoga a la delección o interferencia con RNAi de esa diana, por

lo que constituyen una alternativa a métodos genéticos tradicionales de inactivación proteica. Entre los numerosos ejemplos existentes está el del uso del benomilo para la identificación de componentes de la red de microtúbulos y del punto de control (“*checkpoint*”) del huso acromático (Castrillo et al., 2007; Li and Murray, 1991; Stearns et al., 1990).

Existen revisiones donde se describe de forma amplia el emergente campo de la químico-genómica (Bredel and Jacoby, 2004; Zheng and Chan, 2002).

2.- La Levadura como Modelo en Escrutinios Químico-Genómicos

Las características favorables que hacen de la levadura un organismo modelo excelente, unido a la gran cantidad de estrategias y herramientas “ómicas” desarrolladas en éste eucariota unicelular que han sido descritas en apartados previos, convierten a la **levadura** en un **organismo idóneo** para realizar todo tipo de **escrutinios químico-genómicos**. Se comentarán a continuación algunas de las estrategias que emplean la levadura como modelo para el descubrimiento de fármacos, de sus dianas moleculares, de su modo de acción, de sus dianas secundarias y de sus posibles efectos secundarios; así como para revelar relaciones funcionales entre los genes diana y las rutas en las que participan.

2.1- Target-Based Screenings. “Químico-Genómica Reversa”

2.1.1- Tres Híbridos

Con objeto de estudiar interacciones droga-proteína, Licitra y Liu (Licitra and Liu, 1996) desarrollaron una adaptación del conocido sistema de dos híbridos de la levadura. El sistema de **tres híbridos** se basa en la utilización de una molécula sintética híbrida, formada por un compuesto cuyo receptor es conocido (p. ej. dexametasona, la cual se une al receptor de glucocorticoides) y el compuesto de interés. Este heterodímero sintético se emplea para reconstituir un factor de transcripción que induce la expresión de un gen chivato (“*reporter*”), de forma análoga al sistema de dos híbridos (Fig. 8). La dimerización de los componentes transcripcionales se produce mediante la interacción simultánea del ligando de receptor conocido (dexametasona) con dicho receptor (receptor de glucocorticoides) fusionado a un dominio de unión a DNA (LexA); y la interacción de la molécula de interés con su diana, fusionada ésta con el dominio de activación de la transcripción. Este sistema se puede emplear así para identificar nuevos ligandos para receptores conocidos o nuevos receptores para ligandos conocidos (Baker et al., 2003; Becker et al., 2004).

Además, en el campo de la químico-genómica se han desarrollado otras variantes del sistema de dos híbridos para identificar nuevos ligandos y dominios de unión a ligando, como son: i) **Biosensores** en levadura, que indican la unión de ligandos a sus dianas mediante variaciones en el crecimiento de una cepa termosensible (Tucker and Fields, 2001); ii) **Aptámeros peptídicos**, secuencias peptídicas cortas especialmente útiles para la validación de dianas de drogas (Baines and Colas, 2006); y iii) **dos híbridos reverso**, sistema empleado para seleccionar moléculas que inhiben interacciones proteína-proteína o proteína-DNA (Huang and Schreiber, 1997; Vidal et al., 1996).

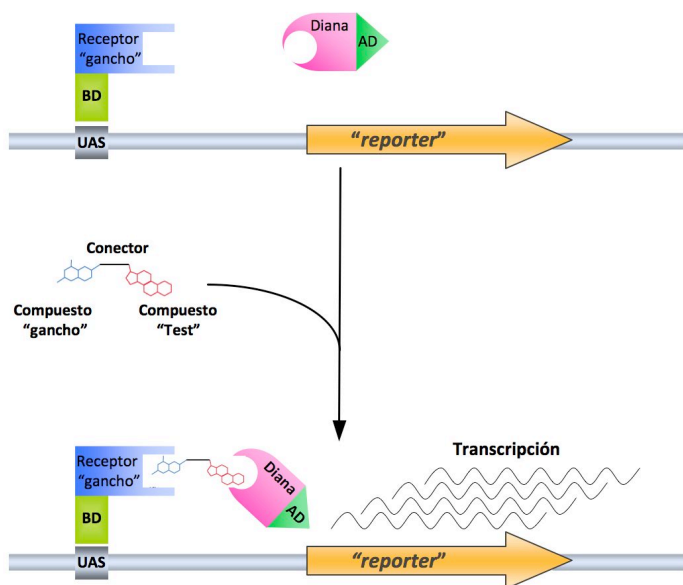


Figura 8. Sistema de tres híbridos para la detección de interacciones compuesto-proteína. La activación transcripcional del gen “reporter” depende de la interacción entre el compuesto de interés y la proteína diana desconocida. Abreviaciones: UAS, Sitio de unión (“Upstream Activating Sequence”); BD, dominio de unión (“Binding Domain”); AD, dominio de activación (“Activation Domain”).

2.1.2- Chip de Proteínas

Inicialmente desarrollados en la levadura, los **chips** o “arrays” de proteínas, constituyen una de las áreas más prometedoras en la identificación de interacciones directa droga-proteína, a gran escala y con un alto rendimiento (MacBeath and Schreiber, 2000; Zhu et al., 2001). No obstante, debido a las dificultades técnicas que implica la purificación de proteínas, su uso práctico para la identificación de dianas de drogas aún precisa significativos avances tecnológicos.

Al contrario que los escrutinios *in vivo*, este tipo de escrutinios *in vitro* presentan ciertas limitaciones como son la identificación de interacciones que no tienen lugar en la célula y el requerimiento de dos o más proteínas ó ciertas condiciones intracelulares para que se produzca la unión del compuesto.

2.1.3- Escrutinios de Supresión de Toxicidad (TSB, de “Toxicity-suppression profiling”)

Este tipo de ensayos de químico-genómica inversa tienen lugar *in vivo*, y su objetivo consiste en **identificar nuevos ligandos que rescaten la inhibición del crecimiento** producida por la **expresión o sobreexpresión de proteínas tóxicas** para la levadura (Arnoldo et al., 2008; Fleming et al., 2008; Krishnan et al., 2007; Perkins et al., 2001; Vottero et al., 2006). La ventaja de esta aproximación es que permite identificar compuestos moduladores o inhibidores de proteínas **heterólogas**, como por ejemplo, de alelos causantes de enfermedades humanas. Sus mayores desventajas son que está limitado a aquellas proteínas que son tóxicas para la levadura y a que el mecanismo/efecto supresor del compuesto no sea específico.

2.2- Cell-Based Screenings. “Químico-Genómica Directa”

2.2.1- Escrutinios “Clásicos”

El empleo del **efecto de la dosis génica** para identificar la diana de un determinado compuesto lleva usándose desde hace más de 20 años (Rine et al., 1983; Bjornsti, 2002). Los

escrutinios genéticos tradicionales, aunque comentados de forma genérica en el apartado referente a *Fenómica*, se pueden resumir, en este caso, aplicados a la químico-genómica, como:

- Escrutinios **para identificar supresores en alto número de copias de la sensibilidad** a la droga. Estos escrutinios se basan en la sobreexpresión de una genoteca genómica y en la posterior selección, en presencia de la droga de interés, de los clones resistentes a la misma. El principio subyacente es que aquellos clones portadores de múltiples copias del gen diana, o de genes implicados en la detoxificación, rutas de reparación o mecanismos compensatorios, presentarán un fenotipo de resistencia.
- Escrutinios para **identificar mutaciones que confieren resistencia o sensibilidad** a un determinado compuesto: se basan en la selección, directa o tras una mutagénesis previa, en un medio con droga de aquellos mutantes resistentes o sensibles. La identificación de la mutación responsable del fenotipo se realiza transformando cada clon seleccionado con una genoteca genómica y seleccionando aquellos que revierten el fenotipo mediante la complementación funcional del gen mutado.

Estos escrutinios “clásicos” presentan como principal desventaja el hecho de que precisan lentas y tediosas validaciones posteriores. Además, dan lugar a falsos positivos y no suelen ser saturantes.

2.2.2- Escrutinios Basados en Aproximaciones Fenómicas

El **escrutinio de los fenotipos de colecciones de células frente a una serie de compuestos** genera una matriz bidimensional de datos en la que una de las dimensiones corresponde a la colección de células de genotipo diferente (pero conocido), mientras que la otra dimensión corresponde a la colección de compuestos ensayados. Las dimensiones de dicha matriz dependen del número de compuestos objeto de estudio y del tipo celular objeto de estudio, ya que puede tratarse desde colecciones de líneas celulares cancerígenas a colecciones de mutantes bien definidos, como en el caso de la levadura. Los valores de la matriz corresponden a una medida cuantitativa ó cualitativa del fenotipo de interés, que, como hemos comentado previamente, puede ser viabilidad, tasa de crecimiento, morfología, o tamaño celular, entre otros.

* Escrutinios Químico-Genómicos Basados en Colecciones de Mutantes:

Como hemos comentado ampliamente en el apartado de *Fenómica*, hay distintas herramientas (**colecciones de mutantes**) disponibles en la levadura para realizar este tipo de **escrutinios químico-genómicos** (Fig. 9a). Aunque la estructura de datos resultante sea similar entre ellas, la interpretación de los mismos varía según el diseño experimental empleado. Por lo tanto, a continuación puntualizaremos las diferencias existentes entre estas colecciones; ciñéndonos únicamente a sus aplicaciones en lo que se refiere al estudio del efecto de la alteración de la dosis génica sobre el fenotipo inducido por un compuesto dado.

- 1) Perfiles de **Haploinsuficiencia (HIP, de “HaploInsufficiency Profiling”)**, en los que la dosis génica es el 50% (Fig. 9a panel superior):

Las **colecciones de mutantes heterocigotos** se han utilizado para identificar mutantes que en heterocigosis presentan sensibilidad a un compuesto. Se basan en

el fenómeno de **haploinsuficiencia**, por el cual una única copia de un gen en un organismo diploide es insuficiente para generar un fenotipo silvestre. La premisa es que un mutante heterocigoto para el gen que codifica la diana de un compuesto será más sensible al compuesto que el resto de mutantes heterocigotos. La ventaja de esta aproximación es que tiene el **potencial de identificar directamente la diana del compuesto** de interés y, en menor medida, aquéllos **genes o proteínas que interaccionan** genética o físicamente **con la diana** del compuesto. Con este tipo de escrutinios se identifican generalmente menor número de mutantes que con el resto de aproximaciones.

- 2) Perfiles de **Homocigosis (HOP)**, de “*Homozygous Profiling*”), en los que la dosis génica es el 0% (Fig. 9a panel medio):

Se basa en el empleo de **colecciones de mutantes homocigotos** en los que **ambas copias de cada gen no esencial han sido delecionados** en su correspondiente par de cromosomas. La interpretación de los resultados es más compleja que en *HIP*. En general, permite **identificar rutas o procesos que amortiguan (“buffer”) la sensibilidad al compuesto**, con lo que resulta una estrategia adecuada para **identificar y caracterizar genes que interaccionan genéticamente con la diana**, o para **inferir el mecanismo de acción** del compuesto basándose en la función de los genes identificados. Además, mediante la **detección de mutantes resistentes** al compuesto de interés, es **posible identificar la diana del mismo**.

La ventaja que presentan este tipo de escrutinios es que al tratarse de delecciones, la pérdida de función es completa y eliminan la posibilidad de que se produzca algún fenómeno de regulación transcripcional compensatoria, como puede ocurrir en el caso de *HIP*.

- 3) Perfiles de **Haploides**, en los que la dosis génica es el 0% (Fig. 9a panel medio):

Se basa en el empleo de **colecciones de mutantes haploides** en los que cada gen ha sido delecionado. Presenta las mismas características que *HOP*, pero tiene el inconveniente de que las cepas haploides tienen mayor probabilidad de estar afectadas por mutaciones secundarias que afecten al fenotipo.

- 4) Perfiles de **Sobreexpresión**, en los que la dosis génica es mayor de 100% (Fig. 9a panel inferior):

Se basan en el **incremento de la dosis génica**, mediante la **sobreexpresión** de cada uno de los genes de la levadura clonados en un plásmido bajo el control de un promotor inducible. El empleo de colecciones de mutantes de sobreexpresión tanto en formato individual en placa (Sopko et al., 2006), como en formato de “*pool*” (Butcher et al., 2006), tienen el potencial de identificar los fenotipos de resistencia o sensibilidad a drogas. El principio subyacente a los fenotipos de resistencia es bastante directo, ya que la sobreexpresión de un gen incrementa el producto del mismo, y si la proteína es una de las dianas de la droga, la célula será resistente a dicha droga. Una de las desventajas de este tipo de estrategias es que la sobreexpresión de un gen puede no dar lugar a resistencia si su producto forma parte de un complejo sometido a ajustes estequiométricos.

5) Perfiles de **Esenciales**:

Recientemente, como se ha comentado en el apartado de *Fenómica*, se han desarrollado diferentes estrategias a gran escala de “**apagado**” de **genes esenciales** (Ben-Aroya et al., 2008; Breslow et al., 2008; Kanemaki et al., 2003; Mnaimneh et al., 2004; Schuldiner et al., 2005; Yan et al., 2008). De ellas, han surgido distintas colecciones de mutantes esenciales, tanto en formato individual como en formato “*pool*”, que han sido empleadas en estudios quimio-genómicos como alternativa y complemento al empleo de mutantes heterocigotos.

6) Integración de escrutinios:

La **combinación en una única plataforma** de varias de las aproximaciones comentadas, tiene ventajas económicas a la hora de investigar el efecto de múltiples compuestos. Hoon *et al.* han desarrollado un nuevo “*microarray*” denominado *TAG4* (Pierce et al., 2006) para estudiar el efecto de 188 compuestos sobre “*poles*” de cepas de colecciones de mutantes de delección **homocigotos**, de **heterocigotos esenciales** y sobre **clones transformados** con una **genoteca genómica** (Hoon et al., 2008a).

* **Métodos de Detección:**

Para cada una de las estrategias químico-genómicas comentadas existen dos diseños experimentales:

- 1) **Ensayos no competitivos** (Fig. 9b panel superior): se basan en la utilización de **colecciones de mutantes ordenados de manera individual en placas multipocillo**. El fenotipo se determina de forma individual, ya sea de forma cualitativa o cuantitativa, en medio líquido o sólido.
- 2) **Ensayos competitivos con “*poles*” de cepas** (Fig. 9b panel inferior): se basan en **colecciones de mutantes identificados** de forma individual mediante etiquetas moleculares (“*tags*”), contruidos de manera análoga a la explicada en el apartado de *Fenómica*. El crecimiento de cada una de las cepas se determina de forma cuantitativa, partiendo de cultivos del “*pool*” en medio líquido, mediante la hibridación a un “*microarray*” de oligonucleótidos complementarios a las etiquetas moleculares. La principal ventaja que presenta esta aproximación es, que al realizarse de manera simultánea, precisa de menor cantidad de compuesto; cuestión que puede ser importante en el caso de compuestos de los que se dispongan cantidades limitadas. Las desventajas que presenta esta aproximación son aquéllas derivadas de los problemas “intrínsecos” de la hibridación. Añadir etiquetas moleculares a cepas de manera individual es un proceso costoso, lento y arduo, de ahí que las colecciones de mutantes etiquetados molecularmente estén limitadas a un único fondo genético. Para solventar este problema, Yan *et al.* han desarrollado un método, basado en la tecnología *SGA*, que permite la transferencia de etiquetas moleculares desde cepas “donadoras” o “*Barcode*s” a otras colecciones de cepas ya existentes, o a cepas con otros fondos genéticos. Como ejemplo, estos autores han aplicado este método para etiquetar una colección de mutantes *DAMP* en genes esenciales (Yan et al., 2008).

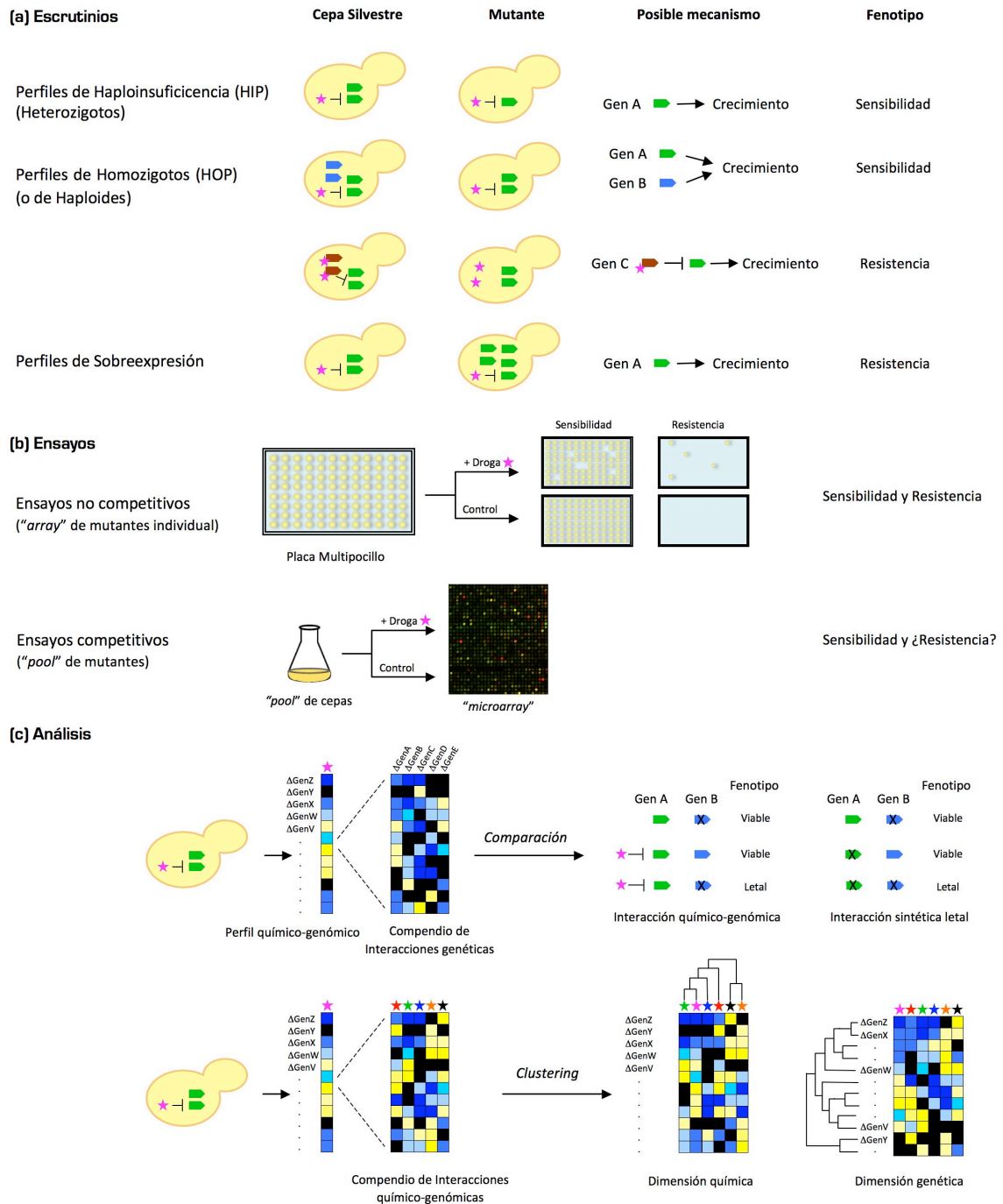


Figura 9. Escrutinios Químico-Genómicos en *Saccharomyces cerevisiae*. **(a)** Tipos de escrutinios en función de la colección de mutantes empleada. **(b)** Cada una de estos escrutinios puede realizarse mediante ensayos con mutantes ordenados individualmente en placas multipocillo (ensayos no competitivos) o empleando un "pool" de mutantes, cuyo crecimiento se determina mediante "microarrays" de DNA (ensayos competitivos). **(c)** La comparación de perfiles de interacción genética con perfiles químico-genómicos (panel superior) permite identificar la ruta y/o las dianas que son inhibidas por el compuesto de interés. En el ejemplo, el compuesto rosa genera un perfil químico-genómico similar al perfil genético del mutante en el *GenA*, identificando el producto del *GenA* como diana potencial del compuesto. Los alelos de delección que presentan interacciones químico-genéticas con un compuesto determinado, suelen presentar interacciones genéticas con el mutante en la diana de dicho compuesto (derecha). La comparación de perfiles químico-genómicos (panel inferior) permite inferir el mecanismo de acción de nuevos compuestos, así como deducir la función de genes sin caracterizar. La agrupación ("clustering") en la dimensión química (izquierda) permite agrupar los compuestos que ejercen un efecto similar, asociando compuestos con estructura parecida. La agrupación en la dimensión genética (derecha), asocia genes (mutados) con funciones similares.

Se ha observado que, a pesar de que existe un elevado grado de coincidencia, existen ciertas diferencias cuando se usan ambos métodos de detección. Una posible explicación a estas discrepancias es la existencia de interacciones entre las cepas que se encuentran creciendo en “pool”, como puede ser la competencia por los nutrientes.

* Interpretación de los Resultados y Estrategias de Análisis.

Comprender e interpretar los resultados de los ensayos químico-genómicos no es una tarea trivial ya que, debido a la variedad de las interacciones moleculares entre los compuestos y los componentes celulares (Fig. 10.), los efectos fenotípicos pueden tener causas variadas y pueden ser indirectos. Además, como ya se ha comentado anteriormente hay que tener en cuenta la estrategia experimental empleada.

La **comparación de los perfiles químico-genómicos** frente a **numerosos compuestos** ha demostrado ser de gran utilidad para determinar el mecanismo de acción de nuevos compuestos, para profundizar en el conocimiento de los efectos de compuestos conocidos, así como para deducir la función de proteínas sin caracterizar (Brown et al., 2006; Ericson et al., 2008; Giaever et al., 2004; Hillenmeyer et al., 2008; Hoon et al., 2008a; Lee et al., 2005; Lum et al., 2004; Parsons et al., 2006). Mediante la comparación de los perfiles de compuestos sin caracterizar con compuestos de mecanismo de acción conocido, surgen agrupaciones (“clusters”) que permiten inferir el mecanismo de acción de estos nuevos compuestos (ver Fig. 9c panel inferior). En la dimensión química, este tipo de agrupamientos asocia normalmente compuestos de estructura química similar (Giaever et al., 2004; Hoon et al., 2008a). Si, por contra, el agrupamiento se realiza en la dimensión genética (o celular), suelen aparecer asociaciones de genes (mutados) con funciones celulares relacionadas, por lo que también es

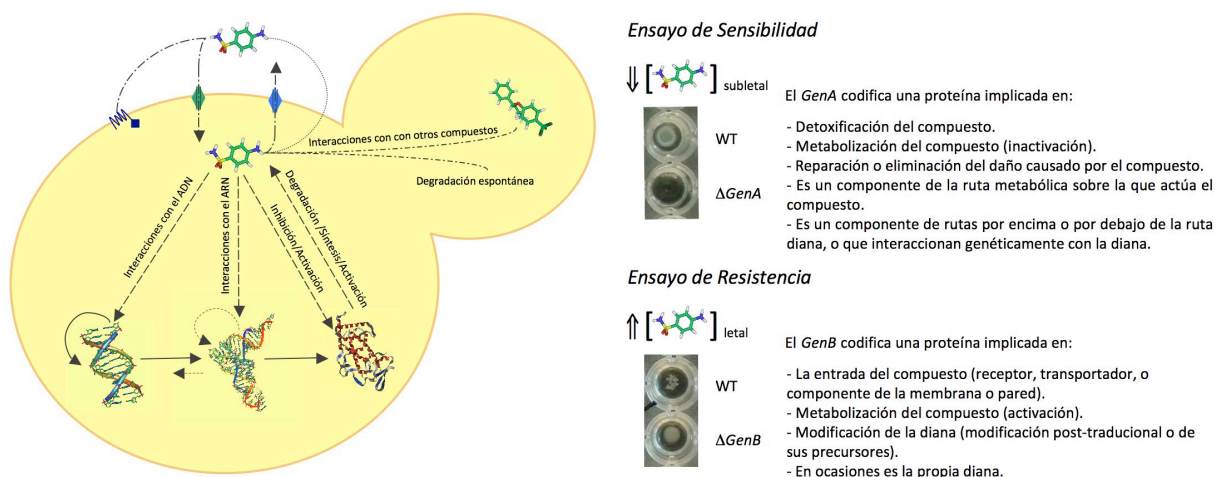


Figura 10. Interpretación de resultados y posibles interacciones entre los compuestos y los componentes celulares. Los compuestos pueden entrar en la célula mediante canales, por difusión a través de la membrana, o interaccionando con receptores de membrana. Una vez en el interior de la célula, los compuestos pueden ser degradados, modificados, exportados hacia el exterior, o pueden interaccionar inhibiendo o activando proteínas y otros componentes celulares (panel izquierdo). La delección o mutación de proteínas implicadas en los procesos mencionados puede afectar el fenotipo en respuesta a determinados compuestos o situaciones de estrés. En el panel derecho, se muestran los fenotipos de sensibilidad y resistencia de un mutante en respuesta a un compuesto dado, y la posible interpretación de los mismos dependiendo de la función de la proteína codificada por el gen mutado. Los compuestos también pueden interaccionar con macromoléculas como el RNA y el DNA, interfiriendo en los procesos de replicación, transcripción o traducción (panel izquierdo), y por tanto en el dogma central de la biología.

posible inferir la función de genes sin caracterizar. De forma particular, es factible identificar genes implicados en los mecanismos de resistencia a drogas (“*multidrug resistance*”) (Parsons et al., 2006), así como dianas secundarias causantes de posibles efectos secundarios (Ericson et al., 2008). Recientemente, se han aplicado técnicas de análisis capaces de realizar agrupamientos de ambas dimensiones, química y genética, simultáneamente. Mediante este tipo de análisis, denominado “*biclustering*”, es posible identificar bloques funcionales de genes relacionados que interaccionan con compuestos a su vez relacionados. La ventaja del “*biclustering*” sobre el “*clustering*” jerárquico unidimensional es que puede revelar que un determinado gen o compuesto puede estar asociado a más de un “*cluster*”; lo cual es lógico desde el punto de vista biológico, ya que los genes pueden tener más de una función y los compuestos químicos afectan a más de una función celular. Para más información se puede consultar la revisión de Wuster y Babu (Wuster and Madan Babu, 2008).

De forma análoga, la comparación de los perfiles de transcripción de cepas mutantes con los perfiles de transcripción de la cepa silvestre en presencia de una droga puede facilitar la identificación de la diana y/o de dianas secundarias del compuesto de interés, así como la caracterización de ORFs de función desconocida. En este caso, el perfil de transcripción frente a un compuesto, se asemeja al perfil de transcripción de los mutantes en la diana/s de dicho compuesto (Hughes et al., 2000a; Marton et al., 1998).

La **comparación de perfiles de interacción genética con los perfiles químico-genómicos**, ayuda a interpretar estos últimos, permite profundizar en el mecanismo de acción de compuestos, y vincular éstos con las dianas celulares o las rutas sobre las que actúan. El razonamiento subyacente es que la delección de un gen que codifica la diana de un compuesto debe tener un efecto celular similar al de la inhibición de la diana por dicho compuesto. Así, el perfil químico-genómico frente a un compuesto debe **asemejarse** al perfil de interacciones genéticas de la diana/s o de genes en la ruta diana, de dicho compuesto (Parsons et al., 2004) (Fig. 9c panel superior).

Por otro lado, diversos estudios han demostrado que no existe correlación entre los **perfiles de transcripción y los perfiles químico-genómicos**; hecho que ha sido atribuido a la redundancia genética y/o a la incapacidad de los “*microarrays*” para determinar efectos no transcripcionales (Begley et al., 2002; Birrell et al., 2002; Giaever et al., 1999; Haugen et al., 2004; Jin et al., 2008). No obstante, aunque haya ausencia de correlación, las dos estrategias son complementarias y su combinación es muy útil para elucidar el efecto de los compuestos a nivel celular (Haugen et al., 2004; Jin et al., 2008).

La validación de algunos de los resultados obtenidos mediante los ensayos químico-genómicos en organismos modelo más cercanos al hombre tiene un enorme **potencial en la aplicación clínica**:

- En el caso de mutantes con fenotipos de sensibilidad o resistencia a un compuesto dado, los genes mutados podrían en algunos casos ser utilizados como **biomarcadores** o **predictores** de tejidos tratables. Su uso dependerá de que la respuesta sea específica frente al fármaco y de que su expresión o estado (silvestre/mutado) varíe entre estados (sano/enfermo). Así, los genes mutados que dan lugar a resistencia suelen ser indicadores de baja respuesta al fármaco; mientras que si los genes mutados dan lugar a sensibilidad en general indican buena respuesta a la droga.

- Las proteínas codificadas por genes cuyos alelos mutantes muestran un fenotipo de sensibilidad al compuesto pueden ser seleccionadas como **posibles dianas** en el desarrollo de **terapias combinadas** con otros fármacos, que tienen como objetivo la sensibilización de la célula y potenciar la eficacia del fármaco inicial.

En definitiva, este tipo de escrutinios además de identificar nuevas dianas terapéuticas también pueden revelar la existencia de efectos secundarios no deseados causados por los compuestos.

* Perspectivas Futuras:

Uno de los nuevos retos de los escrutinios químico-genómicos consiste en **mejorar el conocimiento del efecto** que ejercen, sobre la célula, **terapias combinadas** de varios compuestos. La combinación de moléculas resulta habitual en el uso terapéutico de varias enfermedades, SIDA, diabetes, o cáncer entre otras, ya que la combinación de compuestos con mecanismos independientes disminuye la resistencia adaptativa y tiene efectos sinérgicos (Zimmermann et al., 2007). La utilidad de los escrutinios químico-genómicos en el **análisis del efecto de combinaciones de compuestos** ha sido demostrado por primera vez por el grupo de Giaever y Nislow (Hoon et al., 2008a).

Por otro lado, la utilidad de los escrutinios químico-genómicos en *Saccharomyces cerevisiae* ha inspirado el **desarrollo de aproximaciones similares en otros organismos modelo**. De este modo, han sido ya construidas colecciones de mutantes de delección etiquetados molecularmente tanto en *Schizosaccharomyces pombe* (Bioneer Corporation, Corea) como en *Candida albicans* (Xu et al., 2007). En este último organismo se ha demostrado su utilidad en la identificación del mecanismo de acción de dos antifúngicos (Rodríguez-Suarez et al., 2007; Xu et al., 2007). De forma similar, también se han desarrollado ya estrategias para estudiar las interacciones genéticas en *Escherichia coli* (Butland et al., 2008; Typas et al., 2008) y en *S. pombe* (Roguev et al., 2007). Una alternativa para expandir estas aproximaciones químico-genómicas a otros organismos es generar un “pool” de cepas de *S. cerevisiae* transformadas con una genoteca genómica del organismo de interés (p. ej. de *C. albicans*) y tras tratar el “pool” de cepas con los compuestos de interés, emplear un “microarray” de DNA con sondas complementarias a los ORFs de dicho organismo, identificando genes cuya sobreexpresión en la levadura confieren resistencia al compuesto (Hoon et al., 2008a). Esta aproximación también ha resultado útil para estudiar el efecto de los SNPs en la sensibilidad a compuestos (Jeong et al., 2007).

El descubrimiento de fármacos seguros, eficaces y selectivos precisa de la comprensión de las relaciones entre el genotipo de las células y el efecto fenotípico provocado por los compuestos. Equipos formados por químicos, biólogos y bioinformáticos están comenzando a asumir el reto de confeccionar una “matriz oráculo”, en la que la medición de los fenotipos de colecciones de células con diferentes genotipos y en respuesta a colecciones de compuestos, genere una matriz tridimensional que permita correlacionar cada una de las coordenadas. De esta forma, sería entonces posible identificar las relaciones entre compuestos que generen una respuesta similar, las relaciones entre genotipos que respondan de forma parecida o, incluso, entre fenotipos relacionados (Schreiber, 2005) (Fig. 11).

Para tener una visión más amplia sobre estas aproximaciones se pueden consultar las siguientes revisiones (Bharucha and Kumar, 2007; Hoon et al., 2008b; Luesch, 2006; Menacho-Marquez and Murguía, 2007; Wuster and Madan Babu, 2008). Asimismo, con objeto de servir de consulta y referencia, la [Tabla 3](#) muestra un compendio de los escrutinios químico-genómicos que han empleado como modelo *S. cerevisiae*, y más concretamente las colecciones de deletantes y demás herramientas fenómicas desarrolladas en torno a esta levadura.

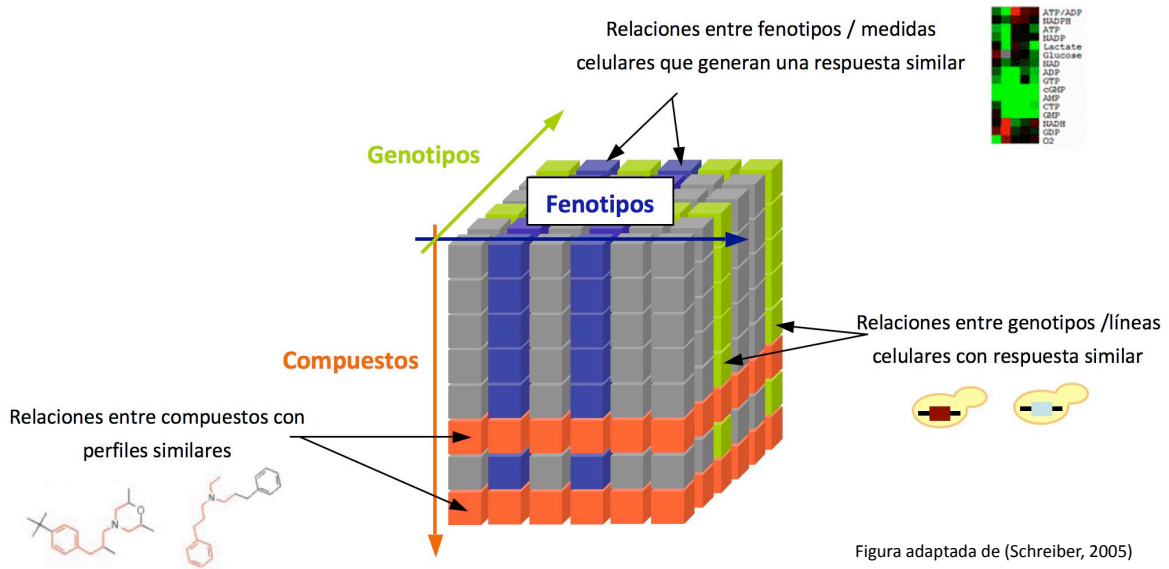


Figura 11. De los resultados de los escrutinios fenotípicos, en los que conocemos de antemano las variaciones genómicas (genotipos), y en los que determinamos diferentes respuestas (fenotipos) resultado del tratamiento con diferentes compuestos, surge una matriz tridimensional que conjuga los resultados cruzados, y que tiene el potencial de revelar el mecanismo molecular subyacente que ejercen los compuestos. Este “oráculo” potencialmente permitiría identificar relaciones: i) entre compuestos que induzcan una respuesta similar; ii) entre genotipos que responden de manera similar frente a los compuestos; e incluso entre iii) fenotipos similares.

Objetivos

Objetivos

Objetivos

1.- Contexto del Trabajo

El trabajo recogido en esta tesis, se enmarca dentro de un **proyecto** más amplio de **Acción Estratégica en Genómica y Proteómica**, del Ministerio de Educación y Ciencia, denominado **"LEVAS3"** (Nº Referencia: GEN2001-4707-C08-01) en el que ha participado un consorcio de laboratorios españoles (Fig. 12) encabezado por los siguientes investigadores: Dr. Aguilera, U. de Sevilla; Dr. Ariño, U.A. Barcelona; Dr. Arroyo, U. Complutense; Dr. Ballesta, C.B.M.; Dr. Herrero, U. de Lleida; Dr. Pérez Ortín, U. de Valencia; Dr. Piña, I.B.M. Barcelona y coordinado por el Dr. Revuelta, U. de Salamanca.

Este proyecto tiene como objetivo el **análisis global de las repuestas a estrés celular en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*** mediante el desarrollo de diversas **aproximaciones genómicas**, que incluyen: el análisis genómico funcional, el análisis del transcriptoma y el análisis del proteoma (Fig. 12).

Esta aproximación multidisciplinar proporcionará un mejor conocimiento de las **bases moleculares y celulares de la señalización del estrés** y de la **respuesta a nivel genómico y proteómico** frente al mismo; de ella se podrán derivar **aplicaciones biomédicas y/o biotecnológicas**, como el diseño de estrategias correctoras de patologías relacionadas con el estrés celular, el diseño o modificación de fármacos y la identificación de nuevas dianas entre otras.

"LEVAS3": Estudio genómico y proteómico global de la respuesta celular al estrés en *S. cerevisiae*

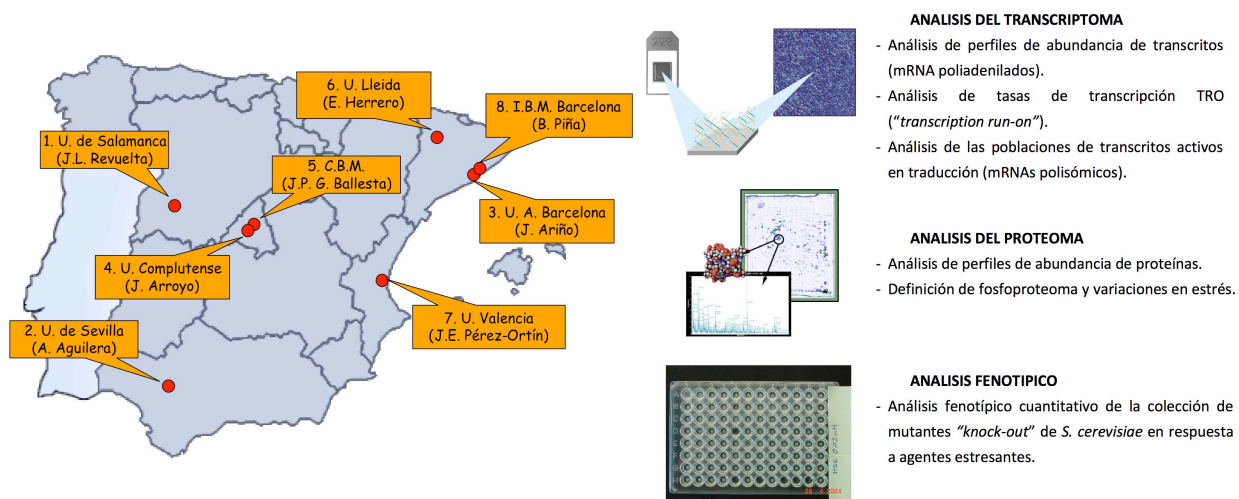


Figura 12. Grupos participantes en el proyecto "LEVAS3" y objetivos del mismo.

2.- Objetivos

El **objetivo general** del trabajo recogido en esta memoria es **identificar los procesos celulares** involucrados en la **respuesta al estrés celular** provocado por **compuestos** que **inducen estrés a distintos niveles** en la célula (ver [Tabla 4](#) con la descripción de los compuestos empleados), **caracterizar funcionalmente** los **genes involucrados** en **mecanismos de sensibilidad/resistencia** frente a estos compuestos, y tratar de **determinar el mecanismo de acción** de los mismos. La aproximación empleada, que a continuación desarrollaremos en mayor detalle, ha consistido en realizar un **análisis fenotípico cuantitativo de la respuesta a estrés celular ejercido por dichos compuestos en la colección completa de mutantes de delección de la levadura *Saccharomyces cerevisiae***, generando así **perfiles químico-genómicos de sensibilidad y resistencia** de cada uno de los agentes empleados.

Los **objetivos específicos** que nos planteamos son:

- 1) **Determinar los mecanismos de sensibilidad/resistencia** a los distintos compuestos.
- 2) **Identificar redes funcionales** y rutas redundantes afectadas por los agentes estresantes.
- 3) **Identificar dianas secundarias** y determinar posibles efectos secundarios.
- 4) **Elucidar la función de ORFs sin caracterizar.**
- 5) **Comparar el efecto**, a nivel biológico, de cada uno de los compuestos.
- 6) **Comparar los cambios** inducidos por los compuestos en los perfiles de **expresión génica** con los **efectos fenotípicos** producidos por los mismos.

Tabla 4. Descripción de los 18 compuestos empleados en los escrutinios químico-genómicos

Tipo de Estrés	Compuesto	Aplicación Clínica	Diana / Mecanismo de acción
Genotóxico	Ácido micofenólico	Inmunosupresor empleado para evitar rechazo a transplantes	Inhibidor no competitivo y reversible de la inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH)
	4-nitroquinolina 1-óxido	Carcinógeno modelo	DNA, monoadductos estables con las purinas a través de la formación de enlaces covalentes con C8 o N2 deoxiguanina, y con N6 deoxiadenina
Sobre la pared celular	Pneumocandina / Caspofungina	Antifúngico de nueva generación	Inhibidor no competitivo de la 1,3-beta-D-glucán-sintasa
	Rojo Congo	Histológicamente para determinar Amiloidosis	Interfiere con el correcto ensamblaje de la pared celular
Metabólico (Antifolatos)	Sulfanilamida	Antibiótico	Inhibidor competitivo del ácido para-aminobenzoico (PABA)
	Metotrexato	Antitumoral y en el tratamiento de algunas enfermedades autoinmunes	Inhibidor de la Dihidrofolato reductasa (DHFR)
	ALIMTA	Antitumoral (Mesotelioma pleural maligno y cáncer de pulmón no microcítico)	Inhibidor de la Dihidrofolato reductasa (DHFR), Timidilato sintasa (TS) y Glicinamida ribonucleotido formiltransferasa (GARFT)
Sobre la traducción	Sordarina	Antifúngico	Inhibidor de la síntesis proteica (diana eEF2-ribosoma)
	Higromicina	antibiótico	Inhibidor de la síntesis proteica
Oxidativo	Diamida		Induce la oxidación de tioles y la formación de puentes disulfuro en proteínas de la superficie celular
	Dietil maleato (DEM)		Induce el agotamiento del glutatión
Metabolismo de Lípidos	Edelfosina	Antitumoral	Metabolismo de fosfolípidos, actuando a nivel de membranas
	Miltefosina	Antitumoral, antifúngico y antiprotozo	
	Perifosina	Antitumoral	
	Erucilfosfocolina	Antitumoral	
Desconocido	ES-285 y Kahalalido F	Antitumoral en desarrollo	¿?

Estrategia Experimental y
Métodos



Estrategia Experimental y Métodos

La **estrategia experimental** empleada para realizar los escrutinios fenotípicos objeto de este trabajo se ilustra en la **Figura 13**, y consta de las siguientes **etapas**:

- (i) Selección de las **condiciones de trabajo** y **determinación de la concentración óptima** de cada compuesto capaz de inducir el fenotipo deseado.
- (ii) **Escrutinio fenotípico cuantitativo y sistemático de la colección completa de mutantes de delección de *Saccharomyces cerevisiae***, con objeto de identificar las respuestas celulares inducidas por los agentes citotóxicos anteriormente mencionados (**Tabla 4**).
- (iii) **Análisis Bioinformático** y filtración de los datos obtenidos.
- (iv) **Selección** y (v) **validación de las potenciales dianas moleculares y rutas biológicas** afectadas por los compuestos mediante la realización de nuevos escrutinios, empleando un rango más amplio de concentraciones de cada uno de los compuestos.
- (vi) **Experimentos adicionales** para profundizar en el estudio del mecanismo de acción de cada compuesto, y/o en la caracterización funcional de genes de función desconocida.

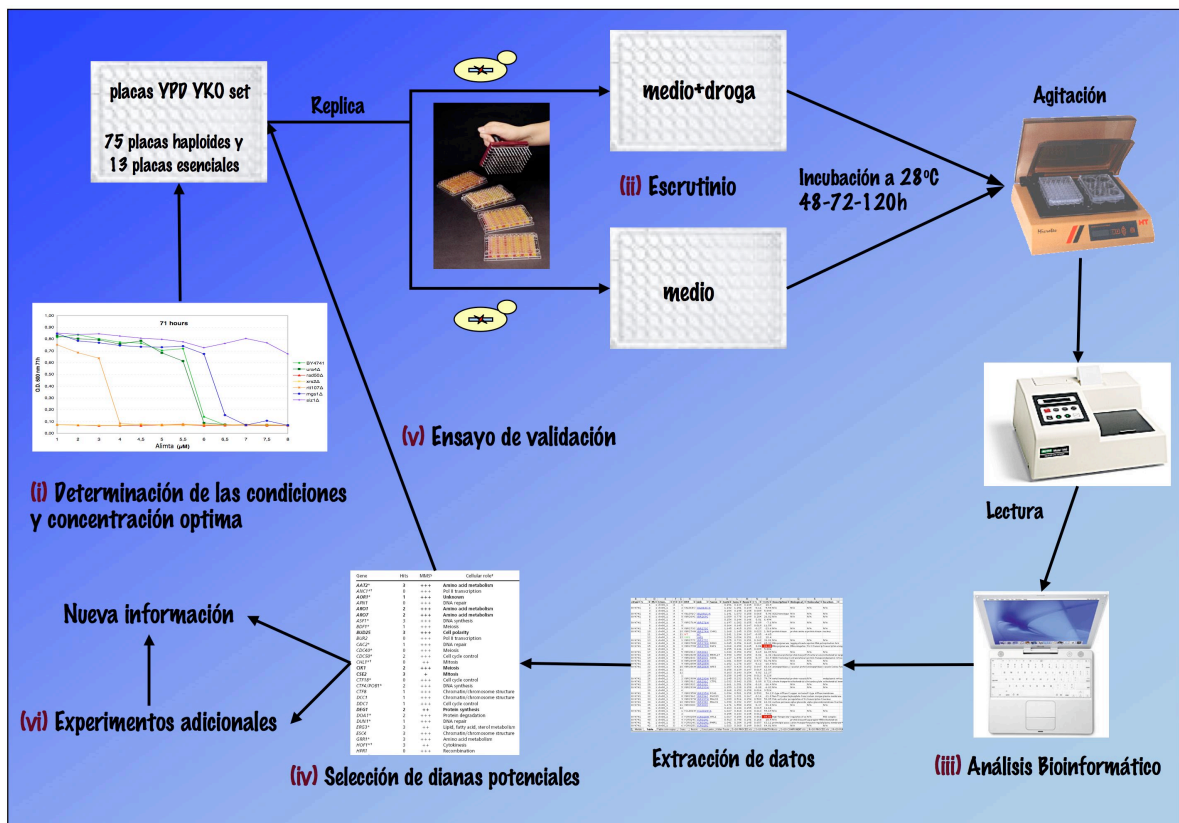


Figura 13. Esquema de la estrategia experimental desarrollada para llevar a cabo el escrutinio fenotípico global.

1.- Experimentos Piloto para Seleccionar las Condiciones y Concentraciones Óptimas que Inducen el Fenotipo de Interés

1.1- Condiciones Experimentales

Un paso previo al análisis fenotípico global de cada compuesto es la **selección de las condiciones experimentales** a emplear en el escrutinio a gran escala, y que incluyen entre otras: la selección del medio de cultivo, de la temperatura de incubación, de la concentración de compuesto, del volumen de medio por pocillo, etc.

En este trabajo se decidió emplear, en la mayoría de los casos, un **medio sintético completo** (SC, con glucosa como fuente de carbono; ForMedium™, Norwich, UK) (ver excepciones en la [Tabla 5](#)). Esto es así ya que se pretendía tener más controladas las condiciones del ensayo y debido a que el fenotipo es, en general, más evidente que en los ensayos realizados en medio rico (YPD; extracto de levadura 1%, bacto peptona 2%, glucosa 2%), aunque depende en gran medida del compuesto objeto de estudio. Los ensayos se realizaron, en la mayoría de los casos, en **medio líquido** (ver excepciones en la [Tabla 5](#)) con objeto de poder **determinar la inhibición del crecimiento de forma cuantitativa**. El cultivo en medio líquido permite, además, el **empleo de menores concentraciones de droga** que las necesarias en un medio sólido para alcanzar el mismo efecto inhibitorio y, por tanto, economizar compuesto que, en ocasiones, está disponible en cantidades limitantes. El pH del medio fue ajustado en todas las ocasiones a **5,8**, un pH ligeramente ácido, considerado óptimo para el crecimiento de *S. cerevisiae*. El **volumen de medio** empleado por micropocillo osciló dependiendo de las cantidades de compuesto disponibles entre **75 y 150 µl**.

Las placas multipocillo conteniendo los mutantes de interés se **incubaron a 28°C, sin agitación**, en el interior de cajas herméticas con una fuente de humedad para evitar así la evaporación del medio de cultivo. Siempre se trabajó en campana de flujo laminar y en **condiciones de esterilidad** para evitar contaminaciones que, por otro lado, son frecuentes en este tipo de estudios masivos.

1.2- Selección de las Concentraciones de Compuesto Óptimas

Como prerrequisito para realizar este tipo de estudios, es necesario que el **compuesto de interés provoque un fenotipo fácilmente identificable** y, si es posible, cuantificable. En nuestro caso, el fenotipo que analizamos es la **inhibición del crecimiento o la resistencia** de cepas mutantes de *S. cerevisiae* frente a los compuestos de interés (ver [Tabla 4](#)).

Con objeto de establecer la **concentración** de trabajo **adecuada** para cada **compuesto**, se desarrollaron **experimentos piloto** consistentes en la determinación de los **perfiles de sensibilidad de las cepas parentales** BY4741 (*MATa*), en ocasiones de BY4743 (*MATa/α*), y a veces de BY4742 (*MATα*) frente a un **amplio rango de concentraciones crecientes de cada droga**. Todas estas cepas son isogénicas y derivan de la cepa S288C (Brachmann et al., 1998). Además, en algunos casos se emplearon como control, **cepas mutantes de referencia** cuyos mecanismos de respuesta frente a cada uno de los compuestos estuvieran alterados y que habían sido previamente descritos en la literatura.

Este tipo de experimentos piloto se realizaron en formato de **placas multipocillo** para mantener exactamente las **mismas condiciones** (de precultivo, inoculación, cultivo, medio, temperatura, etc) que serían posteriormente empleadas en el **escrutinio global**.

El **análisis de las curvas de crecimiento** nos permitió **determinar** las **concentraciones efectivas de trabajo para la identificación de mutantes sensibles y/o resistentes** a las drogas a estudiar. En la identificación de **mutantes sensibles**, se eligieron **concentraciones semi-inhedorias**, capaces de inhibir muy levemente el crecimiento de las cepas silvestres, mientras que las cepas mutantes de referencia presentaban una acusada inhibición a dicha concentración. Por el contrario, para la identificación de **mutantes resistentes** se escogieron **concentraciones fuertemente inhedorias** o letales para las cepas parentales, y no inhedorias o muy ligeramente inhedorias para las cepas de referencia (ver [Tabla 5](#)).

2.- Escrutinio Sistemático de la Colección de Cepas Deletantes de *Saccharomyces cerevisiae* Frente a Agentes Estresantes

La **colección de mutantes nulos** de la levadura generada en el proyecto de **Delección del Genoma de *Saccharomyces* (SGDP)**, y descrita ampliamente en el apartado 3.1.2 de la *Introducción*, es una herramienta inestimable para la realización de escrutinios genómicos globales de una forma simple, rápida, eficiente, exhaustiva y económica.

En este trabajo, hemos llevado a cabo **escrutinios fenotípicos de crecimiento** de la **colección completa de 4800 cepas deletantes haploides MATa** (ver excepciones en [Tabla 5](#)) de manera exhaustiva y **cuantitativa frente a 18 compuestos que inducen estrés a distintos niveles** en la célula ([Tabla 4](#)). En algunos casos estos ensayos se complementaron con escrutinios de la **colección de 1200 cepas diploides heterocigotas para genes esenciales** ([Tabla 5](#)). La colección de que disponemos está ordenada en 75 placas multipocillo (de 96 pocillos), en el caso de los mutantes haploides (Euroscarf, Frankfurt, Germany; <http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/index.html>), y en 13 placas para los mutantes heterocigotos en esenciales. Esta última colección ha sido confeccionada por nosotros a partir de la colección general de diploides heterocigotos, y los clones se encuentran distribuidos individualmente en placas de 96 pocillos. Las colecciones de mutantes se encuentran conservadas a -80°C en medio YPD con 15% de glicerol.

En **resumen**, el **proceso** que seguimos para realizar el **escrutinio** o “*screening*” es el siguiente:

Una vez descongeladas las placas, se procedió a **replicarlas manualmente**, mediante la utilización de un replicador de 96 de puntas de acero (Nalgene Nunc International), a **placas YPD líquido con G418** (150 µg/ml; Gibco-BRL). Adicionalmente, en estas placas se inocularon, al menos por duplicado, la **cepa parental** correspondiente, así como **cepas mutantes de referencia** sensibles y/o resistentes al compuesto a analizar. Tras aproximadamente 72 horas de incubación a 28°C, y una vez que las cepas **alcanzaron la saturación**, éstas se **replicaron** por duplicado a **medio sintético completo líquido (SC)** (con las excepciones que se especifican en [Tabla 5](#)) en **presencia y ausencia de las concentraciones previamente determinadas para cada compuesto**, y que se muestran en [Tabla 5](#).

A continuación, utilizando un espectrofotómetro lector de placas multipocillo (modelo 550; Bio-Rad Laboratories), se obtuvieron **datos cuantitativos del crecimiento de cada cepa** mediante la medición de su **densidad óptica (D.O.) a 595 nm cada 12-24 horas y durante un periodo** de incubación a 28°C **de 3 a 7 días**. Como paso previo a la

replicación y a la lectura de las densidades ópticas, las placas multipocillo se agitaron durante 1 minuto a 1000 rpm en un agitador específico para este tipo de placas (Microtec; Infors AG) para alcanzar la total resuspensión del cultivo. Entre réplica y réplica, el replicador se limpió a través de dos pases por agua estéril y esterilizó a la llama tras un pase por etanol 100%. En general, el medio de cultivo se dispensó de forma automática en las placas multipocillo empleando un dispensador de medio automatizado (*microplate dispenser QFILL2*; Genetix Limited), en otras ocasiones el medio se dispensó empleando una pipeta multicanal de 8 o 12 canales (*mline pipettor*; Biohit).

Cada cepa fue anotada como sensible o resistente, en comparación con la cepa silvestre y con relación al control sin droga, empleando los datos de D.O. y un sencillo algoritmo (Fig. 14). Este **algoritmo**, al que hemos llamado **GI** (de “*Growth Index*”), permite una **doble normalización** de las variaciones en la tasa de crecimiento de cada cepa mutante. Primero, en función del crecimiento relativo de cada cepa mutante en ausencia de exposición al compuesto (crecimiento intrínseco), lo que permite identificar los efectos de la deleción. Segundo, en función del crecimiento (ya normalizado) de las réplicas de la cepa silvestre introducidas como control, lo que representan el efecto de la exposición al compuesto de interés. Estos parámetros se escogieron para minimizar el número de falsos positivos y optimizar la detección de verdaderos positivos. Además, todos los fenotipos fueron confirmados mediante una inspección visual del crecimiento de cada cepa.

$$\text{GI} = \frac{\frac{\text{OD}_{m^T}}{\text{OD}_{m^{\text{UNT}}}} - \text{mean} \left(\frac{\text{OD}_{\text{WT}^T}}{\text{OD}_{\text{WT}^{\text{UNT}}}} \right)_n}{\text{SD} \left(\frac{\text{OD}_{\text{WT}^T}}{\text{OD}_{\text{WT}^{\text{UNT}}}} \right)_n}$$

$> 0,5 \Rightarrow \text{Resist.}$
 $< -0,5 \Rightarrow \text{Sens.}$

Figura 14. Algoritmo empleado para determinar la sensibilidad o resistencia a un compuesto dado. El GI (“*Growth Index*”) o Índice de Crecimiento es un algoritmo que, mediante la doble normalización comentada en el texto, permite determinar si la cepa mutante mantiene un crecimiento proporcional al crecimiento de la cepa silvestre tras el tratamiento con un compuesto dado. El denominador de la función es una medida de la dispersión de las variables que, dependiendo del estudio, puede tomar de referencia la cepa silvestre (como se muestra en la figura) o todas las cepas objeto del ensayo.

Los valores del GI que se alejan de cero, muestran un crecimiento diferencial de la cepa mutante con respecto a la cepa silvestre. Así, de forma general hemos establecido que un $\text{GI} > 0,5$ indica que la cepa mutante es resistente al compuesto estudiado, mientras que si el $\text{GI} < -0,5$ consideramos que la cepa mutante es sensible.

La reproducibilidad del GI, obtenida entre experimentos independientes realizados en las mismas condiciones, es muy robusta, aumentando en función del tiempo de incubación con el compuesto de interés en el caso de los ensayos para determinar sensibilidad, y disminuyendo en el caso de los ensayos de resistencia (no mostrado).

OD: Densidad Óptica a 595 nm; m: cepa mutante; WT: cepa silvestre; T: tratado o expuesto al compuesto de interés; UNT: sin tratar con el compuesto de interés; n: número de réplicas; mean: media; SD: desviación estándar. Sens.: sensible; Resist.: resistente.

Tabla 5. Condiciones empleadas en los escrutinios realizados con cada uno de los compuestos

Tipo de Estrés	Compuesto	[Sens. Esc.]	[Resist. Esc.]	[Sens. Val.]	[Resist. Val.]	Medio	Colección	Escrutinio
Genotóxico	Ácido micofenólico	25 µg/ml	-	25 µg/ml	-	SC	BY4741	Completo
	4-nitroquinolina 1-óxido	150 ng/ml	-	150 ng/ml	-	SC	BY4741	Completo
Sobre la pared celular	MPA+4NQO	150 ng/ml	300/600 ng/ml	25 µg/ml +5 ng/ml	-	SC	Y BY4743	Parcial
	Pneumocandina	150 ng/ml	600 ng/ml	50/100/150/200 ng/ml	150/300/450/600 ng/ml	SC y YPD	BY4741	Completo
		100 ng/ml	225 ng/ml				Y BY4743	
	Casposfungina	-	-	50/100/150/200 ng/ml	300/450/600 ng/ml	SC y YPD	BY4741 y BY4743	Sólo Validación
Metabólico (Antifolatos)	Rojo Congo	250 µg/ml	250 µg/ml	250 µg/ml	250 µg/ml	YPD Sólido	BY4741 y BY4743	Completo
	Sulfanilamida	200 µg/ml	-	50/100/200 µg/ml	-	MIMY	BY4742 y BY4743	Completo
	Metotrexato	100 ng/ml	-	50/100/200 ng/ml	-	MIMY	BY4742 y BY4743	Completo
	ALIMTA	80 µM	1 mM	20/40/80/160 µM	0,6/1/1,4 mM	SC	BY4741	Completo
		400 µM					Y BY4743	
Sobre la traducción	Sordarina	2 ng/ml	62,5 ng/ml	2 ng/ml	62,5/125/500 ng/ml	SC	BY4741	Completo
	Higromicina	-	-	30/50/70/90/120 µg/ml	-	YPD	BY4741	Sólo Cepas Interés
Oxidativo	Diamida	1,6 mM	2,7 mM	1,3/1,6 mM	2,7/3 mM	SC	BY4741	Completo
	Dietil maleato (DEM)	4 mM	-	-	-	SC	BY4741	Sensibles
Metabolismo de Lípidos	Edelfosina	-	60 µg/ml	-	30/60/100 µg/ml	SC y YPD*	BY4741	Resistentes
			40 µg/ml				Y BY4743	
	Miltefosina	-	3,5 µg/ml	-	3/3,5/4,5/5 µg/ml	SC y YPD*	BY4741	Resistentes
	Perifosina	-	-	1/2,5 µM	5/10/20 µM	SC y YPD*	BY4741	Sólo Validación
				60/100 µM	400/600/1000 µM	SC y YPD*	BY4741	Sólo Validación
Desconocido	ES-285	50/100/300 µM				SC y YPD*	BY4741	Sólo Cepas Interés
	Kahalido F	50/100/300 µM	600 µM			SC y YPD*	BY4741	Sólo Cepas Interés

[Esc.]: Concentración empleada en el escrutinio global. [Val.]: Concentración empleada en los ensayos de validación. Sens.: ensayos para identificar mutantes sensibles. Resist.: ensayos para identificar mutantes resistentes. *: Ensayos realizados en medio sólido. BY4741 (MATa), BY4742 (MATa), y BY4743 (MATa/α diploides heterocigotas para genes esenciales) hacen referencia al fondo genético de las colecciones de mutantes empleadas en cada caso.

3.- Selección y Validación de las Potenciales Dianas y Rutas Biológicas

Todos los datos generados en los escrutinios masivos fueron **compilados**, creando una **base de datos fenotípicos cuantitativos**, que nos facilitó **la selección de las potenciales cepas sensibles y/o resistentes** para su comprobación y posterior análisis.

Para confirmar los resultados del escrutinio inicial, **se seleccionaron las cepas** que, con el criterio anteriormente definido, fueron consideradas como **sensibles y/o resistentes** y fueron recomprobadas individualmente **en las mismas condiciones empleadas en el análisis global**. Además, **con la mayoría de compuestos se utilizó un rango de concentraciones** (ver [Tabla 5](#)) que nos permitió establecer **perfiles de sensibilidad/resistencia más completos** y fiables, identificando así cepas con alta, media y baja sensibilidad o resistencia. El uso de este tipo de análisis puede ser una de las razones por la que nuestros ensayos han resultado ser más sensibles que otros escrutinios análogos descritos en la literatura.

4.- Análisis Bioinformático de los Datos Obtenidos

La **base de datos fenotípicos cuantitativos** fue completada mediante la integración de los nuevos resultados derivados de los ensayos de validación. En esta base de datos, las **densidades ópticas** y las **tasas de crecimiento, de cada cepa en cada una de las condiciones ensayadas**, se encuentran ordenadas por columnas de izquierda a derecha con **concentraciones** crecientes de **cada compuesto** y con medidas crecientes **a lo largo del tiempo**. Contiene además una **descripción** pormenorizada **de cada cepa**, con su localización en la colección, número de referencia, nombre y alias, *link* al *SGD*, fenotipo y descripción basada en el *Gene Ontology* (ver más adelante) de los procesos en los que participa la proteína de la que carece cada mutante.

En los últimos años, los estudios y tecnologías genómicas y proteómicas de alto rendimiento están revolucionando el campo de la biología, pero ante estas nuevas aproximaciones surgen nuevos retos. El primero, es el diseño experimental en sí mismo; el segundo es el análisis estadístico de los resultados y, el tercero, es la interpretación biológica de los mismos. Este último es a menudo el reto más arduo y el que requiere mayor dedicación debido a la gran cantidad de datos que se generan y a la complejidad de las interacciones biológicas.

Existen numerosos **recursos y herramientas bioinformáticas** (ver [Cuadros 3 y 4](#) en la *Introducción*) que resultan de gran ayuda para el **procesamiento y la interpretación biológica (funcional) de datos a gran escala**; ya procedan de estudios de expresión génica, proteómicos, fenotípicos, o cualquier tipo de ensayos que genere datos a gran escala en forma de grupos de genes o proteínas relacionados. Entre estas herramientas bioinformáticas, por su aplicación a este trabajo, cabe destacar las siguientes:

4.1- Bases de Datos

Entre las bases de datos utilizadas para el análisis de nuestros datos destacan, aquellas **generales** como *Entrez* (Schuler et al., 1996); de análisis **proteínas**, *PDB* (Berman et al., 2000), *UniProt* (Apweiler et al., 2004), *InterPro* (Apweiler et al., 2000), *PROSITE* (Bairoch, 1991), *Pfam* (Sonnhammer et al., 1997), *SMART* (Ponting et al., 1999); y de **secuencias**, *BLAST* (Altschul et

al., 1997); aquellas **generales de la levadura**, *SGD* (Cherry et al., 1998) y *CYGD* de *MIPS* (Mewes et al., 1997); específicas de **interacciones moleculares** como *BIND* (Bader et al., 2001), *DIP* (Xenarios et al., 2000), *GRID* (Breitkreutz et al., 2003b) y *MINT* (Zanzoni et al., 2002); específicas de estudios de **expresión génica** a gran escala como *yMGV* (Marc et al., 2001), *Expression Connection* del *SGD*, *Stanford MicroArray Database* (Sherlock et al., 2001) y *Omnibus* (Edgar et al., 2002); específicas de **rutas** como *KEGG* (Kanehisa and Goto, 2000), *Yeast Biochemical Pathways* (del *SGD*) y *MetaCyc* (Krieger et al., 2004)); específicas de **factores de transcripción**, *TRANSFAC* (Wingender et al., 1996); específicas de **localización de proteínas**, *Yeast GFP Fusion Localization Database* (Huh et al., 2003) y específicas de **morfología**, *SCMD* (Saito et al., 2004). La búsqueda de **referencias bibliográficas** se realizó a través de la base de datos *PubMed* y en determinadas ocasiones empleando herramientas de **extracción de información** como *Textpresso* del *SGD* (Muller et al., 2004) o *Chilibot* (Chen and Sharp, 2004).

La integración de la información contenida en algunas de las bases de datos nombradas junto con la bibliografía pertinente nos ha ayudado a interpretar determinados aspectos de nuestros análisis.

4.2- *Gene Ontology* (GO) [Ashburner et al., 2000]

Es un **vocabulario jerarquizado, unificado, estándar y controlado**, pero a su vez **dinámico y flexible**, para **describir las características biológicas de un producto génico en cualquier organismo**. Fue desarrollado en el año 2000 por el consorcio *GO* (*GO Consortium*: <http://www.geneontology.org>), para suplir la falta de un lenguaje común que describiera las características de cualquier producto génico en las diferentes bases de datos, que pudiera ser aplicado a todos los organismos, y que proporcionase una terminología biológica unificada para anotar dichas características en las bases de datos específicas de cada organismo (*FlyBase Consortium* 2002), *Saccharomyces Genome Database* (*SGD*; Cherry et al., 1998), *Mouse Genome Database* (*MGD*; (Blake et al., 2002)), y *WormBase* (Stein et al., 2001)). Su **estructura en árbol** está dividida en **tres categorías independientes**:

- *Molecular function*: es la **actividad o función** que cumple el producto de un gen (p. ej. factor de transcripción, DNA helicasa, etc).
- *Biological process*: son los **procesos biológicos** en un sentido amplio, como “mitosis” o “metabolismo de purinas”, etc, que son llevados a cabo por conjuntos ordenados de funciones moleculares.
- *Cellular component*: son las **estructuras subcelulares, localizaciones, complejos macromoleculares** (p. ej. núcleo, telómero, complejo de reconocimiento del origen, etc).

La idea es que cualquier gen pueda ser clasificado en estas categorías; o dicho de otra forma, que el producto de cualquier gen individual tiene una función molecular, es parte de algún proceso biológico y ocurre en algún componente celular. El uso de este vocabulario permite, explorando las bases de datos genómicas, comparar genes de distintas especies y vincular genes relacionados entre sí utilizando palabras que describan sistemáticamente sus funciones, independientemente de cómo se denominen los genes.

El reciente desarrollo de proyectos genómicos a gran escala y la información masiva que generan, ha impulsado el desarrollo de **programas bioinformáticos**, normalmente de libre

acceso, que **automatizan la caracterización funcional de listas de genes**, independientemente de su tamaño, facilitando el análisis y la organización de los resultados para una rápida interpretación de los mismos. En esencia, estos programas **agrupan listas de genes de interés conforme a los términos GO que comparten**. Además, realizan **cálculos estadísticos de enriquecimiento** para determinar si la categoría común al grupo de genes objeto de estudio está sobre-representada en comparación con su distribución en el genoma, y elaboran representaciones gráficas de las **relaciones funcionales entre los genes**. En definitiva, ayudan a comprender qué **características son comunes** entre los genes objeto de estudio, e **identificar las categorías funcionales** más afectadas por cada uno de los compuestos empleados y su evaluación estadística.

Los programas que hemos empleado en nuestros análisis se basan fundamentalmente en *GO*; aunque algunos, como *FUNSPEC* (Robinson et al., 2002), consultan de forma paralela varias bases de datos (*MIPS*, *GO*, *SMART* y *Pfam*) y son capaces de identificar otros atributos compartidos de forma significativa por el grupo de genes de interés.

Algunas aplicaciones recientes derivadas de *Gene Ontology* se basan en **predecir la función de génica a partir de las anotaciones de GO de distintos organismos** (King et al., 2003), o **en combinación con datos de interacciones proteicas** (Deng et al., 2004), e incluso en **predecir la localización subcelular** (Lu and Hunter, 2005).

4.3- Redes de Interacciones Moleculares

Otros recursos bioinformáticos empleados, como los programas *Osprey* (Breitkreutz et al., 2003a) o *Cytoscape* (Shannon et al., 2003), **integran los datos fenotípicos obtenidos con los datos de interacciones globales de estudios a gran escala realizados previamente**. Estas herramientas permiten **visualizar complejas redes de interacción** entre los genes, y asignan posibles funciones a ORFs sin caracterizar basándose en las interacciones físicas, genéticas y funcionales descritas en la levadura. Sirven, además, para extraer información biológica significativa de los datos genómicos y hacer predicciones biológicas basándose en la premisa “culpable por asociación” (“*guilt-by-association*”).

4.4- Agrupaciones Jerárquicas (“*Hierarchical Clustering*”)

El empleo de **agrupaciones jerárquicas** (“*hierarchical clustering*”) se debe a la complejidad de los resultados obtenidos en los escrutinios exhaustivos, en los que se determinaron los patrones de sensibilidad y resistencia conforme a un amplio rango de concentraciones y en función del tiempo. Así, en el caso de los escrutinios realizados con los compuestos antifúngicos pneumocandina y caspofungina se utilizó el programa *Spotfire* (www.spotfire.com) para obtener “*clusters*” jerárquicos aplicando el método de Ward (Ward, 1963). En general, los mutantes de interés se agruparon en el eje vertical en función de la semejanza de sus perfiles de sensibilidad o resistencia frente a concentraciones crecientes de droga y tiempo (eje horizontal). El análisis de estos “*clusters fenotípicos*” puede revelar módulos biológicos (funciones biológicas) particularmente sobre-representados. Este tipo de aproximación fue empleada en principio en estudios genómicos transcripcionales para identificar genes con un patrón de expresión similar (Eisen et al., 1998), y más recientemente se ha aplicado en estudios fenotípicos a gran escala para identificar mutantes con un fenotipo común, ya sea de resistencia o sensibilidad frente a una condición estresante (Begley et al., 2002; Giaever et al., 2002), de actividad enzimática, o de transporte (Lesuisse et al., 2005).

5.- Materiales

5.1- Compuestos Utilizados

La **descripción** de los compuestos que se han empleado en este trabajo se encuentran resumidas en la [Tabla 4](#), y las **especificaciones** de los mismos se muestran resumidas en la [Tabla 6](#). Además, las **estructuras químicas** de los compuestos se pueden consultar en la [Figura 15](#).

5.2- Microorganismos Utilizados

Las colecciones de mutantes de la levadura *S. cerevisiae* empleadas en este trabajo, han sido descritas ampliamente tanto en la *Introducción* como en el segundo apartado de esta sección.

Tabla 6. Especificaciones de los compuestos empleados en el escrutinio global de la colección de deletantes de *S. cerevisiae*

Compuesto	Procedencia	CAS	M.W.	Conservación	Solubilidad
Ácido micofenólico	Sigma (M5255)	24280-93-1	320,34	4°C	Etanol
4-nitroquinolina 1-óxido	Sigma (N8141)	56-57-5	190,16	-20°C	Acetona
Pneumocandina ¹ / Caspofungina	¹ Merck (H3822)	179463-17-3	1213,42	4°C	H ₂ O
Rojo Congo	Dr. Arroyo	573-58-0	696,66	Tª ambiente	Agua
Sulfanilamida	Sigma (S9251)	63-74-1	172,2	Tª ambiente	DMSO
Metotrexato/Ametopterina	Sigma (A7019)	9050-97-9	454,44	-20°C	DMSO
ALIMTA/Pemetrexed disodium	Eli Lilly (QA449E)	150399-23-8	471,38	4°C	Agua
Sordarina	² Merck	11076-17-8	492,602	4°C	Agua
Diamida	Sigma (D3648)	10465-78-8	172,19	-20°C	Agua
Dietil maleato 97%	Sigma (D97703)	141-05-9	172,18	Tª ambiente	DMSO
Edelfosina	³ Avanti Polar Lipids	65492-82-2	523,73	4°C (-20°C)	Agua
Miltefosina	Dr. Mollinedo	58066-85-6	407,6	4°C (-20°C)	Agua
Perifosina	Dr. Mollinedo	157716-52-4	461,658	4°C (-20°C)	Agua
Erucifosfolina	Dr. Mollinedo	143317-74-2	489,712	4°C (-20°C)	Agua
ES-285	⁴ pharmaMar		321,97	4°C	DMSO
Kahalido F	⁴ pharmaMar	149204-42-2	1477,87	4°C	DMSO
Higromicina B	Duchefa (H0125)	31282-04-9	527,53	4°C	Agua

CAS#: Chemical Abstract Service

¹ Facilitada por el Dr. Arroyo

² Facilitada por el Dr. Ballesta

^{3,4} Facilitada por el Dr. Mollinedo

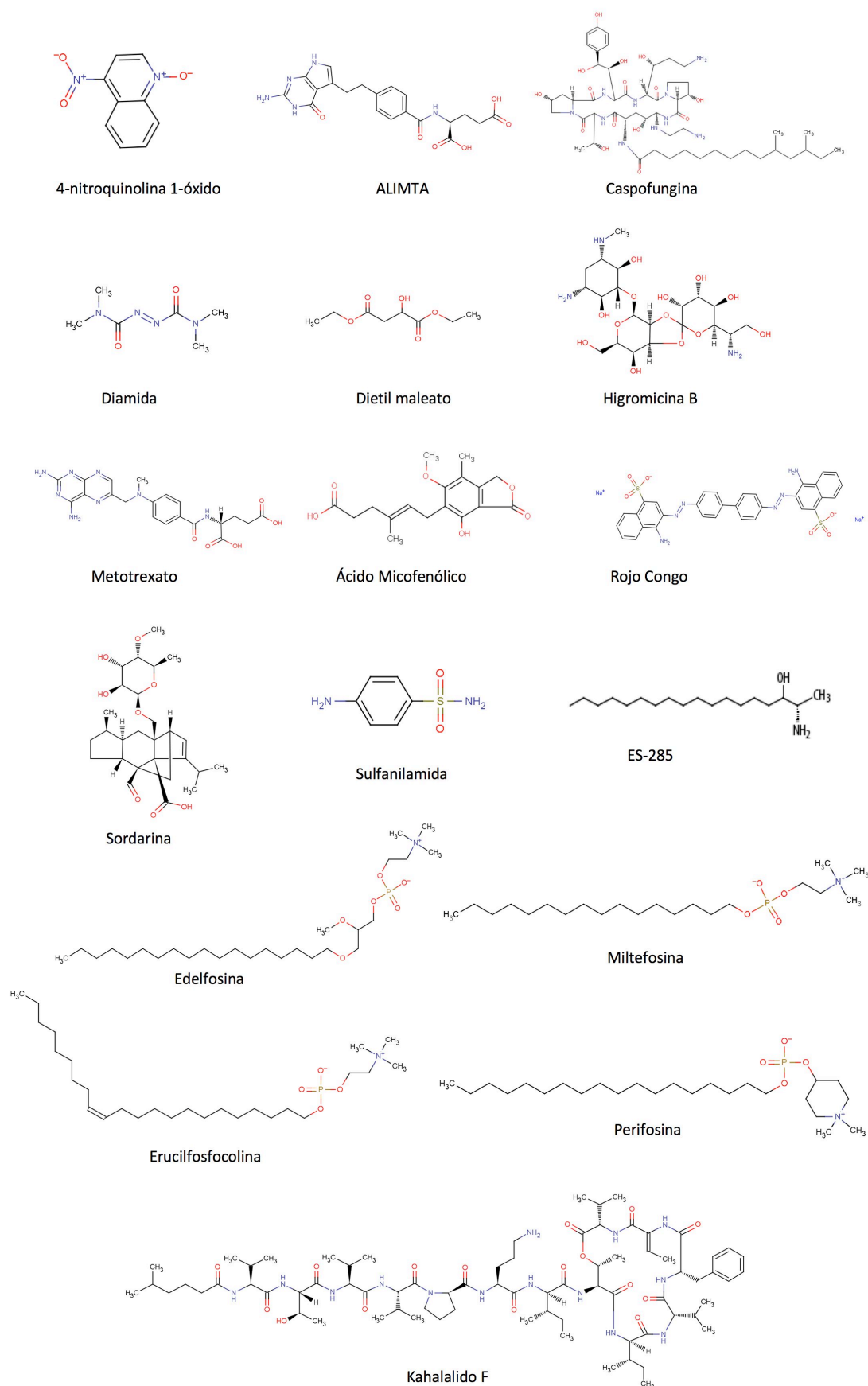


Figura 15. Estructuras químicas de los compuestos empleados en este trabajo. Obtenidas de la base de datos del NIH, ChemIDplus: <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>, a excepción de la estructura correspondiente a ES-285.

6.- Métodos Adicionales

En algunos de los ensayos con determinados compuestos, se decidió profundizar en el estudio del mecanismo de acción de los mismos y/o en la caracterización funcional de algunos mutantes. Para ello se emplearon, aparte de las técnicas de biología molecular habituales (Sambrook and Russell, 2001), métodos y materiales adicionales que a continuación describiremos:

6.1- Ensayos de Crecimiento en Sólido: Diluciones en Gota

Este tipo de ensayos se realizó para validar o comprobar la sensibilidad/resistencia de determinados mutantes a algunos de los compuestos objeto de estudio y, en el caso del rojo congo para realizar el escrutinio de la colección completa de mutantes. Para realizar estos ensayos, las cepas de interés se incubaron en medio rico a 28°C durante 2-3 días, generalmente en placas multipocillo. Posteriormente, se igualaron las concentraciones de células iniciales de cada cepa, y se hicieron de 4 a 6 diluciones seriadas generalmente en agua estéril (se observó que en las diluciones realizadas en medio rico la adhesión del líquido a la superficie de acero de la punta del replicador era menor y desigual, provocando que las réplicas fueran heterogéneas). Para realizar las réplicas a medio sólido, se empleó un replicador de 48 puntas planas de acero (*Replica plater for 96 well plate 8 x 6 Array*, Sigma-Aldrich). La limpieza y esterilización del replicador se realizó como se ha descrito en el segundo apartado de esta sección. Las placas de medio sólido se incubaron 4-6 días y se obtuvieron imágenes de las mismas cada 12-24 horas (mediante un escáner o con una cámara de fotos digital).

6.2- Escrutinio Sistemático de la Colección de Mutantes de Deleción de *S. cerevisiae* en Medio Sólido con Rojo Congo

El rojo congo absorbe en el espectro empleado para determinar la D.O., es por ello que en este caso se decidió realizar el escrutinio de colección completa de mutantes en medio sólido. Para ello se ideó una variación del protocolo de crecimiento en sólido mediante diluciones en gota, que acabamos de describir. En este caso, las placas de 96 pocillos conteniendo las cepas de la colección se incubaron en medio rico a 28°C durante 2-3 días, hasta que la mayoría de cepas alcanzaron la confluencia. Entonces, se empleó el replicador de 48 puntas planas de acero para hacer una dilución 20 de cada placa en una placa multipocillo con agua estéril (dicha dilución se escogió previamente de manera empírica mediante ensayos piloto en los que se emplearon varias diluciones). Posteriormente, las cepas "diluidas" se inocularon, empleando dicho replicador, en placas petri con medio rico sólido control (sin rojo congo) y problema (con la concentración de rojo congo indicada en la [Tabla 5](#)). En cada placa de la colección se inoculó al inicio del experimento la cepa mutante de referencia *sIt2Δ*, descrita en la literatura como sensible. Puesto que la determinación del fenotipo es, en este caso, cualitativa, se empleó el crecimiento de dicha cepa junto con el de la cepa silvestre, como referencia para determinar la sensibilidad o resistencia de cada cepa mutante al rojo congo.

6.3- Ensayos de Fidelidad de la Traducción

La determinación de la **tasa de traducción a través de un codón de parada** (“*Translation termination codon readthrough*”, también conocido como “*Nonsense suppression assays*”), se realizó mediante la transformación de las cepas mutantes *dphΔ* y de la cepa silvestre con un sistema de vectores de expresión especializado. Este sistema de plásmidos contiene el gen “*reporter*” *lacZ* bajo el control del promotor del gen de la 3-fosfoglicerato quinasa (*PGK1*) (Stansfield et al., 1995). En la fusión de ambos se han introducido en fase, los **codones de parada** prematura UAA (pUKC817), UAG (pUKC818), o UGA (pUKC819), de forma que la omisión de los mismos resulta en la activación de la β -galactosidasa, cuyos niveles de actividad son cuantificables mediante un ensayo colorimétrico con el sustrato orto-nitrofenil- β -galactopiranosido (ONPG). Los niveles de supresión se calcularon en función del ratio de actividad β -galactosidasa de cada una de las cepas transformadas con los plásmidos pUKC817, pUKC818, o pUKC819, con el correspondiente al transformante con el plásmido control pUKC815, que carece de codón de parada prematuro (Firoozan et al., 1991). En el ensayo se emplearon, al menos, dos transformantes independientes de cada una de las cepas.

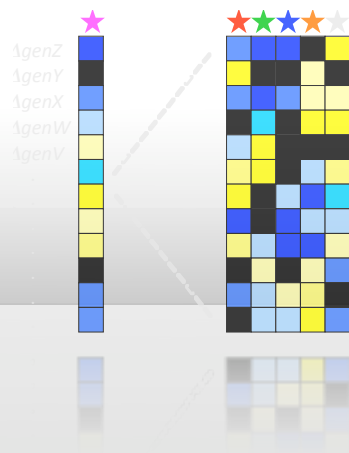
La determinación de la **tasa de cambio de fase de lectura de la traducción** se analizó mediante la transformación de las cepas *dphΔ* y de la cepa silvestre con una batería de vectores de expresión con un **sistema dual** del gen “*reporter*” de la **luciferasa**. Estos vectores constan del promotor de la enzima alcohol deshidrogenasa (*ADH1*) y las secuencias de las luciferasas de *Renilla* y de luciérnaga. En el plásmido control (pYDL-control) ambas luciferasas se encuentran en fase por lo que, mediante un **ensayo luminométrico**, es posible detectar la actividad de ambas luciferasas. Los plásmidos problema presentan insertadas entre ambas luciferasas unas secuencias que actúan como **señales de cambio de fase ribosómica programada** (PRF, de “*Programmed Ribosomal Frameshift*”) (Harger and Dinman, 2003). En nuestro caso se emplearon los plásmidos con las señales PRF de los virus **L-A** (en dirección 5' o -1)(pYDL-LA) y **Ty1** (en dirección 3' o +1) (pYDL-Ty1), proporcionados por el grupo del Dr. Dinman. Los niveles de PRF se calcularon como el ratio de la actividad luciferasa (luciérnaga/*Renilla*) de cada cepa transformada con los plásmidos problema, relativo al mismo ratio en la correspondiente cepa transformada con el plásmido control (Harger and Dinman, 2003). Se utilizaron, al menos, tres clones independientes de cada una de las cepas transformantes, en los que para determinar la actividad luciferasa dual se dispuso del **kit Dual-Luciferase® Reporter Assay System** (Promega Corporation) y de un luminómetro (MiniLumat LB 9506 Luminometer, de Berthold).

6.4- Ensayos de Incorporación de Edelfosina-³H a Gran Escala en *S. cerevisiae*

Uno de los objetivos del proyecto relativo al escrutinio con el agente antitumoral Edelfosina ha sido la identificación de mutantes de *S. cerevisiae* con dificultades para incorporar una modificación tritiada del mismo. La estrategia ingenieria ha consistido en la realización de un ensayo de incorporación de Edelfosina-³H entre los 94 mutantes que resultaron más resistentes en los escrutinios con la colección de 4800 cepas deletantes haploides *MATa* realizados en presencia de dicho compuesto.

A continuación, desglosaremos los detalles de este ensayo de incorporación de Edelfosina-³H a gran escala, ya que creemos que pueden servir como ejemplo para la realización de otros ensayos análogos. En primer lugar, a partir de una placa “*master*” de 96

pocillos conteniendo las cepas mutantes de interés, las correspondientes cepas control, y pocillos de control vacíos, se realiza una réplica a una placa multipocillo tipo “*deep well*” con 1 ml de YPD. Esta placa se incuba a 28°C y en agitación a 1000 rpm (Microtec; Infors AG), y cada cierto tiempo se monitoriza la D.O. 595 nm hasta que las células se encuentren en fase logarítmica y con un número de células aproximado en las cepas analizadas. En ese momento, con una pipeta multicanal se añade a cada una de las cepas el compuesto marcado con tritio y se continúa la incubación en las mismas condiciones durante 20-30 minutos. En nuestro caso, se añadió el volumen de Edelfosina- ^3H necesario para obtener una concentración final de entre 20 y 40 $\mu\text{g/ml}$ y alrededor de 20000-30000 cpm (cuentas por minuto), que dependiendo de la concentración del stock empleado oscilaba entre 20 y 50 μl . Tras el periodo de incubación en presencia del compuesto marcado, se centrifuga la placa multipocillo a 4000 rpm durante 7 minutos, e inmediatamente se desecha el sobrenadante en un contenedor adecuado. Posteriormente se procede a lavar por cuadruplicado cada una de las cepas, resuspendiendo en cada lavado cada cepa en 500-700 μl de PBS-BSA 3% (Buffer de fosfato salino con 3% de seroalbúmina bovina) mediante el empleo de una pipeta multicanal, y centrifugando en las condiciones descritas. Al final, se resuspenden las cepas en 500 μl de PBS y se toma una alícuota de cada una para hacer una dilución y determinar la concentración final de células por pocillo. Por último, se transfieren las cepas a viales con 1,5 ml de líquido de centelleo y, mediante un contador de centelleo, se determina el número de cpm. Las cpm de cada cepa se normalizan con respecto a la concentración final de células de cada cepa y se comparan con las de la cepa control. En nuestro caso el ensayo a gran escala se realizó por duplicado, y la posterior validación de las cepas mutantes que no incorporaron Edelfosina- ^3H se realizó por triplicado.



Resultados y Discusión

Resultados y Discusión

Esta sección de la memoria recoge una parte del trabajo experimental desarrollado durante el periodo de tesis, incluyendo la metodología específica y la discusión. Se han seleccionado únicamente aquellas líneas de investigación que han conducido a la publicación de artículos en revistas internacionales. Esto es así debido a la conveniencia de presentar solamente los trabajos que han sido desarrollados en su totalidad. No obstante, las condiciones y concentraciones empleadas en cada uno de los escrutinios han quedado reflejadas en la sección *Estrategia Experimental y Métodos* (Tabla 5), para que puedan ser consultadas. Los resultados de las restantes líneas de investigación en las que se utilizan algunos de los compuestos descritos (Tablas 4, 6 y 7) pero cuyos resultados no son presentados en esta memoria, serán próximamente objeto de nuevas publicaciones.

Así, esta sección consta de tres capítulos; cada uno de los cuales expone una línea de investigación independiente, aunque enmarcadas dentro del objetivo global de este trabajo y que da título a esta memoria: *PERFILES DE INTERACCIÓN QUÍMICO-GENÓMICOS EN SACCHAROMYCES CEREVISIAE: RESPUESTA A AGENTES ESTRESANTES*.

Cada capítulo consta de un artículo publicado en prensa y está precedido por los antecedentes y los objetivos concretos que se plantearon al inicio de cada trabajo. Los capítulos, incluyen una introducción adicional a la publicada sobre el compuesto objeto del trabajo y, en su caso, sobre la diana o dianas del mismo, cuyo objetivo es facilitar una mejor comprensión del contexto biológico. En el caso del *Capítulo II*, la introducción es más extensa puesto que el trabajo está centrado en un mecanismo biológico sumamente complejo, el ribosoma en translocación. Además, tras el artículo del *Capítulo II* se han añadido resultados adicionales que no se incluyeron en el artículo, así como la discusión de los mismos.

Los artículos incluidos en cada capítulo son:

Capítulo I (Botet et al., 2007)

Botet J, Mateos L, Revuelta JL, Santos MA.

[A Chemogenomic Screening of Sulfanilamide-Hypersensitive *Saccharomyces cerevisiae* Mutants Uncovers ABZ2, the Gene Encoding a Fungal Aminodeoxychorismate Lyase.](#) Eukaryot Cell. 2007 Nov;6(11):2102-11. Epub 2007 Sep 14.

Capítulo II (Botet et al., 2008)

Botet J, Rodríguez-Mateos M, Ballesta JP, Revuelta JL, Remacha M.

[A Chemical Genomic Screen in *Saccharomyces cerevisiae* Reveals a Role for Diphthamidation of Translation Elongation Factor 2 in Inhibition of Protein Synthesis by Sordarin.](#) Antimicrob Agents Chemother. 2008 May;52(5):1623-9. Epub 2008 Feb 19.

Capítulo III (Gaillard et al., 2009)

Gaillard H, Tous C, Botet J, González-Aguilera C, Quintero MJ, Viladevall L, García-Rubio ML, Rodríguez-Gil A, Marín A, Ariño J, Revuelta JL, Chávez S and Aguilera A.

[Genome-Wide Analysis of Factors Affecting Transcription Elongation and DNA Repair: a New Role for PAF and Ccr4-Not in Transcription-Coupled Repair.](#) PLoS Genetics. 2009 Feb; 5(2):e1000364. Epub 2009 Feb 6.

Capítulo I

Sulfanilamida

Capítulo I: Sulfanilamida

1.- Sulfanilamida: Antecedentes y Objetivos

Nuestro grupo ha estado tradicionalmente interesado en el estudio y la manipulación molecular de distintas rutas metabólicas de levaduras y hongos, normalmente enfocado hacia la sobreproducción de vitaminas. Es por ello que, en el contexto de este proyecto, nos planteamos el empleo de antimetabolitos, en concreto sulfanilamida, metotrexato y pemetrexed (Alimta®), como herramienta para tratar de identificar los puntos críticos en las rutas metabólicas afectadas por estos compuestos, así como para la posible identificación de nuevos productos génicos que intervinieran en las mismas.

En este sentido, nuestro trabajo ha consistido en la realización de escrutinios fenotípicos con la colección completa de mutantes de delección de *S. cerevisiae*, en presencia de los agentes sulfanilamida, metotrexato y pemetrexed. Adicionalmente, se ha caracterizado la respuesta transcripcional global de la levadura tras el tratamiento con concentraciones subinhibitorias de metotrexato.

Los resultados obtenidos con los compuestos metotrexato y pemetrexed no se incluyeron en el artículo correspondiente al escrutinio realizado con sulfanilamida y serán objeto de su publicación independiente. Tampoco se han incluido en esta memoria por su complejidad.

Por tanto, el objetivo concreto de este apartado de la memoria consiste en:

- El análisis del mecanismo de acción de la sulfanilamida sobre el metabolismo y la fisiología celular de la levadura mediante la identificación de genes de *S. cerevisiae* esenciales y no esenciales cuya delección provoca hipersensibilidad a dicho compuesto. Para ello se han utilizado las colecciones de mutantes deletantes haploides y mutantes deletantes heterocigotos.

3.- Los Folatos y su Biosíntesis

Los folatos, formas solubles de la vitamina B₉, tienen un papel esencial en el metabolismo, donde actúan como cofactores en numerosas reacciones. Así, los folatos actúan como donadores o aceptores de moléculas de un carbono en la biosíntesis de metabolitos esenciales, como purinas, timidina, o de aminoácidos como metionina, glicina, serina e histidina (Appling, 1991; Blakley and Benkovic, 1984).

El metabolismo de los folatos es la diana de numerosos fármacos, incluyendo antibióticos (trimethoprim y sulfonamidas), y agentes antitumorales (metotrexato y pemetrexed) (Gangjee et al., 2007; Gangjee et al., 2008). Su empleo como diana antitumoral se basa en que procesos que precisen una proliferación celular rápida, como la embriogénesis (Tamura and Picciano, 2006) o el cáncer (Ferguson and Philpott, 2008), son particularmente sensibles a los niveles de folatos intracelulares. Por otro lado, la base de su actividad antimicrobiana radica en la esencialidad de la ruta *de novo* de síntesis de folatos en procariotas, eucariotas unicelulares, hongos, y plantas, y en la ausencia de dicha ruta en animales que, por tanto, dependen de la toma de ácido fólico en la dieta.

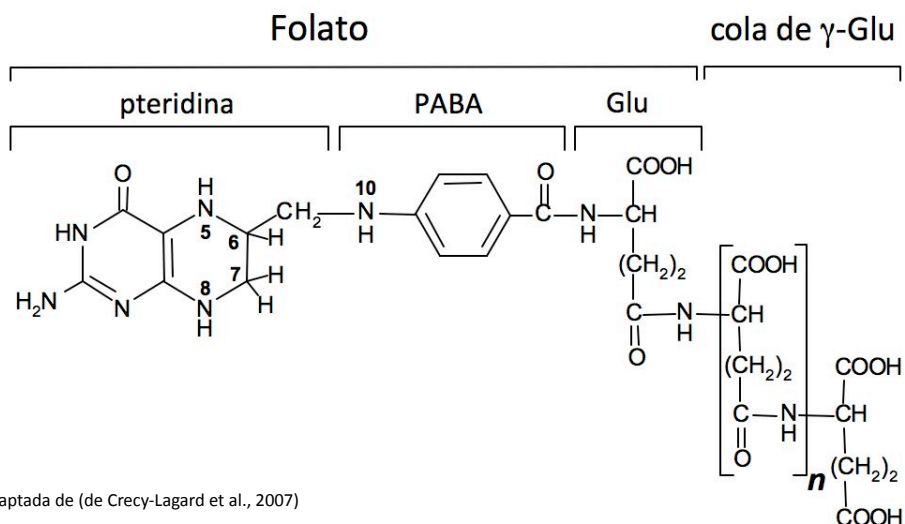


Figura adaptada de (de Crecy-Lagard et al., 2007)

Figura 16. Estructura química del tetrahidrofolato en forma poliglutamada. El anillo de pteridina de los folatos se puede encontrar en distintos estados de oxidación/reducción, desde la forma más oxidada (folato), a la forma intermedia (dihidrofolato, DHF), hasta la más reducida (tetrahidrofolato, THF). El THF puede ser modificado en N5 y N10 mediante la adición de “especies” de un carbono (grupos metil, formil, etc.) para formar los siguientes folatos: 5-metil-THF, 5-formil-THF, 5-formimino-THF, 10-formil-THF, 5,10-metenil-THF, y 5,10-metilen-THF, los cuales son donadores activos de un carbono en numerosas reacciones biosintéticas. En *S. cerevisiae* el DHF es monoglutamado por la enzima dihidrofolato sintasa (DHFS). El THF es poliglutamado por la enzima folilpoliglutamato sintasa, lo que incrementa la retención celular de los folatos y mejora la eficiencia de las reacciones en las que son sustratos.

Los folatos son moléculas tripartitas formadas por una pteridina, el ácido paraaminobenzóico (PABA) y una cola formada por un número variable de glutamatos (Fig. 16). La ruta metabólica de síntesis e interconversión de folatos es bastante compleja y se inicia con la síntesis de los precursores de la pteridina a partir de GTP, mientras que el PABA se sintetiza a partir de corismato. Posteriormente, i) la molécula de PABA se condensa con la dihidropteridina pirofosfato (DHP-PP) por la acción de la enzima dihidropteroato sintasa (DHPS) para formar dihidropteroato (DHP); después, ii) la adición de glutamato al DHP catalizada por la enzima dihidrofolato sintasa (DHFS) da lugar a dihidrofolato (DHF); y por último, iii) la reducción del DHF da lugar a tetrahidrofolato (THF), a través de una reacción catalizada por la dihidrofolato reductasa (DHFR) (Fig. 17). El THF y sus derivados son las moléculas empleadas como cofactores en la biosíntesis de nucleótidos y de algunos aminoácidos y vitaminas. El THF se transforma en 5,10-metilen THF, cofactor que participa en reacciones de intercambio de moléculas de un carbono (“one carbon metabolism”) y en la síntesis de timidina monofosfato (TMP), donde la enzima timidilato sintasa (TS) genera como subproducto DHF (Blakley and Benkovic, 1984) (Fig. 17). Las interconversiones entre los folatos y su participación como cofactores en el metabolismo de un carbono tienen lugar tanto en el citoplasma como en la mitocondria (Appling, 1991).

2.- Sulfanilamida

La sulfanilamida (ver Fig. 15) es un compuesto de la familia de las sulfamidas o sulfonamidas, los primeros agentes antimicrobianos en ser sintetizados químicamente de forma sistemática y que son ampliamente empleados en la actualidad para el tratamiento de infecciones bacterianas, fúngicas y protozoarias. Estos compuestos son análogos estructurales

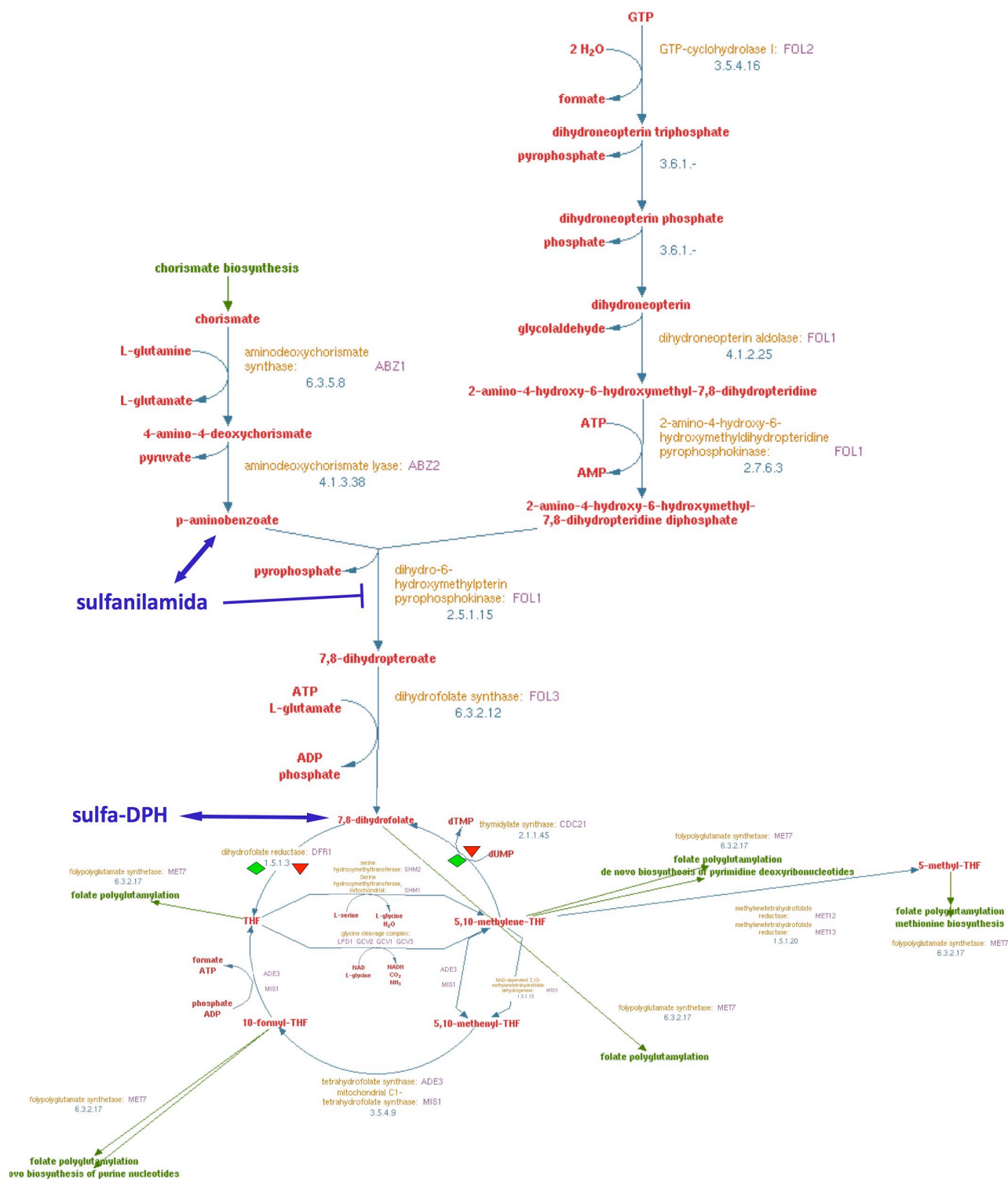


Figura 17. Ruta de síntesis de folatos en *S. cerevisiae*. Figura adaptada a partir del esquema obtenido de la sección “Yeast Biochemical Pathways” del SGD (<http://www.yeastgenome.org/biocyc/>). La sulfonamidas bloquean la ruta de síntesis de folatos mediante la inhibición competitiva de la enzima DHPS (Fol1 en *S. cerevisiae*). Además, la mimetización de la molécula de PABA es tan perfecta que las sulfonamidas pueden condensarse con la pteridina (DHP-PP) compitiendo *in vivo* con el DHF. En comparación, los antifolatos metotrexato (▼) y pemetrex (◆) inhiben a la DHFR. Estas moléculas en su forma poliglutamada inhiben también otras enzimas como la TS, y las enzimas 5-aminoimidazol 4-carboxamida ribonucleótido formiltransferasa (AICARFT, Ade16 y Ade17 en *S. cerevisiae*) y glicinamida ribonucleótido formiltransferasa (GARFT, Ade8 en *S. cerevisiae*) de la ruta de síntesis de purinas (no mostradas en la figura).

del PABA, una molécula intermediaria en la ruta *de novo* de síntesis de folatos, y actúan como inhibidores competitivos de la misma (Brown, 1962).

Las sulfamidas no sólo compiten con el PABA sino que también son condensadas con DHP-PP para formar sulfa-DHP (Patel et al., 2003) y, de esta forma, compiten *in vivo* con el DHF e inhiben el crecimiento en la levadura (ver Fig. 17).

4.- Caracterización de ORFs de Función Desconocida

Las nuevas tecnologías de secuenciación permiten que el número de genomas secuenciados crezca de forma exponencial, proporcionando información inestimable acerca de la secuencia de miles de genes. Los genes codifican, en general, proteínas con una o múltiples funciones, pero en su mayoría dichas funciones son desconocidas o están poco caracterizadas. Uno de los retos actuales de la biología es desentrañar la función o funciones de todos los productos génicos de un organismo (Dolinski and Botstein, 2005). No obstante, trece años después de la secuenciación del genoma de *S. cerevisiae* aún permanecen sin caracterizar 975 ORFs, que representan alrededor del 15% de los potenciales ORFs identificados hasta la fecha en este organismo (ver Fig. 2). Las posibles causas de la dificultad en la caracterización funcional de este número relativamente alto de genes son: i) la redundancia funcional; ii) la ausencia de fenotipo de los mutantes; y iii) que son genes prescindibles en las condiciones de crecimiento en el laboratorio (Pena-Castillo and Hughes, 2007).

Como ya apuntamos en la *Introducción*, la disrupción génica es una aproximación muy eficaz para determinar, mediante el análisis de los fenotipos, la función biológica de un ORF no caracterizado. Así, entre las aplicaciones surgidas de los estudios basados en las colecciones de mutantes de delección está la caracterización funcional de ORFs de función desconocida (Alamgir et al., 2008; Downey et al., 2006; Measday et al., 2005). Sin embargo, la falta de información relativa a estos ORFs sin caracterizar, ha conducido a que sean frecuentemente ignorados por los investigadores en los escrutinios a gran escala.

El trabajo que se presenta a continuación en el artículo adjunto, es un ejemplo de la utilidad de este tipo de aproximaciones, no sólo para tratar de comprender los mecanismos de acción de los compuestos objeto de estudio sino también para la caracterización funcional de proteínas de función desconocida.

NOTA: En el artículo correspondiente al escrutinio con el antifúngico sordarina (Botet et al., 2008) hay una errata en la página 1628, donde dice *YLR043w* debería ser *YLR143w*.

A Chemogenomic Screening of Sulfanilamide-Hypersensitive *Saccharomyces cerevisiae* Mutants Uncovers *ABZ2*, the Gene Encoding a Fungal Aminodeoxychorismate Lyase[∇]

Javier Botet, Laura Mateos, José L. Revuelta,* and María A. Santos

Departamento de Microbiología y Genética, Instituto de Microbiología Bioquímica, Universidad de Salamanca/CSIC, Campus Miguel de Unamuno, 37007 Salamanca, Spain

Received 25 July 2007/Accepted 5 September 2007

Large-scale phenotypic analyses have proved to be useful strategies in providing functional clues about the uncharacterized yeast genes. We used here a chemogenomic profiling of yeast deletion collections to identify the core of cellular processes challenged by treatment with the *p*-aminobenzoate/folate antimetabolite sulfanilamide. In addition to sulfanilamide-hypersensitive mutants whose deleted genes can be categorized into a number of groups, including one-carbon related metabolism, vacuole biogenesis and vesicular transport, DNA metabolic and cell cycle processes, and lipid and amino acid metabolism, two uncharacterized open reading frames (*YHI9* and *YMR289w*) were also identified. A detailed characterization of *YMR289w* revealed that this gene was required for growth in media lacking *p*-aminobenzoic or folic acid and encoded a 4-amino-4-deoxychorismate lyase, which is the last of the three enzymatic activities required for *p*-aminobenzoic acid biosynthesis. In light of these results, *YMR289w* was designated *ABZ2*, in accordance with the accepted nomenclature. *ABZ2* was able to rescue the *p*-aminobenzoate auxotrophy of an *Escherichia coli* *pabC* mutant, thus demonstrating that *ABZ2* and *pabC* are functional homologues. Phylogenetic analyses revealed that *Abz2p* is the founder member of a new group of fungal 4-amino-4-deoxychorismate lyases that have no significant homology to its bacterial or plant counterparts. *Abz2p* appeared to form homodimers and dimerization was indispensable for its catalytic activity.

Tetrahydrofolate (vitamin B₉) and its folate derivatives are essential cofactors in all organisms and play a central role in one-carbon metabolism (2, 6). In their reduced form, folates act as the major cellular donors of one-carbon units in reactions involved in the synthesis of a wide variety of essential compounds such as glycine, methionine, purines, thymidylate, pantothenic acid, and *N*-formylmethionyl-tRNA (2). Folate deficiency provokes misincorporation of uracil into the DNA and chromosome breaks during the repair by uracil-DNA glycosylase and apyrimidinic endonuclease (7). Moreover, low-folate diets are associated with increased risk of developing cancer, and neural tube defects can be prevented by folic acid supplementation in early pregnancy (16).

Whereas most prokaryotes, microbial eukaryotes, and plants are able to biosynthesize folate *de novo*, mammals have lost this capacity, and they therefore rely on its dietary ingestion to meet their metabolic needs. Accordingly, mammals have evolved highly sophisticated uptake processes for transporting folates into cells, the reduced folate carrier being the primary route for the entry of reduced folates (28). The absence in mammals of a folate biosynthetic pathway has provided the basis for the development of antifolate sulfa drugs such as sulfonamides and sulfones, which deplete pathogenic microbial cells of essential growth folate (38).

The study of the folate biosynthetic pathway has been restricted to a few species of bacteria and plants (4, 5, 15). The folate molecule is tripartite, comprising of pteridine, glutamate, and *p*-aminobenzoate (PABA) moieties. In *Escherichia coli*, folic acid is biosynthesized by coupling of PABA and 7,8-dihydro-6-hydroxymethylpterin pyrophosphate to produce 7,8-dihydropteroate, which is subsequently glutamylated to give 7,8-dihydrofolate and reduced to yield tetrahydrofolate. The PABA moiety is synthesized in two steps catalyzed by two separate enzymes (Fig. 1). In bacteria, aminodeoxychorismate synthase (a heterodimeric enzyme formed by the association of the subunits encoded in *E. coli* by *pabA* and *pabB*) synthesizes 4-amino-4-deoxychorismate (ADC) from chorismate and glutamine (15). However, the pathway leading to PABA in *Saccharomyces cerevisiae* has not yet been completely elucidated. A bifunctional gene (*ABZ1*) encodes a protein bearing similarity to the two components (PabA and PabB) of ADC synthase described for *E. coli* (9). However, the gene that presumably encodes ADC lyase in yeast remains to be identified. Based on a large-scale screening of yeast mutants hypersensitive to the toxic PABA-analogue sulfanilamide, we identified a gene of previously unknown function (*YMR289w/ABZ2*) that is required for the biosynthesis of PABA. Here we show that the enzyme encoded by *ABZ2* is needed to convert ADC to PABA. On the basis of sequence similarity, the product of *ABZ2* is representative of a group of relatively homologous ADC lyases from fungi that are distantly related to the prokaryotic and plant enzymes. This finding completes the identification of the 10 enzymatic steps that convert PABA and GTP into tetrahydrofolate in the pathway for vitamin B₉ biosynthesis in yeast.

* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Microbiología y Genética, Instituto de Microbiología Bioquímica, Universidad de Salamanca/CSIC, Campus Miguel de Unamuno, 37007 Salamanca, Spain. Phone: 34 923 294671. Fax: 34 923 224876. E-mail: revuelta@usal.es.

[∇] Published ahead of print on 14 September 2007.

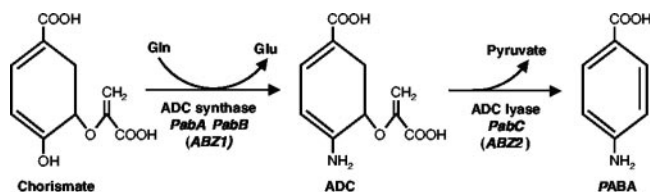


FIG. 1. Biosynthesis of PABA in *E. coli* and in *S. cerevisiae*. Names in italics show the *E. coli* genes that encode the enzyme. PabA and PabB associate to form the ADC synthase complex. Name in italics and in parentheses represents the corresponding *S. cerevisiae* gene; *ABZ1* encodes a bifunctional PabA-PabB ADC synthase. pABA, PABA.

MATERIALS AND METHODS

Yeast strains and growth conditions. The collection of nonessential haploid *MAT α* yeast deletion strains derived from parental strain BY4742 (*MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0*) was obtained from Euroscarf (Frankfurt, Germany; <http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/index.html>), while the essential heterozygous diploids set was obtained from Invitrogen (catalog no. 95401.H5R3). The deletion strains were generated by the *Saccharomyces* Genome Deletion Project (http://www-sequence.stanford.edu/group/yeast_deletion_project/deletions3.html) by replacing the target gene with a kanamycin resistance cassette, *KanMX4*, by means of a PCR-based gene disruption strategy (44).

Yeast strains were grown on standard rich medium YPD (1% yeast extract, 2% Bacto peptone, 2% glucose) and synthetic minimal medium (SMM) (43) supplemented with the nutritional requirements of the parental strain. Agar (2%) was added for solid plates. All yeast cultures were incubated at 28°C.

Large-scale sulfanilamide sensitivity screenings. Approximately 4,800 haploid deletion strains in the BY4742 background and 1,100 heterozygous essential diploids were screened for hypersensitivity to sulfanilamide in liquid SMM. The strains were pinned from 96-well frozen stock plates by using a stainless steel 96-pin replicator (Nalgene Nunc International) into 96-well plates containing 150 μ l of liquid YPD medium supplemented with G418 (150 μ g/ml; Gibco-BRL). Several replicates of the corresponding wild-type strain were included in the master plates to minimize experimental noise due to intra- and interexperimental variations. The plates were incubated at 28°C for 3 days and then pin-replicated onto liquid SMM 96-well plates containing either no drug or 200 μ g of sulfanilamide (Sigma)/ml. Plates were incubated at 28°C, and growth was scored quantitatively every 24 h over a period of 5 days by obtaining readings of the optical density at 595 nm, using a microplate reader spectrophotometer (model 550; Bio-Rad Laboratories). Putative sulfanilamide-hypersensitive strains identified during the screening of the yeast knockout collection were further retested at least in duplicate under the same conditions described for the screenings. Strains with enhanced sensitivity to sulfanilamide were selected based on a growth inhibition (GI), after 96 h of sulfanilamide treatment, of >75%. The GI was calculated according to the following equation: $GI = 100 \times [(growth\ of\ mutant\ in\ control\ medium - growth\ of\ mutant\ in\ drug-containing\ medium) / growth\ of\ mutant\ in\ control\ medium]$.

Functional complementation assays. For complementation assay of the *E. coli* PabC function, a *pabC* deletion mutant was constructed in the *E. coli* strain BW25113 background according to published procedures (8). Briefly, a *pabC* deletion cassette was constructed by using the N-terminal *pabC* deletion primer (5'-CCGTAGTGAACATGCTGCCACACTAACAATTCTCTGATAAAGGAGCCGGTCCGATCCCCGGGTAATTA-3') and the C-terminal *pabC* deletion primer (5'-CCCAGTACCACAGCAATAACAAGATTATCAATAAACAATTTCATGATGAATTCGAGCTCGTTTAA-3') to amplify the *loxP*-*kanMX-loxP* module that confers kanamycin resistance in *E. coli* (17). The deletion primers were designed to contain 49-nucleotide homology extensions and 19-nucleotide priming sequences for pUG6 as a template. The ~1,500-bp PCR product was purified and then electrotransformed into *E. coli* strain BW25113 carrying the λ Red expression plasmid pIJ790 (19). After primary selection on medium containing kanamycin (50 μ g/ml), mutants were maintained on medium without antibiotic. They were colony-purified once nonselectively at 37°C and then checked for chloramphenicol sensitivity (25 μ g/ml) to test for the loss of the helper pIJ790 plasmid. A number of kanamycin-resistant, chloramphenicol-sensitive transformants were also found to be PABA auxotrophs. One of them, JR3125 ($\Delta pabC$), was selected and confirmed by analytical PCR and sequencing to carry the desired deletion.

E. coli JR3125 ($\Delta pabC$) was transformed with YEpl352 (20) or a YEpl352-

based plasmid containing an insert spanning the complete *ABZ2* coding sequence and 329 and 441 bp of the upstream and downstream regions, respectively. Complementation growth tests were done by culture at 37°C in liquid M9 minimal medium containing 50 μ g of kanamycin/ml and 100 μ g of ampicillin/ml, with or without 200 ng of PABA/ml, and measuring the absorbance at different time intervals.

Expression and purification of Abz2p. To express the full-length Abz2 protein, a plasmid was generated by inserting the *S. cerevisiae* *ABZ2* coding sequence (PCR amplified) between the NdeI and BamHI cloning sites of the pET-28b expression plasmid (Novagen). In the recombinant vector (pET28b-Abz2), the Abz2 polypeptide is fused in frame with an N-terminal peptide containing six tandem histidine residues, and expression of the His-tagged protein is driven by a T7 RNA polymerase promoter. The DNA sequence of the insert was confirmed.

The pET28b-Abz2 recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21(DE3), and a 1,000-ml culture of *E. coli* BL21(DE3)/pET28b-Abz2 was grown at 37°C in Luria-Bertani medium containing 50 μ M pyridoxal phosphate and 30 μ g of kanamycin/ml until achieving an A_{600} of 0.8. The culture was adjusted to 0.4 mM IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside), and incubation was continued at 18°C for 20 h. The cells were then harvested by centrifugation, and the pellet was stored at -80°C. All subsequent procedures were performed at 4°C. Thawed bacterial pellets were resuspended in 50 ml of lysis buffer A (50 mM potassium phosphate buffer [pH 7.5], 500 mM NaCl, 20 mM imidazole, 0.01 M β -mercaptoethanol, protease inhibitor cocktail [Roche Diagnostics]), and cell lysis was achieved by the addition of 1 mg of lysozyme/ml. The lysates were sonicated to reduce viscosity, and any insoluble material was removed by centrifugation at 15,000 \times g for 45 min.

The soluble extract was applied to a 5-ml Ni-affinity column (HisTrap HP; GE Healthcare) that had been equilibrated with buffer A. The column was washed with the same buffer and then eluted stepwise with the same buffer containing 50, 100, 200, 300, 400, or 500 mM imidazole. The recombinant Abz2 polypeptide was retained in the column and was recovered mainly in the 300 mM imidazole eluate. After desalting on a PD-10 column (GE Healthcare) the eluate was loaded onto a 5-ml MonoQ HR 5/5 column (0.5 \times 5-cm HR 5/5, \AA KTA FPLC System; GE Healthcare), which was equilibrated with buffer B (50 mM potassium phosphate buffer [pH 7.5], 50 mM NaCl, 0.01 M β -mercaptoethanol). The column was then washed with 5 ml of the same buffer, and the chromatography was developed with a 25-ml linear gradient 50 to 500 mM NaCl in buffer B. Fractions from MonoQ chromatographies containing apparently pure Abz2p were pooled and desalted on a PD-10 column, and glycerol was added (10% [vol/vol] final concentration) prior to storage at -80°C. The purity of the protein was checked by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (26). The protein concentration was determined by the Bio-Rad dye binding method, using bovine serum albumin as standard (Bio-Rad).

Enzyme assays. Stock solutions (5 mM) of chorismic acid (Sigma) were extracted three times with diethyl ether to remove contaminating 4-hydroxybenzoate. L-Glutamine and PABA, obtained from Sigma, were used without any additional purification. ADC lyase activity was determined as described previously with minor modifications (14). Standard glutamine-dependent assays designed to generate the intermediate ADC contained 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM MgCl_2 , 10 mM dithiothreitol, 200 mM chorismate, 5 mM L-glutamine, 3% glycerol, and 15 μ g of recombinant yeast PABA synthase (provided by E. Fernandez, Universidad de Salamanca, Spain) and were incubated at 30°C for 2 h with total conversion of chorismate into ADC. At this time, 15 μ g of purified recombinant Abz2p protein was added, and the reaction mixture was incubated at the same temperature. At different times, samples (100 μ l) were removed; the reactions were stopped with 20 ml of 75% acetic acid, incubated on ice for 1 h, and centrifuged (15,000 \times g, 4°C, 15 min). Reaction controls lacking PABA synthase, Abz2p, or both proteins were also performed. The supernatant was separated isocratically on a 250-by-4.6-mm C_{18} reverse-phase column (Bio-Sil C18 HL 90-5 S; Bio-Rad) with 5% (vol/vol) acetic acid as the mobile phase, and the elution of chorismate, ADC, and PABA was monitored at 280 nm. The reaction products were identified and quantified by their UV absorption spectra (30) and elution times relative to standards.

Molecular mass determination. The apparent native molecular mass of purified yeast recombinant ADC lyase was determined via blue native gel electrophoresis and gel filtration chromatography. Gel filtration chromatography was performed on a Superdex 200 HR 10/30 GL column (\AA KTA System; GE Healthcare) calibrated with a MWGF200 kit for molecular weights from Sigma. Blue native gel electrophoresis was done as previously described (39) on a 4 to 16% polyacrylamide gradient gel (NativePAGE Novex; Invitrogen). For blue native gel electrophoresis NativeMark unstained protein standards (Invitrogen) were used. The method of Laemmli (26) was used for SDS-PAGE determination of

TABLE 1. Functional classification of genes whose deletion causes hypersensitivity to sulfanilamide

Function	No. of genes	Mutants hypersensitive to sulfanilamide ^a
One-carbon metabolism	17	<i>ABZ1</i> , <i>ADK1</i> , <i>ADE6</i> , <i>ARO1</i> , <i>CKB1</i> , <i>CKB2</i> , <i>FOL2*</i> , <i>GSH1</i> , <i>GUK1</i> , <i>HRT1</i> , <i>MET6</i> , <i>MET18</i> , <i>MET28</i> , <i>MET30</i> , <i>PHO2</i> , <i>RIB3</i> , <i>TRM7</i>
Amino acid metabolism	8	<i>BRO1</i> , <i>CCR4</i> , <i>LST8</i> , <i>NOT5</i> , <i>PTR3</i> , <i>RTG1</i> , <i>TRP5</i> , <i>URE2</i>
Lipid metabolism	16	<i>ARG82</i> , <i>DEP1</i> , <i>ERG4</i> , <i>ERG6</i> , <i>ERG28</i> , <i>FAB1</i> , <i>GPII</i> , <i>HEM14</i> , <i>MVD1</i> , <i>NSG2</i> , <i>OPI1</i> , <i>PHO23</i> , <i>RXT2</i> , <i>SAP30</i> , <i>UME6</i> , <i>VPS34</i>
Vacuole and vesicular transport	24	<i>CHC1</i> , <i>PEP3</i> , <i>PEP5</i> , <i>RGPI</i> , <i>SEC12</i> , <i>SLA2</i> , <i>TFP1</i> , <i>TFP3</i> , <i>TSA1</i> , <i>VMA4</i> , <i>VMA5</i> , <i>VMA7</i> , <i>VMA8</i> , <i>VMA10</i> , <i>VMA13</i> , <i>VMA16</i> , <i>VMA21</i> , <i>VMA22</i> , <i>VPH2</i> , <i>VPS16</i> , <i>VPS45</i> , <i>VPS52</i> , <i>VPS54</i> , <i>VRP1</i>
DNA metabolism and cell cycle	28	<i>ARP5</i> , <i>ARP8</i> , <i>CAK1</i> , <i>CDC2</i> , <i>CDC8</i> , <i>FUR4</i> , <i>FYV6</i> , <i>GCN5</i> , <i>GRR1</i> , <i>HYS2</i> , <i>INO80</i> , <i>IRRI</i> , <i>KEM1</i> , <i>MCD1</i> , <i>POL32</i> , <i>RAD52</i> , <i>RFC2</i> , <i>RNR2</i> , <i>RRM3</i> , <i>RSC6</i> , <i>RTT109</i> , <i>SGF29</i> , <i>SNF2</i> , <i>SPC72</i> , <i>SPT3</i> , <i>STH1</i> , <i>SWD1</i> , <i>YRB1</i>
Biological process unknown	6	<i>OPI9</i> , <i>YBL100C</i> , <i>YCL007C</i> , <i>YHI9</i> , <i>YMR289W</i> , <i>YOR331C</i>
Other functions	18	
Carbohydrate metabolism		<i>BCY1</i> , <i>SGA1</i> , <i>SHP1</i> , <i>TPS2</i>
Mannosylation		<i>ANP1</i> , <i>KRE2</i> , <i>MNN9</i> , <i>OCH1</i>
Transcription		<i>HPRI</i> , <i>RLR1</i> , <i>RPB4</i> , <i>SNF4</i> , <i>SUB1</i> , <i>THP1</i> , <i>TUP1</i>
Energy		<i>AAC3</i> , <i>ATP1</i> , <i>ATP2</i>

^a Genes identified among the essential heterozygous diploids set are indicated in boldface.

the molecular mass of the Abz2 polypeptide under denaturing conditions. Identification of proteins by tryptic peptide mass fingerprinting (done by the Servicio de Proteómica, CIC, Salamanca, Spain) was performed as described previously (24).

Computational methods. Similarity searches were performed using BLAST software (1) at the National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov). Protein domains or motifs were searched for in Abz2 using the InterProScan program and the InterPro database of protein families at the European Bioinformatics Institute (www.ebi.ac.uk). Multiple sequence alignments were done with CLUSTAL W (41), using the European Bioinformatics Institute tools (www.ebi.ac.uk). Molecular phylogenetic analysis was carried out by using MEGA v 3.1 software (22).

RESULTS

Genome-wide screening for sulfanilamide-hypersensitive mutants. Using the collection of yeast haploid knockout strains and the heterozygous essential diploids set, we performed a chemical genomic screening to identify the spectrum of genes whose deletion alters the fitness profile in the presence of the PABA antimetabolite sulfanilamide. Although the majority of the deletion strains grown grew comparably to wild-type cells on SMM supplemented with sulfanilamide (200 µg/ml), a large number of mutant strains showed mild growth retardation (data not shown). At least 117 strains, however, showed a severe growth defect (75% GI) caused by the presence of the antifolate drug in the medium. Functional classification of the hypersensitive mutants revealed that they were affected in different biological processes, including those involved in vacuole and vesicular transport, DNA metabolic and cell cycle processes, lipid and amino acid metabolism, and others of unknown function (Table 1), indicating that different aspects of their cellular biology were compromised by sulfanilamide treatment. As expected, one group of mutants was related to folate and one-carbon metabolism and encompassed genes involved in the regulation of, or with a direct catalytic role in, the biosynthesis of folates, purine and pyrimidine nucleotides, sulfur, and one-carbon metabolism. Moreover, *ABZ1*, the one previously known member of the PABA biosynthetic pathway, was recovered, thus validating our screening. In addition, we found that the deletion of six genes of uncharacterized

function also caused sensitivity to sulfanilamide. Four of them were dubious open reading frames (ORFs)—*OPI9*, *YBL100c*, *YCL007c*, and *YOR331c*—that overlapped verified genes also found to be hypersensitive in our sulfanilamide screening, thus validating this assay. The other two genes (*YHI9* and *YMR289w*) likely encode proteins although their function remains unknown.

Identification of *YMR289W* as the *ABZ2* gene. In the present study we focused on *YMR289w*. Further characterization of the *ymr289w* mutant revealed a slow growth on SMM, a phenotype that resulted in the inability to grow after two successive subcultures in the same medium. This suggests that the *ymr289w* mutant strain is impaired in the synthesis of an essential metabolite whose cellular pool is exhausted after prolonged culture. The hypersensitivity to the antifolate sulfanilamide displayed by *ymr289w* cells points to the folic acid biosynthetic pathway as being responsible for the auxotrophy of the mutant. This hypothesis was confirmed by the fact that the addition of folic acid (2 µg/liter) to the minimal medium restored the ability of the mutant to grow (Fig. 2). Supplementation of the minimal medium with PABA (200 ng/ml) also rescued the growth defect of the mutant cells, indicating that the *YMR289w* gene (named *ABZ2* according to the yeast gene nomenclature guidelines) is involved in the biosynthesis of this folic acid precursor. A YEp352-derived multicopy plasmid harboring the cognate *YMR289w* gene also rendered the *ymr289w* (*abz2*) mutant able to grow in a minimal medium lacking PABA or folic acid, thus demonstrating that no mutation other than the deletion of the *ABZ2* (*YMR289w*) gene was responsible for the PABA auxotrophy.

***ABZ2* functionally complements an *E. coli* *pabC* mutant.** The synthesis of PABA in *E. coli* is carried out by three enzymes encoded by the genes designated *pabA*, *pabB*, and *pabC*. In yeast, an ADC synthase gene (*ABZ1*) has been described that encodes a bifunctional protein containing the two domains homologous to the two components—PabA and PabB—of the prokaryotic ADC synthase (9). The identification in *S. cerevisiae* of a second gene, *ABZ2*, involved in the biosynthesis

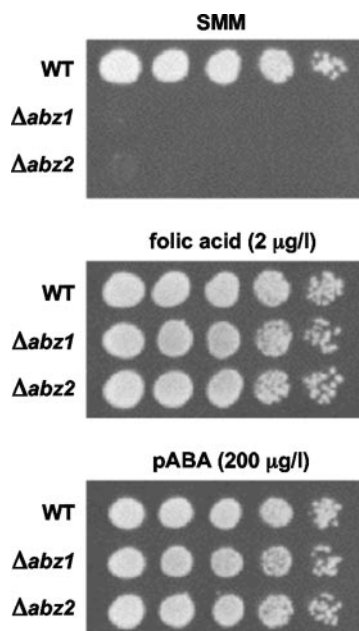


FIG. 2. Folic acid and PABA restore growth of *S. cerevisiae* $\Delta abz1$ and $\Delta abz2$ ($\Delta ymr289w$) mutant strains. BY4742 (wild-type) and $\Delta abz1$ and $\Delta abz2$ mutant strains were grown in SMM. After two successive subcultures in SMM consisting of a 100-fold dilution of a late-exponential-phase culture and allowed to reach late-exponential-phase, samples of the cultures were diluted, spotted onto solid SMM supplemented with folic acid or PABA at the indicated concentrations, and examined for growth after incubation at 28°C for 5 days.

PABA suggests that this gene is functionally homologous to the bacterial *pabC* gene.

To check that *ABZ2* was able to complement the deficiency of the *pabC* function, we constructed an *E. coli pabC* single-gene mutant by the PCR-based inactivation method as described in Materials and Methods (8). One $\Delta pabC$ mutant, designated JR3125, was verified by PCR amplification and sequencing and was selected for the complementation assays.

The deletion of the *pabC* gene in the JR3125 strain resulted in a severe impairment of growth in M9 minimal medium that could be rescued by the addition of PABA (200 ng/ml) to the medium (Fig. 3). The transformation of JR3125 with a YEp352-derived vector containing the complete *ABZ2* ORF and 329 and 441 bp of the upstream and downstream regions, respectively, was also able to restore the ability to grow in the absence of PABA up to nearly the wild-type rate of growth (Fig. 3). However, no complementation was seen in the *pabC* deletion mutant transformed with the empty vector. These results show that the *ABZ2* gene is the yeast functional homologue of the prokaryotic *pabC* gene.

Recombinant Abz2p has ADC lyase activity. The complementation assay and the sequence analyses suggested that *ABZ2* encodes an ADC lyase in yeast. A direct test of the hypothesis that Abz2p catalyzes the β -elimination of pyruvate and aromatization of the ADC to give PABA required the preparation of the pure polypeptide. Since Abz2p is a scarce protein in yeast (11), the Abz2 polypeptide was overexpressed in *E. coli* as a fusion protein containing an N-terminal His₆ tag. The N-terminal extension did not interfere with activity, since

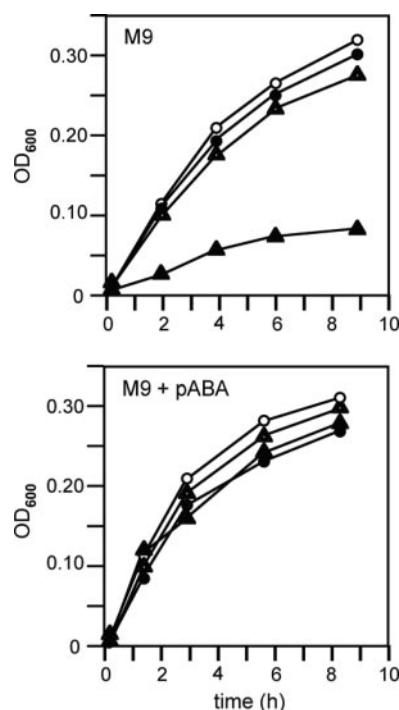


FIG. 3. Yeast *ABZ2* complements an *E. coli pabC* mutant. *E. coli* BW25113 wild-type (*pabC*) cells transformed with the empty plasmid YEp352 (●) or YEp352-*ABZ2* (○) and JR3125 ($\Delta pabC$) mutant cells transformed with the empty plasmid YEp352 (▲) or YEp352-*ABZ2* (△) were inoculated into M9 liquid medium containing 100 μg of ampicillin/ml and the absence or presence of 200 ng of PABA/ml. The cultures were incubated with aeration at 37°C and growth was recorded by measuring the absorbance at 600 nm.

the expression of this fusion protein in the *E. coli* $\Delta pabC$ mutant restored growth on M9 medium lacking PABA and resulted in a 50-fold increase in ADC lyase activity in *E. coli* whole-cell extracts (not shown). The Abz2p recombinant protein was purified as described in Materials and Methods and used in *in vitro* ADC lyase assays. Because the 4-amino-4-deoxychorismate substrate was not commercially available, we prepared it enzymatically from chorismate and glutamine using recombinant ADC synthase from yeast in a coupled assay. ADC synthase, the product of *ABZ1*, catalyzes the synthesis of 4-amino-4-deoxychorismate by replacing the hydroxyl group of chorismate with an amino group acid supplied by glutamine (9).

The substrate chorismate, the intermediate ADC, and the final product PABA all absorb at 280 nm but can be readily separated by reversed-phase high-pressure liquid chromatography (HPLC). We confirmed this chromatographic separation with elution times comparable to that reported previously (14). Therefore, after HPLC separation it is possible to determine the conversion of chorismate to ADC due to the enzymatic action of Abz1p; subsequent addition of ADC lyase to the reaction mixture can be used to analyze the conversion of the ADC intermediate to PABA. Addition to the reaction mixture of purified Abz1p led to a decrease in chorismate and the concomitant formation of ADC. After 2 h of incubation almost a total conversion of chorismate into ADC was achieved (Fig. 4). At this time, purified Abz2p protein was added to the reaction

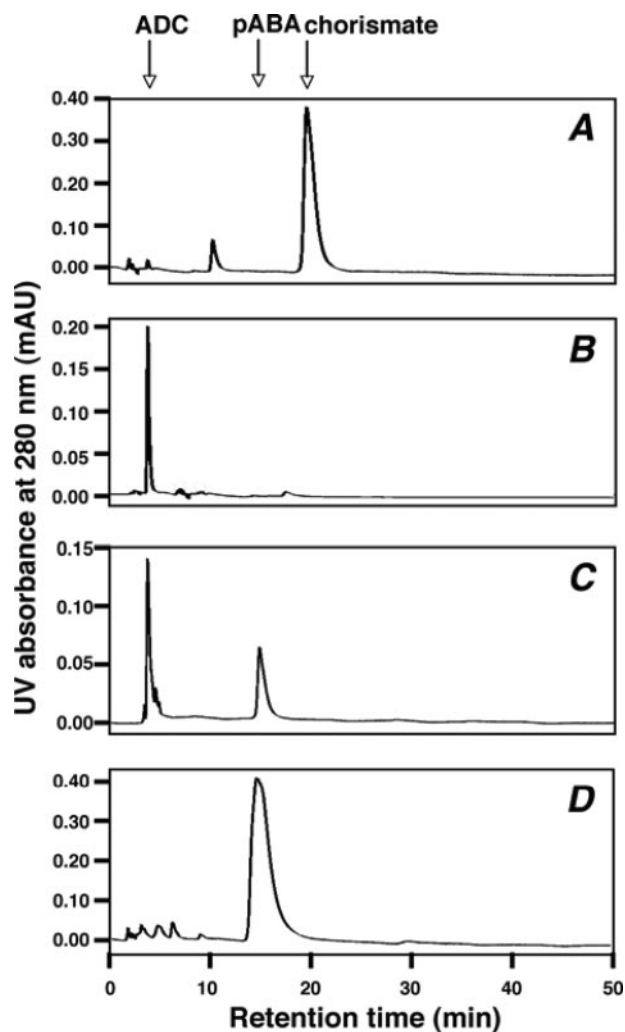


FIG. 4. Enzymatic conversion of ADC into PABA by recombinant yeast Abz2p. Representative HPLC elution profiles for extracts of incubation mixtures consisting of 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol, 3% glycerol, 200 mM chorismate, and 5 mM L-glutamine. Reactions were initiated with the addition of 15 μ g of recombinant yeast Abz1p and incubated at 30°C for 2 h to allow the conversion of chorismate into ADC. At several times samples (100 μ l) were removed and analyzed by reversed-phase HPLC. The chromatograms shown correspond to the samples taken before the addition of the enzyme (A), and after 2 h of incubation (B). After 2 h, purified recombinant Abz2p (15 μ g) was added and incubation was then continued for 90 min at 30°C. PABA formation was monitored at different incubation times (C, 15 min; D, 90 min). The elution positions of chorismate, ADC and PABA are indicated with arrows. mAU, milli-absorbance unit.

mixture. The presence of Abz2p catalyzed the conversion of ADC into PABA in a time-dependent manner. Control reactions revealed that ADC synthase and ADC lyase enzymatic activities were dependent on the presence of Abz1 and Abz2 proteins, respectively (data not shown). Thus, these results show that *ABZ2* encodes a functional ADC lyase that catalyzes the last step in the synthesis of PABA of the folic acid pathway.

Dimeric structure of yeast ADC lyase. Most class IV amino acid aminotransferase-like pyridoxal phosphate-dependent enzymes are homodimers (10). Moreover, the crystal structure of

E. coli ADC lyase has been recently determined and shown to form homodimers (29). The subunit composition of Abz2p was analyzed by using blue native gel electrophoresis. Apparently pure recombinant Abz2p was applied to a 4 to 16% gradient blue native gel (Fig. 5A). Two dominant forms could be identified with approximate molecular masses of 50 and 100 kDa. The estimated molecular mass of the smaller form corresponded well to that of the monomeric Abz2 polypeptide, as calculated from its amino acid sequence and demonstrated by SDS-PAGE electrophoresis analysis (45 kDa) (Fig. 5A). The larger and slightly less abundant one apparently represents the Abz2p homodimer. The identity of both complexes was confirmed by tryptic peptide mass fingerprinting (data not shown).

The dimeric state of Abz2p was also investigated by analytical size exclusion chromatography on a Superdex 200 column calibrated with soluble proteins. The recombinant Abz2p preparation eluted in two distinct peaks, with apparent molecular masses of 45 and 92 kDa, in agreement with the sizes expected for the monomeric and homodimeric forms of Abz2p, respectively (Fig. 5B). ADC lyase activity analyses of the eluted fractions revealed that only fractions containing the dimeric Abz2p were enzymatically active, indicating that dimerization is indispensable for catalytic activity (Fig. 5B).

Fungal ADC lyases are distantly related to prokaryotic and plant ADC lyases. A BLASTp search of the whole GenBank database with the deduced protein product of *ABZ2* detected as the closest homologues a group of proteins of unknown function belonging to different fungal species. These proteins show sufficient homology to Abz2p (identity percentages ranging from 37% for *Ashbya gossypii* to 26% for *Neurospora crassa*) to predict that they represent authentic ADC lyases in those fungal species (Fig. 6A). Strikingly, specialized BLAST searches with Abz2p restricted to the bacterial or plant entries of the GenBank database failed to detect homologues, although experimentally characterized ADC lyases have been described in *E. coli*, tomato, and *Arabidopsis thaliana*. Phylogenetic analysis of representative ADC lyase sequences confirmed that the fungal ADC lyase group clustered well apart from the bacterial and plant ADC lyase groups, although clearly belonging to an ADC lyase subfamily of proteins that is divergent from the structurally related branched-chain amino acid aminotransferase family (Fig. 6B). In fact, a search of the InterPro database (36) for domains or protein motifs present in Abz2p revealed the presence of a domain characteristic of the amino acid aminotransferase-like pyridoxal phosphate-dependent enzymes. In addition to ADC lyases, this superfamily of proteins also encompasses branched-chain amino acid aminotransferases and prokaryotic D-aminotransferases, which are characterized by the presence of a pyridoxal phosphate-binding site located at the interface of a large and a small domain linked by a flexible loop (29). Important residues that are believed to be catalytically essential in ADC lyases are all conserved in Abz2p, as well as in the fungal homologues analyzed in the present study (Fig. 6A).

DISCUSSION

Despite the overwhelming impact of systematic genome sequencing on the understanding of the biology and evolution of organisms, enormous gaps remain in our current knowledge of

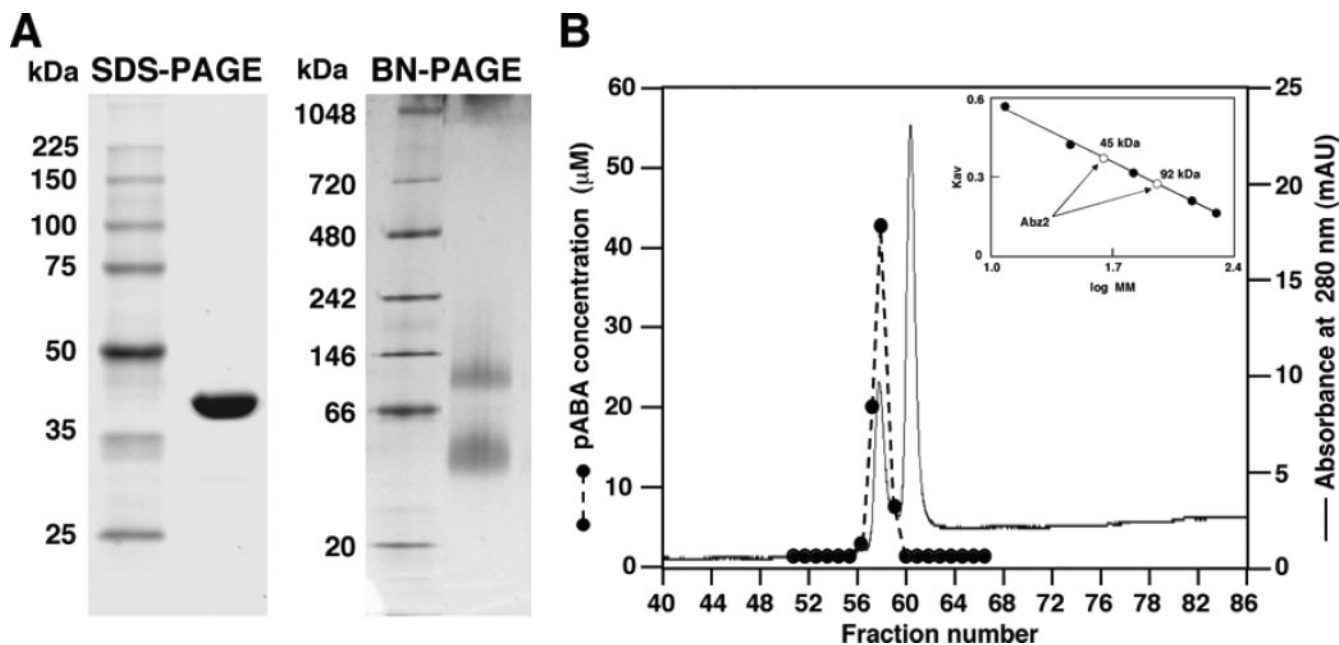


FIG. 5. Dimeric structure of the Abz2 protein. (A) SDS-PAGE and blue native gel electrophoresis (BN-PAGE) analyses of the purified recombinant Abz2p. Samples ($\sim 5 \mu\text{g}$) of purified recombinant Abz2p were loaded on a SDS-14% PAGE gel or on a 4 to 16% gradient blue native gel along with appropriate molecular mass markers. The calculated values for the monomeric and dimeric forms of Abz2p were about 50 and 100 kDa, respectively. (B) Gel filtration chromatography of Abz2p. The protein, 4 to 8 mg of purified recombinant Abz2p, was eluted with 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) through a Superdex 200 HR 10/30 column calibrated with molecular mass markers (cytochrome *c*, horse heart, 12.4 kDa; carbonic anhydrase, bovine erythrocytes, 29 kDa; albumin, bovine serum, 66 kDa; alcohol dehydrogenase, yeast, 150 kDa; β -amylase, sweet potato, 200 kDa). Fractions were assayed for protein concentration (absorbance at 280 nm) and for PABA synthesis from chorismate (200 mM) and L-glutamine (5 mM) in the presence of an excess of yeast ADC synthase protein. The inset shows the column calibration fitting the plot of the elution volume versus the logarithm of the molecular weight of the markers. The apparent molecular masses (MM) of the monomeric and dimeric forms of Abz2p were determined to be approximately 45 and 92 kDa, respectively.

the function of in silico-defined genes. For instance, in spite of being one of the best-known and most-studied eukaryotic model systems, ca. 21% of *S. cerevisiae* protein sequences still cannot be assigned a precise function. Awareness of this issue has permeated the yeast biology community and presents an important challenge (35).

Large-scale analyses have proved to be useful tools in providing functional clues to the set of still uncharacterized genes (3). In particular, chemical genetic profiling, which simultaneously probes the sensitivity of all deletion strains to a small molecule—often a metabolic inhibitor—has the advantage of inherently revealing phenotypes (12, 33). Here we performed a chemical genomic screening to identify the spectrum of genes whose deletion alters the fitness profile in the presence of the PABA antimetabolite sulfanilamide, both in the yeast nonessential haploid and in essential heterozygous sets. Essential heterozygous gene deletion mutants showing increased sensitivity to a drug might represent genes whose products are direct drug targets, genes that exhibit synthetic interactions with the drug target and that are upstream or downstream in the therapeutically relevant pathway, or genes encoding proteins involved in the transport or metabolism of the drug.

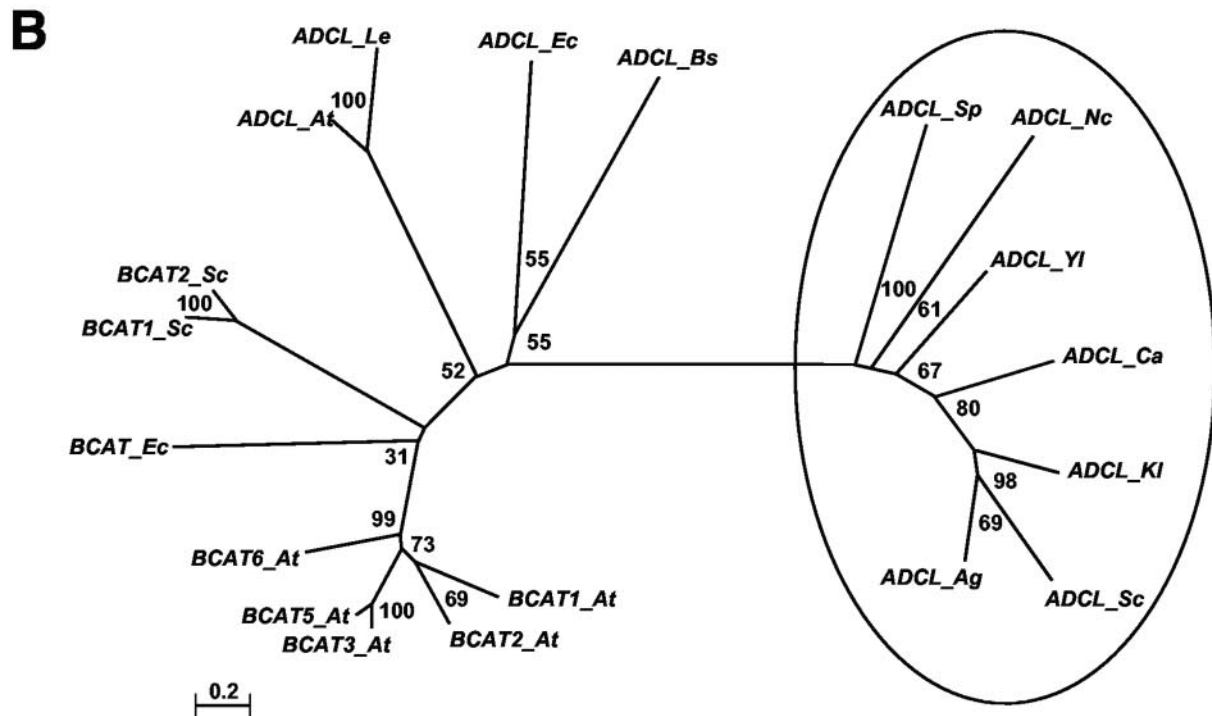
Although a detailed analysis of all of the functional categories disturbed by sulfanilamide is beyond of the scope of the present study, it is worth noting that in our screening we were able to identify a significant number of genes involved in folate/one-carbon metabolism. The sublethal concentration of the

sulfa drug used in the screening probably competes with PABA and dihydrofolate (34), therefore reducing the pool of folate cofactors and affecting a variety of biosynthetic pathways dependent on one-carbon transfer, including the synthesis of purines, thymidylate, *N*-formylmethionyl-tRNA, and some amino acids. Indeed, the screening identified a broad range of gene functions affected by sulfanilamide-induced cytotoxicity (Table 1). As expected, we found a significant number of mutants involved directly or indirectly in one-carbon/folate metabolism (*abz1*, *aro1*, and *fol2*), sulfur metabolism (*ckb1*, *ckb2*, *gsh1*, *hrt1*, *met6*, *met18*, *met28*, and *met30*), and nucleotide metabolism (*ade6*, *adk1*, *cdc8*, *guk1*, *pho2*, *rib3*, *rnr2*, and *trm7*), highlighting the validity of our experimental approach.

Folate pool depletion indirectly blocks dTMP production, leading to dTTP depletion, misincorporation of uracil into DNA during replication, and imbalance in deoxynucleoside triphosphate pools, ultimately causing DNA damage and cytotoxicity due to the so-called “thymineless death” (23, 25). Interestingly, the screening reproducibly yielded mutants lacking deoxynucleoside monophosphate kinase activities (*adk1*, *cdc8*, and *guk1*) or defective in other regulatory or enzymatic functions of nucleotide metabolism (*ade6*, *pho2*, and *rnr2*). This presumably reflects the detrimental effects of the nucleotide imbalance in the presence of the folate depletant agent. Moreover, DNA repair and DNA replication mutants (*fyv6*, *ino80*, *rad52*, *rfc2*, and *rmm3*, and DNA polymerase δ subunits *cdc2*, *hys2*, and *pol32*), as well as mutants involved in chromatin

A

S.c.	-----MSLMDNWKTDMSYDEGLVANP-----NFEVLATFRYDPGFGARQSASKKEIFETPDPRLGLRDEDIRQIINEDY	71
A.g.	-----MSLPVDAKAQPETVVQVYRDYIIKPNFEVV--EFEELISTIRYDPHLGQALPSASNPGVDIGLDFLRNDTQVCPPELPENIL	79
C.a.	-----MPTSLNSELVREIHRDYIEKNFPGSHNNTINPQDLEILSTIRYDPNLSVSPPLYDD-----	57
Y.l.	-----MSDIEFDAVAALPVDKASMDRVIANFVKTLQLEFNSTENKDFEIINTMRWDPALDVSVDQQLNGRSAEPWYFADMSSES-----	79
S.p.	-----MEESNLFET-----	9
E.c.	-----MFLINGHKQESLAVSDRATQFGDGCFTTAR-----	30
A.t.	MAGLSLEFTVNTWNLRLSLQVPCPLRHGFRFRRLRRRILMCSDDSSSQSNVVPVLLSSYEVGERLKLARGGQQLFAMYSVVVDGITTD-----	90
	: :	
S.c.	SSYLK--VREVNSGGDLENIQHPDAWKHDKCTIVCQR--VEDMLQVIYERFFLLDEQYQRIIRIALSYFKIDFSTSLNDLLKLLVENLINCKEKN---SE	164
A.g.	FNDFAPEGPEAAHDPLQELLHILDAPGRQLAPAGLPASAQRDLRATFKERFFLLKEHQRLNLAMSYFDWDFEIPMSLLLKLEAVPLPDGAG---ALG	176
C.a.	-----ITPQNFFLLPEHTSLRQFSMNFHLLFG--TTLDFEITESFLYK-----QL	101
Y.l.	-----ERNAFNSKSCPIWLFHNHMSRLKVSVAFFGWNVQVDPHAILHNILKADISSE-----	131
S.p.	-----TLYDGELFLLPSHLQRMKASAKSLGYSWPGEQY-----IEN	45
E.c.	-----VIDGKVSLLSAHIQRLQDACQRLMISCDFWPQLEQEMKTLAAE-----	73
A.t.	-----AAMVLPDDHMVHRGHGVFDTALINGYLYELDQHLRLILRSASMAKIPLPF-----DRETIK	148
	: . : * :	
S.c.	YHEKIQKMINERQCYKMLVLSKGTDIRIEAIPMPMEPIKLTDDYDSVS--TYFIKTMNGFLIDSTINWDVVVSSEPLNASAFTSERITSRDHYARAR	262
A.g.	LQORMQQLLGTMSYKMLVLSRSRGNMREAHPLVRLPAPN-DGQKYFIN-----TLLSGFVN-GPTWQVWVDSQPVVISPFPTTKTRRRQHYNDAR	266
C.a.	VQAMRKLKKSVLCSYKRGFLPKLDGSVTFELYEVPGRHNLSSGIFPDLTGTFPEELEFLSHPDDEGEDVNWKVYISDSPTLISPFPTTKTRREYNEAR	201
Y.l.	VEIDGKRRPAKQYPLKIFALLGSSGNMKIETSKVGPKPDLLFEKIANSE-----PTYDVVYAKEPISVGFPTTCKRTTKRQQYNDAR	213
S.p.	---KLREAVQDTSMARVFWELSKAGDVTQIVPIQTELEKAPYTLILDKQP-----SSTEKNPSCIN--KMTNRAIYIEAM	115
E.c.	--QQNGVLKVVISRSGCGHGYSTLNSGPATRILSVTAYPAHYDRLRNEGIT-----LALSPVRLGRNPHLAGIKHLNRLEQVLR	151
A.t.	RILIQTVSVSGCRDGSIRHYWLSAGPGDFLLSPSQCLKPTLYAIVIKTNFAIN-----PIGVKVVTSPIPKPEFATVKSNNYLPNVLSQ	233
	: . : * :	
S.c.	VRMQTAINNLRGSEPTSSVSQCELLFSNKSGLLNEGSITNVAVIQK-DPNG--SKKYVTPRLATGCL-CGTRMRYHLRLGLIE----EGDIDIGSLTVG	350
A.g.	T--RVMQAAGMDKME----KTEVLVYNDAFQLNEGSITSVAVKKY-IAAN--EYRYVTPFLASGCL-CGVMRHFLQKGLVQ----EDTIDVRHLKEG	347
C.a.	K-----LLPGTNPQ-----QEEVVLFNTOQNVNNEGSITNIAVKRE-SDG---KQVTPLLSSGCL-CGVTRHFLLRKNFIE----EDNVTEQLKPG	275
Y.l.	AA-----YITRP-----MVEEVLFVNDNGHVTEGSITNIAVQVN-----EMWTPKVTSGCL-MGVTRRHLDLSNKF-----EGFLTRDDLQEG	284
S.p.	NRNDAQYSKAQ-----DVLLYNHQGFVTEATIFNFAV-----HRNG--GQWITPSLKHGLL-SGTRMKNLLENGSIH-----EDDKGLLQKDNL	187
E.c.	SH-----LEQTN-----ADEALVLDSEGVTECCAANLFWRK-----NVVYTPRLDQAGV-NGIMRQFCIRLLAQSSYQLVEVQASLEESLQA	226
A.t.	ME-----AEAKG-----AYAGIWWCKDGFIAEGPNMNVAFVFN-----GKELVMRPFDNVLSGCTAKRRLTLAEQLVSKGLIKTKVKVMDVTEVDG	314
	: : * . * :	
S.c.	NEV---IILHNGVMGCICKGTVKTKY	374
A.g.	DEV---IILHNAVMGCVKGVIRHSPLQS	374
C.a.	TKV---IILHNAIMCVFGGTIVG	297
Y.l.	EV---IILHNAVQGVSKGVVVKL	307
S.p.	KNGEQVILHNSFRKVKCKGVLIIQPEKACELLKKKDSSEKLS	281
E.c.	LQADEMVIDNALMPVMPVCACGDVSFSATLYEYLAPLCERP	269
A.t.	KKADEMVIDSGIPIRPVIQWDEEFIGEGKEGPIAKALLDILLEDMRSGPPSVRVLPVY	373



modification (*arp5*, *arp8*, *gcn5*, *rsc6*, *rtt109*, *sgf20*, *snf2*, *spt3*, *sth1*, and *swd1*), are also severely compromised by the sulfa drug, as expected from the damaging cycles of uracil DNA misincorporation and attempted DNA repair of deoxyuridine residues.

We presume that the sulfonamide hypersensitivity of some mutants involved in cell homeostasis and vesicular transport is likely to be unspecific, since these mutants are affected in processes related to drug or stress responses and show pleiotropic defects in the presence of different insults (32, 45).

Several unexpected mutants involved in lipid metabolism and its regulation were also susceptible to sulfanilamide treatment. Of particular interest are the mutants affected in ergosterol biosynthesis, which—besides its role in membrane fluidity and permeability—have been linked to folate metabolism via *S*-adenosyl-L-methionine (31).

All of these observations reflect the complex phenotypes caused by sulfanilamide-mediated folate depletion, due directly to a one-carbon unit deficiency and indirectly affecting other processes, since many methylated molecules such as nucleic acids, proteins, and lipids are formed by transmethylation reactions with *S*-adenosyl-L-methionine. It is noteworthy that our findings could open new fields for exploring novel treatments for several bacterial, fungal, and protozoan infections because the combination of sulfa drugs with inhibitors of some of the sulfanilamide-compromised processes found could render these pathogens sensitive to combined therapy. Further research will be required to assess precisely how the genes identified influence the response to sulfanilamide treatment.

Among the genes whose deletion elicits sulfanilamide hypersensitivity, *YHI9* and *YMR289w* lack specific physiological functions. The three-dimensional crystal structure of Yhi9p has recently been determined, and it is classified as a member of the PhzF (PF02567) enzyme family that might use either chorismate or an anthranilate derivative as a substrate (27). No functional or structural data on *YMR289w* were available prior to this work.

Here we have demonstrated that the *YMR289w* ORF (*ABZ2* gene) of *S. cerevisiae* encodes an enzyme responsible for the last of the two steps in the PABA branch of the folate biosynthetic pathway. Heterologous complementation of an *E. coli* *pabC* mutation and direct enzymatic characterization of the Abz2 protein support this notion. Yeast *abz2* mutants impaired in the synthesis of PABA are able to grow on minimal medium supplemented either with PABA or with folic acid, indicating

that this metabolite does not have an essential function other than its role as a substrate in the synthesis of folates.

Yeast mutants deleted in *ABZ2* appear to be leaky for PABA auxotrophy. This characteristic, also observed in *E. coli* *pabC* mutants (13), has tacitly been attributed to the fact that ADC is unstable and is spontaneously converted to PABA in a nonenzymatic form (40). However, the apparent leakiness of the *abz2* mutants seems to be due to the existence in the cells of a PABA or a folate pool sufficient to support the growth and division of the cells for several generations. As described here, subculturing of the *abz2* mutant in medium lacking PABA or folate exacerbates its PABA auxotrophy, presumably because of the depletion of existing PABA or folate pools. In plants, most of the endogenous PABA content is not present as free acid but as a glucose ester (*p*-aminobenzoyl- β -D-glucopyranoside [PABA-Glc]). This conjugated PABA-Glc form is accumulated in the cytoplasm and has been proposed to serve as an accessible storage depot of PABA for use as a substrate to sustain the biosynthesis of folate that takes place in mitochondria (37). Although the formation of PABA-Glc has been not detected in yeast (37), it is likely that an equivalent storage form of PABA necessary to drive its transport to mitochondria would exist in this organism.

Although the analysis of *S. cerevisiae* ADC lyase revealed that the protein has no significant sequence homology to its bacterial or plant counterparts, the yeast enzyme does contain a domain typical of the class IV amino acid aminotransferases family (36). Furthermore, all of the residues proposed to be catalytically essential in *E. coli* ADC lyase (29) are also present in Abz2p (Fig. 6A). Thus, the conserved lysine residue that covalently binds pyridoxal phosphate can be found in position 251 in the yeast enzyme. Also present are residues Arg¹⁰⁷ and Glu²⁹⁷, which may directly interact with the enzyme and play a critical role in the catalytic function. Finally, the carboxylate groups of ADC could be recognized by Asn³⁶⁰ and Arg¹⁸², and the cyclohexadiene moiety could make van der Waals contact with the side chain of Leu³⁵⁸ (Fig. 6A).

Yeast ADC lyase appears to form dimers, a structural characteristic that is also shared by the *E. coli* and *A. thaliana* ADC lyases (5, 13, 29). Whereas the prokaryotic and plant enzymes have been detected only in their dimeric form, our analyses using blue native electrophoresis and size exclusion chromatography indicate that the dimeric form of the enzyme is in equilibrium with the monomeric form, although only the dimers are catalytically active. This equilibrium between active

FIG. 6. Comparison of *S. cerevisiae* ADC lyase to other fungal homologues and the experimentally characterized *E. coli* and *A. thaliana* ADC lyases. (A) Alignment of the deduced protein sequences from *S. cerevisiae* (S.c.; NP_014016), *A. gossypii* (A.g.; NP_986996), *Candida albicans* (C.a.; XP_715312), *Yarrowia lipolytica* (Y.l.; XP_502893), *Schizosaccharomyces pombe* (S.p.; NP_595968), *E. coli* (E.c.; A42954), and *A. thaliana* (A.t.; NP_200593). Conserved residues believed to be catalytically important according to the structure of *E. coli* ADC lyase (29) are boxed. (B) Molecular phylogenetic tree of inferred ADC lyase (ADCL) and structurally related branched-chain amino acid transaminase (BCAT) protein sequences from fungi, plants, and bacteria. The circled zone demarcates the fungal sequences. ADCL: Sc, *S. cerevisiae*; Ag, *A. gossypii*; Ca, *C. albicans*; Sp, *S. pombe*; Kl, *Kluyveromyces lactis* (XP_451419); Nc, *Neurospora crassa* (XP_961237); Ec, *E. coli*; Bs, *Bacillus subtilis* (NP_387957); At, *A. thaliana*; Le, *Lycopersicon esculentum* (AY547289). BCAT: BCAT1_Sc (NP_012078); BCAT2_Sc (NP_012682); BCAT_Ec (P00510); BCAT1_At (AAC34335); BCAT2_At (AAC34333); BCAT3_At (CAB66906); BACT5-At (BAB10685); BCAT6-At (AAF76437). The phylogenetic tree was constructed by using the neighbor-joining method of MEGA 3.1 (22). Each node was tested by using the bootstrap approach by taking 1,000 replications and a random seeding of 64,238 to ascertain the reliability of the nodes. The numbers indicated are in percentages against each node. Branch lengths were measured in terms of amino acid substitutions, with the scale indicated below the tree.

dimers and inactive monomers could be the basis of a mechanism of activity regulation of this enzyme, which does not appear to be feedback regulated for PABA or folates (5, 42), and neither does its expression seem to be subject to transcriptional control (our unpublished results). Although unlikely, the possibility still exists that the presence of Abz2p monomers in the enzyme preparation could be an artifact due to the presence of an N-terminal His₆ tag in the recombinant protein used in our analyses.

In contrast to plants, green fluorescent protein-tagged Abz2p is clearly located in the cytoplasm (results not shown), a finding in agreement with a previous report (21). Since Abz1p is also a cytoplasmic enzyme, it is clear that the synthesis of PABA in *S. cerevisiae* takes place in the cytoplasm and not inside an specific organelle, as occurs in the plastids of plants. In this respect, the presence of PABA freely distributed in the cytoplasm of fungi raises the issue of the possible existence of a specific PABA transporter in mitochondria where the tetrahydrofolate biosynthetic pathway must continue (18).

The identification in the present study of the last unknown gene involved in the biosynthesis of tetrahydrofolate in yeast enables the initiation of metabolic engineering projects aimed to the construction of valuable vitamin B₉ producer strains. In particular, overexpression of the PABA biosynthetic pathway could solve one of the major constraints of folate synthesis, namely, the supply of the PABA precursor.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants GEN2001-4707-C08-01 and AGL2005-07245-C03-03 from the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain). J.B. and L.M. were supported by predoctoral fellowships from the Junta de Castilla y León and Universidad de Salamanca (Spain), respectively.

We thank M. D. Sánchez and M. M. Martín for excellent technical help and N. Skinner for correcting the manuscript.

REFERENCES

- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389–3402.
- Appling, D. R. 1991. Compartmentation of folate-mediated one-carbon metabolism in eukaryotes. *FASEB J.* **5**:2645–2651.
- Bader, G. D., A. Heilbut, B. Andrews, M. Tyers, T. Hughes, and C. Boone. 2003. Functional genomics and proteomics: charting a multidimensional map of the yeast cell. *Trends Cell Biol.* **13**:344–356.
- Basset, G. J., E. P. Quinlivan, S. Ravanel, F. Rebeille, B. P. Nichols, K. Shinozaki, M. Seki, L. C. Adams-Phillips, J. J. Giovannoni, J. F. Gregory III, and A. D. Hanson. 2004. Folate synthesis in plants: the *p*-aminobenzoate branch is initiated by a bifunctional PabA-PabB protein that is targeted to plastids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:1496–1501.
- Basset, G. J., S. Ravanel, E. P. Quinlivan, R. White, J. J. Giovannoni, F. Rebeille, B. P. Nichols, K. Shinozaki, M. Seki, J. F. Gregory III, and A. D. Hanson. 2004. Folate synthesis in plants: the last step of the *p*-aminobenzoate branch is catalyzed by a plastidial aminodeoxychorismate lyase. *Plant J.* **40**:453–461.
- Blakley, R. L., and S. J. Benkovic. 1984. Folates and pterins: chemistry and biochemistry of folates, vol. 1. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY.
- Blount, B. C., M. M. Mack, C. M. Wehr, J. T. MacGregor, R. A. Hiatt, G. Wang, S. N. Wickramasinghe, R. B. Everson, and B. N. Ames. 1997. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:3290–3295.
- Datsenko, K. A., and B. L. Wanner. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:6640–6645.
- Edman, J. C., A. L. Goldstein, and J. G. Erbe. 1993. Para-aminobenzoate synthase gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a bifunctional enzyme. *Yeast* **9**:669–675.
- Eliot, A. C., and J. F. Kirsch. 2004. Pyridoxal phosphate enzymes: mechanistic, structural, and evolutionary considerations. *Annu. Rev. Biochem.* **73**:383–415.
- Ghaemmaghami, S., W. K. Huh, K. Bower, R. W. Howson, A. Belle, N. Dephoure, E. K. O'Shea, and J. S. Weissman. 2003. Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* **425**:737–741.
- Giaever, G., A. M. Chu, L. Ni, C. Connelly, L. Riles, S. Veronneau, S. Dow, A. Lucau-Danila, K. Anderson, B. Andre, A. P. Arkin, A. Astromoff, M. El-Bakkoury, R. Bangham, R. Benito, S. Brachat, S. Campanaro, M. Curtiss, K. Davis, A. Deutschbauer, K. D. Entian, P. Flaherty, F. Foury, D. J. Garfinkel, M. Gerstein, D. Gotte, U. Guldener, J. H. Hegemann, S. Hempel, Z. Herman, D. F. Jaramillo, D. E. Kelly, S. L. Kelly, P. Kotter, D. LaBonte, D. C. Lamb, N. Lan, H. Liang, H. Liao, L. Liu, C. Luo, M. Lussier, R. Mao, P. Menard, S. L. Ooi, J. L. Revuelta, C. J. Roberts, M. Rose, P. Ross-Macdonald, B. Scherens, G. Schimmack, B. Shafer, D. D. Shoemaker, S. Sookhai-Mahadeo, R. K. Storms, J. N. Strathern, G. Valle, M. Voet, G. Volckaert, C. Y. Wang, T. R. Ward, J. Wilhelm, E. A. Winzeler, Y. Yang, G. Yen, E. Youngman, K. Yu, H. Bussey, J. D. Boeke, M. Snyder, P. Philippsen, R. W. Davis, and M. Johnston. 2002. Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* **418**:387–391.
- Green, J. M., W. K. Merkel, and B. P. Nichols. 1992. Characterization and sequence of *Escherichia coli* pabC, the gene encoding aminodeoxychorismate lyase, a pyridoxal phosphate-containing enzyme. *J. Bacteriol.* **174**:5317–5323.
- Green, J. M., and B. P. Nichols. 1991. *p*-Aminobenzoate biosynthesis in *Escherichia coli*: purification of aminodeoxychorismate lyase and cloning of pabC. *J. Biol. Chem.* **266**:12971–12975.
- Green, J. M., B. P. Nichols, and B. P. Matthews. 1996. Folate biosynthesis, reduction, and polyglutamylation, p. 665–673. In F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Greene, N. D., and A. J. Copp. 1997. Inositol prevents folate-resistant neural tube defects in the mouse. *Nat. Med.* **3**:60–66.
- Guldener, U., S. Heck, T. Fielder, J. Beinhauer, and J. H. Hegemann. 1996. A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* **24**:2519–2524.
- Guldener, U., G. J. Koehler, C. Haussmann, A. Bacher, J. Kricke, D. Becher, and J. H. Hegemann. 2004. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* Foll1 protein: starvation for C1 carrier induces pseudohyphal growth. *Mol. Biol. Cell* **15**:3811–3828.
- Gust, B., G. L. Challis, K. Fowler, T. Kieser, and K. F. Chater. 2003. PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:1541–1546.
- Hill, J. E., A. M. Myers, T. J. Koerner, and A. Tzagoloff. 1986. Yeast/*Escherichia coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast* **2**:163–167.
- Huh, W. K., J. V. Falvo, L. C. Gerke, A. S. Carroll, R. W. Howson, J. S. Weissman, and E. K. O'Shea. 2003. Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* **425**:686–691.
- Kumar, S., K. Tamura, and M. Nei. 2004. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform.* **5**:150–163.
- Kunz, B. A., S. E. Kohalmi, T. A. Kunkel, C. K. Mathews, E. M. McIntosh, and J. A. Reidy. 1994. International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. Deoxyribonucleoside triphosphate levels: a critical factor in the maintenance of genetic stability. *Mutat. Res.* **318**:1–64.
- Kussmann, M., and P. Roepstorff. 2000. Sample preparation techniques for peptides and proteins analyzed by MALDI-MS. *Methods Mol. Biol.* **146**:405–424.
- Ladner, R. D. 2001. The role of dUTPase and uracil-DNA repair in cancer chemotherapy. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2**:361–370.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680–685.
- Liger, D., S. Quevillon-Cheruel, I. Sorel, M. Bremang, K. Blondeau, I. Aoufath, J. Janin, H. van Tilbeurgh, and N. Leulliot. 2005. Crystal structure of YH19, the yeast member of the phenazine biosynthesis PhzF enzyme superfamily. *Proteins* **60**:778–786.
- Moscow, J. A., M. Gong, R. He, M. K. Sgagias, K. H. Dixon, S. L. Anzick, P. S. Meltzer, and K. H. Cowan. 1995. Isolation of a gene encoding a human reduced folate carrier (RFC1) and analysis of its expression in transport-deficient, methotrexate-resistant human breast cancer cells. *Cancer Res.* **55**:3790–3794.
- Nakai, T., H. Mizutani, I. Miyahara, K. Hirotsu, S. Takeda, K. H. Jhee, T. Yoshimura, and N. Esaki. 2000. Three-dimensional structure of 4-amino-4-deoxychorismate lyase from *Escherichia coli*. *J. Biochem.* **128**:29–38.
- Nichols, B. P., A. M. Seibold, and S. Z. Doktor. 1989. para-aminobenzoate synthesis from chorismate occurs in two steps. *J. Biol. Chem.* **264**:8597–8601.
- Parks, L. W. 1978. Metabolism of sterols in yeast. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* **6**:301–341.
- Parsons, A. B., R. L. Brost, H. Ding, Z. Li, C. Zhang, B. Sheikh, G. W. Brown, P. M. Kane, T. R. Hughes, and C. Boone. 2004. Integration of

- chemical-genetic and genetic interaction data links bioactive compounds to cellular target pathways. *Nat. Biotechnol.* **22**:62–69.
33. **Parsons, A. B., A. Lopez, I. E. Givoni, D. E. Williams, C. A. Gray, J. Porter, G. Chua, R. Sopko, R. L. Brost, C. H. Ho, J. Wang, T. Ketela, C. Brenner, J. A. Brill, G. E. Fernandez, T. C. Lorenz, G. S. Payne, S. Ishihara, Y. Ohya, B. Andrews, T. R. Hughes, B. J. Frey, T. R. Graham, R. J. Andersen, and C. Boone.** 2006. Exploring the mode-of-action of bioactive compounds by chemical-genetic profiling in yeast. *Cell* **126**:611–625.
 34. **Patel, O. G., E. K. Mberu, A. M. Nzila, and I. G. Macreadie.** 2004. Sulfa drugs strike more than once. *Trends Parasitol.* **20**:1–3.
 35. **Pena-Castillo, L., and T. R. Hughes.** 2007. Why are there still over 1000 uncharacterized yeast genes? *Genetics* **176**:7–14.
 36. **Quevillon, E., V. Silventoinen, S. Pillai, N. Harte, N. Mulder, R. Apweiler, and R. Lopez.** 2005. InterProScan: protein domains identifier. *Nucleic Acids Res.* **33**:W116–W120.
 37. **Quinlivan, E. P., S. Roje, G. Basset, Y. Shachar-Hill, J. F. Gregory III, and A. D. Hanson.** 2003. The folate precursor *p*-aminobenzoate is reversibly converted to its glucose ester in the plant cytosol. *J. Biol. Chem.* **278**:20731–20737.
 38. **Roland, S., R. Ferone, R. J. Harvey, V. L. Styles, and R. W. Morrison.** 1979. The characteristics and significance of sulfonamides as substrates for *Escherichia coli* dihydropteroate synthase. *J. Biol. Chem.* **254**:10337–10345.
 39. **Schagger, H., W. A. Cramer, and G. von Jagow.** 1994. Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal. Biochem.* **217**:220–230.
 40. **Tewari, Y. B., P. Y. Jensen, N. Kishore, M. P. Mayhew, J. F. Parsons, E. Eisenstein, and R. N. Goldberg.** 2002. Thermodynamics of reactions catalyzed by PABA synthase. *Biophys. Chem.* **96**:33–51.
 41. **Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**:4673–4680.
 42. **Viswanathan, V. K., J. M. Green, and B. P. Nichols.** 1995. Kinetic characterization of 4-amino 4-deoxychorismate synthase from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177**:5918–5923.
 43. **Wickerham, L. J.** 1951. The classification and taxonomy of yeasts. U.S. Dept. Agric. Tech. Bull. **1029**:1–56.
 44. **Winzeler, E. A., D. D. Shoemaker, A. Astromoff, H. Liang, K. Anderson, B. Andre, R. Bangham, R. Benito, J. D. Boeke, H. Bussey, A. M. Chu, C. Connelly, K. Davis, F. Dietrich, S. W. Dow, M. El Bakkoury, F. Foury, S. H. Friend, E. Gentalen, G. Giaever, J. H. Hegemann, T. Jones, M. Laub, H. Liao, N. Liebundguth, D. J. Lockhart, A. Lucau-Danila, M. Lussier, N. M'Rabet, P. Menard, M. Mittmann, C. Pai, C. Rebischung, J. L. Revuelta, L. Riles, C. J. Roberts, P. Ross-MacDonald, B. Scherens, M. Snyder, S. Sookhai-Mahadeo, R. K. Storms, S. Veronneau, M. Voet, G. Volckaert, T. R. Ward, R. Wysocki, G. S. Yen, K. Yu, K. Zimmermann, P. Philippens, M. Johnston, and R. W. Davis.** 1999. Functional characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* **285**:901–906.
 45. **Yadav, J., S. Muend, Y. Zhang, and R. Rao.** 2007. A phenomics approach in yeast links proton and calcium pump function in the Golgi. *Mol. Biol. Cell* **18**:1480–1489.

Capítulo II
Sordarina

Capítulo II: Sordarina Introducción

1.- Sordarina: Antecedentes y Objetivos

En el contexto del proyecto *LEVAS3* se llevó a cabo una colaboración con los Dres. Miguel Remacha y Juan Pedro García Ballesta (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Madrid) para analizar los efectos biológicos de la sordarina, un inhibidor de la traducción en hongos filamentosos y en levaduras.

Así, el objetivo concreto de este trabajo es:

- La identificación de los mecanismos de resistencia a la sordarina y el estudio de su mecanismo de acción, empleando las aproximaciones experimentales descritas en la sección *Estrategia Experimental y Métodos*. El objetivo último es profundizar en el conocimiento de los mecanismos moleculares que tienen lugar durante la traducción mediante la identificación de elementos moduladores de dicho proceso.

2.- Efectos de la Sordarina en Hongos y Levaduras

Las sordarinas constituyen la familia de antifúngicos más importantes en la inhibición de la síntesis proteica. La sordarina (ver su estructura química en la [Fig. 15](#)) fue aislada por científicos de Sandoz a partir de los caldos de cultivo de la fermentación del hongo *Sordaria araneosa*. El compuesto fue patentado en 1969 bajo el nombre SL-2266 (Sigg and Stoll, 1969), siendo descrita por primera vez su purificación y degradación por hidrólisis ácida en 1971 (Hauser and Sigg, 1971). Sin embargo, el principal modo de acción de este diterpeno glicósido tetracíclico no fue descubierto hasta 1998, cuando surgieron publicaciones simultáneas de los laboratorios Merck y Glaxo Wellcome en los que demostraban que la sordarina y sus derivados son potentes inhibidores selectivos de la síntesis proteica en levaduras y hongos. La sordarina actúa uniéndose al factor de elongación 2 (eEF2), impidiendo la translocación del ribosoma que tiene lugar durante el proceso de elongación (Capa et al., 1998; Dominguez et al., 1998; Justice et al., 1998).

Trabajos posteriores mostraron que, aunque eEF2 por sí mismo se puede unir a la sordarina, la presencia del ribosoma es esencial para una alta afinidad de unión (Dominguez and Martin, 1998). Simultáneamente, otros trabajos en los que se aislaron nuevos mutantes resistentes a esta droga, identificaron a la proteína del tallo ribosómico rpP0 como implicada en la susceptibilidad a sordarina (Gomez-Lorenzo and Garcia-Bustos, 1998; Justice et al., 1999), poniendo en evidencia la existencia de una relación funcional entre rpP0 y eEF2.

Una de las peculiaridades más interesantes de ésta familia de compuestos es su excepcional especificidad, ya que inhiben la traducción en algunos hongos y levaduras pero no en mamíferos, constituyendo la base de su actividad antifúngica. Además, las sordarinas muestran distintos grados de actividad antifúngica. Así, inhiben fuertemente el crecimiento de la mayoría de especies de *Candida* y otros hongos patógenos, aunque varias especies de interés clínico, como *Aspergillus fumigatus*, han sido descritas como resistentes a estos compuestos (Herreros et al., 1998; Kinsman et al., 1998).

Es sorprendente que las sordarinas sean capaces de inhibir la translocación en diferentes eucariotas de una forma tan selectiva, si se tiene en cuenta que interactúan con componentes celulares altamente conservados como son eEF2 y el ribosoma. Es probable que ambos componentes sean precisamente los responsables de la especificidad de acción de la sordarina, ya que experimentos de complementación heteróloga y la construcción de quimeras han permitido identificar dominios, tanto en eEF2 (residuos 521, 523 y 524) (Shastri et al., 2001) como en la proteína del tallo ribosómico rpP0 (residuos 118 a 138) (Santos and Ballesta, 2002; Santos et al., 2004), responsables de la resistencia a este antifúngico. Así, se considera a eEF2 como la diana primaria de las sordarinas y al complejo eEF2•ribosoma como la diana funcional.

Existen distintos derivados de la sordarina, incluyendo análogos sintéticos (Herreros et al., 1998) y naturales (Basilio et al., 2006), que muestran distintos niveles de actividad y espectro antifúngico. Estudios recientes han mostrado que pequeños cambios introducidos en la molécula de sordarina, pueden influir en la conformación de eEF2 en el ribosoma (Soe et al., 2007), lo que podría explicar las diferencias en la actividad antifúngica, así como en el mecanismo concreto de inhibición de la translocación (Dominguez et al., 1999; Justice et al., 1998).

3.- La Elongación de la Traducción

La traducción de los RNA mensajeros (RNAm) en proteínas tiene lugar en tres fases: iniciación, elongación y terminación (revisado por (Ramakrishnan, 2002; Kapp and Lorsch, 2004)). El ciclo de elongación comprende tres fases repetitivas catalizadas por el ribosoma y dos GTPasas, eEF1A y eEF2 en eucariotas (EF-Tu y EF-G en procariotas, respectivamente): 1) descifrado, 2) transferencia peptídica, y 3) translocación (revisado por (Steitz, 2008)).

- 1) El proceso de selección del aminoacil-RNAt (aa-RNAt) por el ribosoma se basa en la correcta complementariedad Watson-Crick entre las bases del codón del RNAm localizado en el sitio A (aminoacil) de la subunidad ribosómica pequeña (SSU), y el anticodón del RNAt entrante. En este proceso, el aa-RNAt entra en el sitio A/T del ribosoma formando parte del complejo ternario eEF1-A•GTP•aa-RNAt. Si la complementariedad de bases entre el codón del aa-RNAt y el anticodón es correcta, tiene lugar la hidrólisis del GTP, produciéndose la disociación de eEF1-A•GDP y el acoplamiento correcto del aa-RNAt en el sitio A.
- 2) De manera inmediata, el centro peptidil-transferasa de la subunidad ribosómica grande (LSU) cataliza la transferencia de la cadena peptídica nascente del peptidil-RNAt en el sitio P (peptidil) del ribosoma, al recién acomodado aa-RNAt en el sitio A. En este estado, llamado pre-translocacional (PRE), el RNAt recién deacilado se encuentra en el sitio P, y el peptidil-RNAt se encuentra en el sitio A.
- 3) Durante el último paso de la elongación, eEF2/EF-G interactúa con el ribosoma y cataliza la reacción de translocación del RNAm-RNAt de los sitios A y P a los sitios P y E (exit: salida) del ribosoma. El peptidil-RNAt es translocado del sitio A al sitio P, mientras que el reciente RNAt deacilado es translocado del sitio P al E y el ribosoma se mueve hacia delante un codón en el RNAm, exponiendo el siguiente codón en el sitio A, y preparando al ribosoma para otro ciclo de elongación. El proceso de

translocación va acompañado de la hidrólisis de una molécula de GTP y de cambios en la conformación del ribosoma, que pasa de un estado pre-translocacional (PRE) a un estado post-translocacional (POST) en el que: el sitio A está vacante, el sitio P contiene el peptidil-RNAt, y el RNAt deacilado se encuentra en el sitio E (Nierhaus, 1996). Al final de la translocación, el factor eEF2/EF-G abandona el ribosoma permitiendo al complejo ternario eEF1-A•GTP•aa-RNAt entrar en el sitio A e iniciar una nueva ronda de elongación (una amplia revisión sobre la translocación del ribosoma se puede consultar en (Noller et al., 2002; Frank et al., 2007)).

4.- El Factor de Elongación 2 (eEF2/EF-G)

La proteína eEF2, EF-G en procariotas, consta de seis dominios estructurales: I-V y G' (Fig. 18a); y su estructura se asemeja a la del complejo ternario eEF1-A•GTP•aa-RNAt. Dos de los dominios N-terminales (I y II) recuerdan a los de eEF1, mientras que los tres dominios C-terminales (III, IV y V) parecen mimetizar el RNAt del complejo ternario. El dominio IV mimetiza, tanto en forma como en posición espacial y en la distribución de cargas negativas, la zona del anticodón del RNAt del complejo ternario; lo que ha llevado a algunos autores a sugerir un fenómeno de “mimetización molecular” (A et al., 1994; Czworkowski et al., 1994; Nissen et al., 1995). Por su parte, el dominio I, también llamado G, contiene el sitio de unión a GTP, en el cual tras la hidrólisis de GTP, se modifica la estructura de determinadas regiones muy conservadas (zonas denominadas *switch-1*, *switch-2*, y el *P-loop* (“*phosphate-binding loop*”)).

En complejo con el ribosoma, los dominios I y V de eEF2 interactúan con la LSU, en particular, el bolsillo de unión a GTP del dominio I contacta con el dominio SRL (“*sarcin-ricin loop*”) del RNAr 25S. El dominio II interactúa con la SSU, mientras que los dominios III y IV interactúan con ambas subunidades ribosómicas.

La identidad de secuencia entre el factor de elongación de *S. cerevisiae* (eEF2) y el de su homólogo procariota (EF-G, de *Thermus thermophilus*) es del 30%. Además, el factor de elongación en eucariotas es considerablemente más largo (842 residuos en el eEF2 de *S. cerevisiae*) que el de procariotas (692 residuos en EF-G de *T. thermophilus*), y su comparación revela la existencia de algunas diferencias en cuanto a la estructura y orientación de los dominios (Jorgensen et al., 2003), entre las que cabe destacar las sintetizadas en la Figura 18b.

El factor eucariota puede, además, ser fosforilado de manera reversible en la Thr57 (en *S. cerevisiae*), cercana al *switch-1*. Dicha fosforilación inactiva al factor reduciendo su afinidad por el GTP (Dumont-Miscopein 1994).

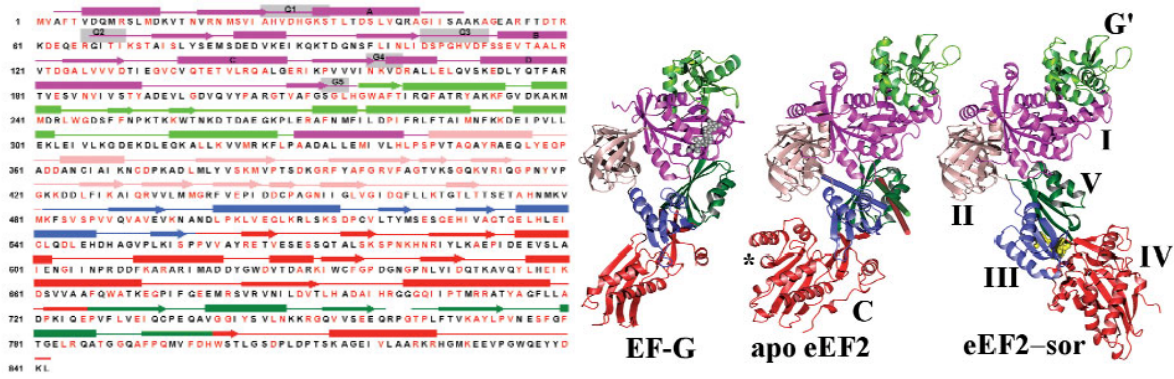


Figura de (Jorgensen et al., 2003)

Figura 18. (a) La secuencia de aminoácidos de eEF2 de *S. cerevisiae*, muestra los cinco dominios estructurales de eEF2: residuos 2-218 y 329-345 (dominio I o G, en púrpura), 219-328 (dominio G', en verde claro), 346-481 (dominio II, en rosa), 482-558 (dominio III, en azul), 559-726 y 801-842 (dominio IV, en rojo), y 727-800 (dominio V, en verde). Las hélices α están marcadas como cajas, mientras que las hojas β están marcadas como flechas. Los residuos en rojo están altamente conservados en eucariotas (>90% entre quince secuencias). En el dominio I, los motivos de unión a nucleótido están nombrados de G1-G5, y las hélices de A-D. **(b)** Estructuras tridimensionales de EF-G H573A (izquierda), eEF2 (centro), y eEF2-sordarina (derecha). Los dominios están numerados y coloreados como en (a). El asterisco en el panel central señala los residuos adicionales en el dominio IV de eEF2, y la "C" es una extensión adicional de 23 residuos presente en el extremo C-terminal de dicho dominio de eEF2. La orientación relativa de los dominios III, IV, y V con respecto a los dominios I, G', y II es diferente en eEF2. Así, el dominio III rota considerablemente con respecto a los dominios IV y V, generando un eEF2 con una conformación más abierta y extendida que EF-G. El GDP unido al dominio I de EF-G se muestra en el panel izquierdo en color gris; y la sordarina en complejo con eEF2 (panel derecho) se muestra en amarillo, entre los dominios III, IV, y V.

5.- El Mecanismo de Translocación

A pesar de los numerosos estudios estructurales efectuados en los últimos años, basados en estudios cinéticos, de cristalografía de rayos X y de criomicroscopía electrónica (*cryo-EM*), el mecanismo de translocación no está esclarecido y continúa siendo materia de debate. La controversia se centra fundamentalmente en lo que se refiere al papel de la hidrólisis del GTP durante la translocación y, aunque han sido postulados numerosos modelos (Kaziro, 1978; Rodnina et al., 1997; Spahn and Nierhaus, 1998; Zavialov et al., 2005), todos proponen que tanto el ribosoma como el eEF2 sufren importantes cambios conformacionales durante el proceso que son importantes para la actividad GTPasa (para una revisión actualizada de los modelos de translocación consultar los artículos de (Fraser and Hershey, 2005; Frank et al., 2007; Moran et al., 2008)).

El modelo propuesto por el grupo del Dr. Joachim Frank (Frank et al., 2007) es uno de los que tiene mayor consenso y, por tanto, se muestra en la [Figura 19](#), cuyos detalles se desarrollan a continuación (Nota: debido a la gran cantidad de referencias de este apartado, nos remitiremos a la excelente revisión de Frank *et al.* (Frank et al., 2007)).

5.1- El Estado Híbrido y el Movimiento de Rotación de la SSU

Según este modelo, es probable que el movimiento de rotación ("*ratcheting*") de la SSU con respecto a la LSU, que es coincidente con el movimiento de los RNAt hacia el estado híbrido, ocurra incluso en ausencia de factores ribosómicos. El modelo emergente es que la unión de eEF2/EF-G•GTP estabiliza la conformación híbrida de los RNAt ([Fig. 19b](#)). Además, estudios recientes de cinética basados en FRET ("*Fluorescence Resonance Energy Transfer*") sugieren que el movimiento de los RNAt de los sitios A y P puede ocurrir de manera

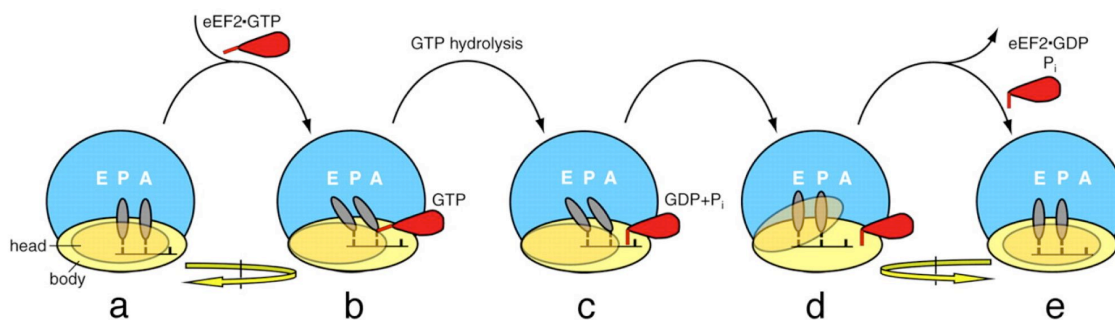


Figura de (Frank et al., 2007)

Figura 19. Modelo de translocación propuesto por Frank y colaboradores (Frank et al., 2007). El esquema muestra una visión superior del ribosoma durante la secuencia propuesta de eventos que tienen lugar durante el proceso de translocación. Según estos autores, eEF2•GTP se une al ribosoma pre-translocacional, en el que los RNAt están alineados con sus respectivos sitios A, P, y E (RNAt en E no mostrado en el esquema) (a), promoviendo y estabilizando la formación de un estado híbrido, en el que se libera el RNAt del sitio E (no mostrado en el esquema) y en el que los otros dos RNAt adquieren una posición híbrida: A/P (en SSU/LSU) para el peptidil-RNAt y P/E (en SSU/LSU) para el RNAt descargado (b). La unión de eEF2 coincide con un movimiento de rotación (“ratcheting”) de la subunidad ribosómica pequeña (SSU) con respecto de la subunidad ribosómica grande (LSU). Se produce entonces la hidrólisis de GTP, la cual induce un movimiento en el dominio IV de eEF2, de forma que el extremo de este dominio interrumpe la conexión existente entre el complejo cabeza de la SSU-RNAt-RNAm y el cuerpo de la SSU (c). Una vez que se ha interrumpido la unión al cuerpo de la SSU, la cabeza de la misma rota en la dirección de la elongación, translocando el RNAm un codón y el anticodón de los RNAt “híbridos” a los sitios P y E (d). La translocación se completa mediante la combinación del movimiento inverso de la cabeza de la SSU y la rotación inversa (“reverse ratcheting”) de la SSU, al tiempo que el eEF2•GDP se disocia del ribosoma, dejando el ribosoma en estado post-translocacional (con los RNAt en estado “clásico”), listo para una nueva ronda de elongación (e).

independiente, de forma que un RNAt puede estar en conformación clásica (A/A), mientras que el otro puede estar en conformación híbrida (P/E). A este estado, al que se puede llegar en ausencia de factores de elongación, lo han denominado estado intermedio o de transición. No obstante, en ausencia de factores de elongación disminuye en gran medida la tasa de translocación. Es por ello que se cree que los factores de elongación surgieron, durante el curso de la evolución, para disminuir las barreras energéticas entre los diferentes estados.

5.2- Mecanismo de Hidrólisis del GTP

En la hidrólisis de GTP juegan un papel importante las regiones conservadas del dominio G de eEF2/EF-G (*switch-1* y *2*, y el *P-loop*), las cuales se unen al GTP. Por su parte, el GAC (“GTPase Activating Center”), localizado en la LSU, es el sitio de contacto con el *switch-1* y *2* de eEF2, y también desempeña un papel en la hidrólisis de GTP, ya que se cree que es el propio ribosoma el que actúa como proteína activadora de la actividad GTPasica. El SRL (“sarcin-ricin loop”) del ribosoma es un *tetraloop* en el RNAr de la LSU que se encuentra próximo al *switch-1* de eEF2/EF-G•GTP, y que también está implicado en la activación de la actividad GTPasa (la rotura del SRL con las ribotoxinas α -sarcin o ricina, inhibe la unión de los factores de elongación). Se ha observado que en la transición de eEF2•GTP a eEF2•GDP se produce un movimiento de acercamiento del dominio de unión a GTP (dominio G), pero también de los dominios G' y II, del factor de elongación hacia el GAC del ribosoma, siendo quizás esta transición la que altere las interacciones entre SRL y las regiones *switch*, dando lugar a la hidrólisis de GTP. Por su parte los dominios III, IV y V se mueven en la dirección contraria, alejándose del GAC.

5.3- Rotación de la Cabeza de la SSU, una Etapa Crucial en la Translocación

Mientras que el movimiento de los RNAt en la LSU se puede explicar por la unión de eEF2/EF-G•GTP y la rotación concomitante del ribosoma, el movimiento de avance de un codón de los RNAt a lo largo del RNAm, es más complicado de explicar. Numerosas evidencias apuntan a que la hidrólisis de GTP precede al movimiento de translocación. Así, estudios cinéticos sugieren que la hidrólisis de GTP conduce a un desbloqueo (“*unlocking*”) que produce cambios conformacionales en el ribosoma. Posteriormente, estudios de *cryo-EM* han propuesto que el mecanismo responsable de ese desbloqueo, son los cambios conformacionales que se producen en el dominio IV de eEF2; particularmente importante es el movimiento de 6 Å del extremo de dicho dominio (ver Fig. 20 panel derecho), responsable de interrumpir la conexión entre el centro de descifrado (“*decoding center*”) localizado en el cuerpo de la SSU, y el duplex RNAm-RNAt en el sitio A, pegado a la cabeza de la SSU (Fig. 19c). Así, una vez que se ha cortado dicho contacto, la cabeza de la SSU puede rotar libremente, translocando simultáneamente al complejo RNAm-RNAt de los sitios A y P a los sitios P y E, respectivamente (Fig. 19d). Este movimiento de la cabeza de la SSU arrastra el anticodón (en concreto el ASL o “*anticodon stem-loop*”) del RNAt en el sitio P/E hacia el sitio E, y en este punto el RNAt está probablemente comprometido a permanecer en el sitio E debido a la fuerte interacción con la proteína del tallo L1. Finalmente, se cree que la disociación de eEF2•GDP del ribosoma y la liberación de P_i , produce la interrupción de las interacciones entre la cabeza de la SSU y los RNAt, mediante la combinación del movimiento inverso de la cabeza de la SSU y la rotación inversa (“*reverse ratcheting*”) de toda la SSU (Fig. 19e). Se especula que este evento es el que permite al RNAt acomodarse completamente en el sitio E/E, y al ribosoma adquirir su estado post-translocacional final.

Por otro lado, es posible que la unión de eEF2 al ribosoma proporcione de manera indirecta la fuerza motriz para el movimiento de rotación de la cabeza de la SSU: la unión de eEF2•GTP al ribosoma y el movimiento de “*ratcheting*” son eventos acoplados, que conducen a la curvatura de la parte superior de la hélice 44 (h44) de la SSU, generando un movimiento de 8 Å en el “*decoding center*” desde el sitio A hacia el sitio P (en la dirección de translocación del RNAm-RNAt), y probablemente estabilizando el RNAt del sitio A en el estado híbrido A/P. Dicho movimiento es su vez necesario para que el dominio IV de eEF2 entre en el sitio A. Así, la cabeza de la SSU estaría preparada para rotar tan pronto como la conexión entre el “*decoding center*” (localizado en el cuerpo de la SSU), y el duplex RNAm-RNAt en el sitio A (aún pegado a la cabeza de la SSU), sea interrumpida por el movimiento del extremo del dominio IV que se produce tras la hidrólisis de GTP.

6.- Cambios Estructurales en eEF2 durante la Translocación

Como se ha comentado previamente, han sido numerosos los estudios encaminados a determinar la estructura de eEF2 (EF-G) durante las distintas fases del proceso de translocación. Se asume que eEF2 puede adquirir, al menos, cuatro conformaciones diferentes (ver Figura 20): i) unido a GTP y libre; ii) unido a GTP y unido al ribosoma; iii) unido a GDP y unido al ribosoma; y iv) unido a GDP y libre. Los cambios entre las distintas conformaciones suponen de forma genérica un movimiento de bisagra de los dominios C-terminales (III, IV, y V) con respecto a los dominios N-terminales (I, G', y II) (Agrawal et al., 1999; Agrawal et al., 1998; Jorgensen et al., 2003; Spahn et al., 2004), y, como veremos a continuación, juegan sin duda un

papel importante en la función del factor de elongación.

Han sido empleadas distintas aproximaciones experimentales con objeto de capturar una “imagen estática” de las distintas conformaciones adoptadas por el eEF2/EF-G, en condiciones similares a las fisiológicas. Estas aproximaciones se basan en el empleo de técnicas de cristalografía de rayos X para el estudio de las formas libres, y de *cryo-EM* para el estudio de las formas unidas al ribosoma, combinadas con estrategias para tratar de estabilizar las distintas conformaciones, empleando para ello análogos de GTP no hidrolizables, o determinados compuestos, como el ácido fusídico, la sordarina, o el tetrafluoruro de aluminio, que bloquean el complejo eEF2/EF-G•ribosoma en una conformación determinada. En la [Tabla 7](#) se presenta un breve resumen de dichas estrategias. No obstante, y debido a las dificultades técnicas, los modelos propuestos son incompletos (ya que la mayoría se ha realizado en

Tabla 7. Aproximaciones empleadas para determinar la estructura de eEF2/EF-G

Tipo de Ensayo	Estrategia empleada	Estado de eEF2/EF-G	Organismo	Referencia
rayos X		EF-G en solución	<i>Thermus thermophilus</i>	(A et al., 1994)
rayos X		EF-G•GDP en solución	<i>Thermus thermophilus</i>	(Czworkowski et al., 1994)
rayos X	EF-G (H573A)	EF-G•GDP en solución	<i>Thermus thermophilus</i>	(Laurberg et al., 2000)
rayos X	EF-G (T84A)/GDPNP	EF-G•GTP en solución	<i>Thermus thermophilus</i>	(Hansson et al., 2005)
rayos X		EF-G•2•GTP en solución	<i>Thermus thermophilus</i>	(Connell et al., 2007)
<i>cryo-EM</i>	GMPPNP (análogo no hidrolizable de GTP)	EF-G•GTP unido al ribosoma	<i>Thermus thermophilus</i>	(Connell et al., 2007)
<i>cryo-EM</i>	GMPP(CH ₂)P (análogo no hidrolizable de GTP)	EF-G•GTP unido al ribosoma	<i>E. coli</i>	(Agrawal et al., 1999)
<i>cryo-EM</i>	Ácido fusídico	EF-G•GDP unido al ribosoma	<i>E. coli</i>	(Agrawal et al., 1999)
<i>cryo-EM</i>	GMPP(CH ₂)P (análogo no hidrolizable de GTP)	EF-G•GTP unido al ribosoma	<i>E. coli</i>	(Frank and Agrawal, 2000)
<i>cryo-EM</i>	Ácido fusídico	EF-G•GDP unido al ribosoma	<i>E. coli</i>	(Frank and Agrawal, 2000)
<i>cryo-EM</i>	Thiostrepton	EF-G•GTP unido al ribosoma	<i>E. coli</i>	(Stark et al., 2000)
<i>cryo-EM</i>	Ácido fusídico	EF-G•GDP unido al ribosoma	<i>E. coli</i>	(Stark et al., 2000)
<i>cryo-EM</i>	GDPNP (análogo no hidrolizable de GTP)	EF-G•GTP unido al ribosoma	<i>E. coli</i>	(Valle et al., 2003)
<i>cryo-EM</i>	Ácido fusídico	EF-G•GDP unido al ribosoma	<i>E. coli</i>	(Valle et al., 2003)
<i>cryo-EM</i>	fMet-RNAt fMet en el sitio P	Ribosoma	<i>E. coli</i>	(Gao et al., 2003)
<i>cryo-EM</i>	GDPNP (análogo no hidrolizable de GTP)	EF-G•GTP unido al ribosoma	<i>E. coli</i>	(Gao et al., 2003)
rayos X		eEF2 en solución	<i>S. cerevisiae</i>	(Jorgensen et al., 2003)
rayos X	Sordarina	eEF2•GDP•sordarina en solución	<i>S. cerevisiae</i>	(Jorgensen et al., 2003)
rayos X	ADP ribosa/Sordarina	ADPR•eEF2•GDP•sordarina en solución	<i>S. cerevisiae</i>	(Jorgensen et al., 2004)
<i>cryo-EM</i>	Sordarina	eEF2•GDP•sordarina unido al ribosoma	<i>S. cerevisiae</i>	(Gomez-Lorenzo et al., 2000)
<i>cryo-EM</i>	Sordarina	eEF2•GDP•sordarina unido al ribosoma	<i>S. cerevisiae</i>	(Spahn et al., 2004)
<i>cryo-EM</i>	GDPNP	eEF2•GTP unido al ribosoma	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	(Taylor et al., 2007)
<i>cryo-EM</i>	ADP ribosa/GDPNP	ADPR•eEF2•GTP unido al ribosoma	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	(Taylor et al., 2007)
<i>cryo-EM</i>	ADP ribosa/Sordarina	ADPR•eEF2•GDP•sordarina unido al ribosoma	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	(Taylor et al., 2007)
<i>cryo-EM</i>	ADP ribosa/Sordarina/GDPNP	ADPR•eEF2•GTP•sordarina unido al ribosoma	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	(Taylor et al., 2007)
<i>cryo-EM</i>	Tetrafluoruro de aluminio	eEF2•GDP unido al ribosoma	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	(Sengupta et al., 2008)
<i>cryo-EM</i>	coronavirus RNAm <i>pseudoknot</i>	RNAm-RNAt•eEF2 unido al ribosoma	reticulocitos de conejo	(Namy et al., 2006)

ausencia de algunos de los factores implicados en la translocación, típicamente los RNAt), y todavía quedan muchas incógnitas por descifrar en el mecanismo de translocación.

A continuación, en la **Figura 20** desglosaremos los cambios conformacionales observados en eEF2 (EF-G) durante la translocación y las posibles implicaciones biológicas de dichos cambios en el contexto del ribosoma en elongación (Frank et al., 2007).

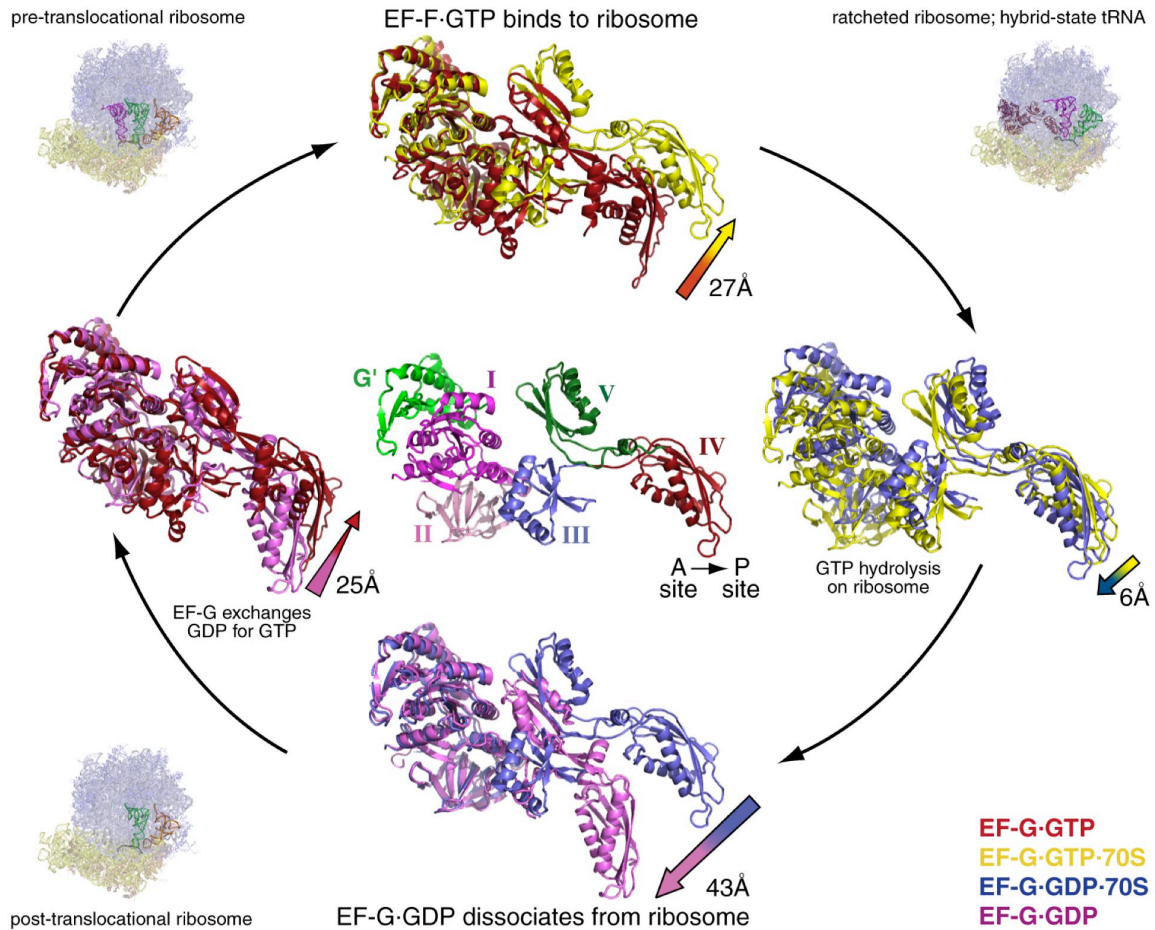


Figura de (Frank et al., 2007)

Figura 20. Cambios conformacionales de EF-G a lo largo del proceso de translocación. Los cambios conformacionales observados en EF-G implican en general un movimiento de bisagra de los dominios C-terminales (III, IV, y V) con respecto a los dominios N-terminales (I, II, y G'). (En el **centro**) Los dominios están coloreados y se muestra la dirección del movimiento del RNAt del sitio A al P en el contexto del ribosoma. (**Arriba**) EF-G·GTP en solución (rojo). La unión de EF-G·GTP al ribosoma (amarillo) induce cambios conformacionales que generan un movimiento de 27 Å en la parte distal del dominio IV. Estos grandes cambios en la conformación del factor, probablemente facilitan el movimiento de los RNAt en la dirección de la translocación, estabilizándolos en el estado híbrido, y estabilizando al ribosoma en su orientación rotada (*"ratcheted"*). (**Derecha**) La comparación del factor unido al ribosoma antes (amarillo), y después (azul), de la hidrólisis de GTP revela un pequeño movimiento de 6 Å del extremo del dominio IV hacia el *"decoding center"*. Este movimiento es probable que interrumpa el contacto entre el *"decoding center"* localizado en el cuerpo de la SSU, y el duplex RNAm-RNAt en el sitio A, pegado a la cabeza de la SSU, de manera que la translocación del RNAm-RNAt puede ocurrir vía rotación de la cabeza de la SSU. (**Abajo**) La disociación de EF-G·GDP –unido al ribosoma (azul), en comparación con el factor en solución (rosa)– da lugar a un gran cambio conformacional en el factor, que incluye un movimiento de 43 Å del extremo del dominio IV. Este cambio conformacional probablemente contribuya a la disociación del factor, permitiendo el movimiento inverso de la cabeza de la SSU y la rotación inversa (*"reverse ratcheting"*) de la SSU. (**Izquierda**) La comparación del factor EF-G·GDP libre en solución (rosa), con el factor libre pero unido a GTP (EF-G·GTP) (rojo), muestra de nuevo un movimiento, esta vez de 25 Å, del extremo del dominio IV. Adicionalmente, la unión de GTP induce cambios en la estructura de las regiones *switch-1* y *switch-2* del sitio de unión a GTP (dominio I) de eEF2/EF-G. La suma de dichos cambios conformacionales podría explicar la mayor afinidad de EF-G·GTP por el ribosoma en estado pre-translocacional.

7.- El Dominio IV de eEF2 y el Residuo de Diftamida

Como se ha puesto en evidencia en los numerosos estudios esquematizados en la [Figura 20](#), el dominio IV de eEF2 tiene una función fundamental en el proceso de translocación. Esta importancia se ha visto apoyada por estudios genéticos, bioquímicos y estructurales en los que se ha mutagenizado o delecionado el extremo de dicho dominio (Rodnina et al., 1997; Savelsbergh et al., 2000; Laurberg et al., 2000). Los resultados de nuestro trabajo, que serán presentados a continuación, nos llevaron a centrar nuestra atención en dicho dominio, y en particular en un residuo de histidina muy conservado evolutivamente (His583 en *E. coli*/His699 en *S. cerevisiae*/His715 en humanos).

Este residuo de histidina conservado, es modificado post-traduccionalmente en el eEF2 dando lugar a un residuo que recibe el nombre de diftamida ("*diphthamide*") (Van Ness et al., 1980). La diftamida es exclusiva del eEF2 y está muy conservada en eucariotas y arqueas (Pappenheimer et al., 1983); estando ausente en el factor de eubacterias. Distintos experimentos con mutantes puntuales en el residuo de histidina sustrato de la diftamidación, así como con mutantes de deleción en la ruta de modificación post-traducciona de la histidina hasta diftamida, han demostrado que el residuo de diftamida no es esencial para la función de eEF2 (Chen et al., 1985; Liu et al., 2004; Phan et al., 1993). No obstante, también se ha descrito que determinadas mutaciones de este residuo, disminuyen o inhiben el crecimiento celular (Kimata and Kohno, 1994; Phan et al., 1993). Este menor crecimiento es debido, al menos en parte, a una menor tasa de translocación, ya que en la levadura el mutante *H699N* es sensible a compuestos inhibidores de la traducción y presenta una menor tasa de traducción (Ortiz et al., 2006), fenotipo compartido con el mutante dominante negativo *H699K* (Ortiz and Kinzy, 2005). Mutaciones en el residuo de histidina equivalente en el factor procarionta EF-G disminuyen la tasa de translocación en más de dos órdenes de magnitud (Savelsbergh et al., 2000).

La diftamida es la diana de toxinas bacterianas, como la exotoxina A (ETA) de *Pseudomonas aeruginosa*, la toxina diftérica de *Corynebacterium diphtheriae*, y una toxina recientemente identificada ("*cholix toxin*") producida por *Vibrio cholerae* (Jorgensen et al., 2008). Estas toxinas ADP-ribosilan el anillo imidazol de la diftamida en el eEF2, usando NAD⁺ como sustrato, provocando el bloqueo irreversible de la translocación de la síntesis de proteínas y, consecuentemente, la muerte de la célula (revisado por (Yates et al., 2006)); sin que afecten al factor de elongación de la bacteria patógena. Diversos trabajos han mostrado que mutaciones en el eEF2 que impiden la biosíntesis de diftamida generan resistencia a la toxina diftérica y a ETA (Chen et al., 1985; Foley et al., 1995; Moehring and Moehring, 1988; Moehring et al., 1980; Moehring et al., 1984).

Estudios de *cryo-EM* del eEF2 en complejo con el ribosoma han sugerido que el extremo del dominio IV, que incluye la diftamida, tiene un papel importante en la estabilización del emparejamiento codón-anticodón (Spahn et al., 2004).

8.- El Sitio de Unión de la Sordarina a eEF2

La sordarina actúa uniéndose al complejo eEF2•ribosoma, estabilizándolo en la forma post-translocacional (POST•eEF2•GDP) y, por tanto, deteniendo la elongación del péptido naciente (Justice et al., 1998; Justice et al., 1999; Dominguez et al., 1999). Estudios recientes de

cristalización han localizado el sitio de unión de la sordarina al eEF2 de *S. cerevisiae* en un “bolsillo molecular” entre los dominios III, IV y V (Jorgensen et al., 2003); una posición que coincide con los estudios genéticos de resistencia a sordarina realizados en esta levadura (Capa et al., 1998; Justice et al., 1998; Shastry et al., 2001). Estos estudios estructurales han revelado que la unión de la sordarina al eEF2 da lugar a cambios conformacionales importantes en los tres dominios C-terminales (III, IV y V). En particular, el dominio III rota con respecto a los dominios IV y V produciendo una reorientación de los dominios C-terminales con respecto a los dominios N-terminales. Se genera así una estructura mucho más abierta y extendida del complejo eEF2•sordarina, en comparación al eEF2 libre, y que se asemeja a la conformación que adquiere el eEF2 durante la translocación (Jorgensen et al., 2003) (ver el panel derecho de la Fig. 18b).

8.1- El Bolsillo de Unión de la Sordarina

En la unión de la sordarina a eEF2 intervienen los residuos Gln490, Ala562 y Phe798, formando puentes de hidrógeno con la misma (Fig. 21a). Muchos de los residuos que contactan con la sordarina están localizados en la zona de unión entre los dominios (“interdomain linkers”) (Fig. 21b), lo que podría explicar los grandes cambios conformacionales que ejerce la sordarina en eEF2. El bolsillo en el que se encuentra localizada la sordarina no está preformado en eEF2 libre (Fig. 21c), por tanto la unión de la droga a eEF2 es un ejemplo de “induced fit”. En dicho bolsillo hay una serie de residuos conservados que son importantes para la estabilización del complejo eEF2-sordarina. Dichos residuos actúan a modo de cierre del bolsillo, conteniendo a la sordarina cerca del dominio IV y uniendo los tres dominios C-terminales (Jorgensen et al., 2003) (Fig. 21b).

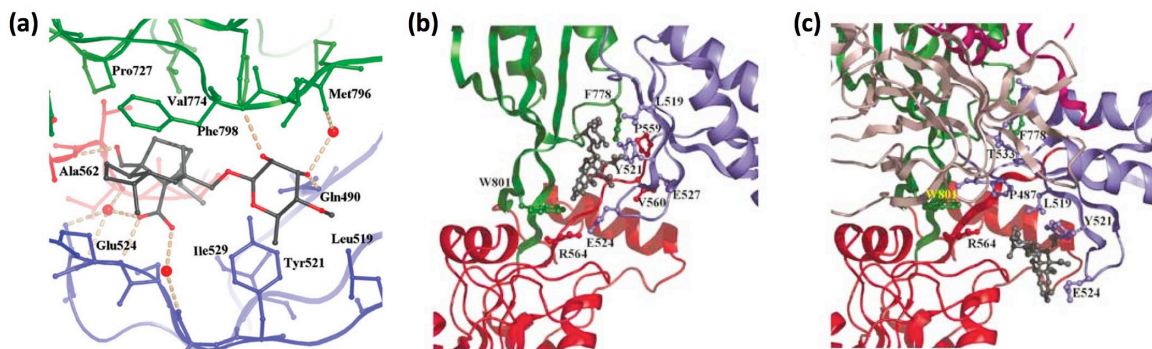


Figura de ((Jorgensen et al., 2003)

Figura 21. El bolsillo de unión a sordarina. **(a)** La sordarina (átomos de carbono en gris) se une a eEF2 en un bolsillo formado por residuos del dominio III (azul), dominio IV (rojo), y dominio V (en verde). Los residuos Glu490, Ala562, y Phe798 forman puentes de hidrógeno con la sordarina. Tres moléculas de agua (esferas rojas) también median los contactos entre la sordarina y eEF2. **(b)** El bolsillo de unión a sordarina (gris) entre los tres dominios C-terminales en la estructura de eEF2•sordarina. La interacción de los residuos Glu524, Arg564, y Trp801, así como el puente de hidrógeno entre Glu527 y Val560, son importantes para la estabilización de la sordarina. **(c)** El posible sitio de unión de la sordarina (gris) no está accesible en la estructura de eEF2 libre, ya que está ocupado por los residuos 486-489 y 532-534. Los residuos 519-524 del dominio III, importantes para la unión de sordarina, se encuentran desplazados del bolsillo de unión debido a la rotación del dominio III con respecto a los dominios IV y V. No obstante, estos residuos se encuentran accesibles en eEF2 libre y mantienen la misma conformación que en eEF2•sordarina.

La unión de la sordarina a eEF2 restringe, por tanto, el movimiento de los dominios C-terminales. Dicha unión impide, además, que se produzcan los movimientos completos del dominio G' y del extremo del dominio IV que acompañan a la hidrólisis de GTP, atrapando por tanto al ribosoma en un estado translocacional intermedio tras la hidrólisis del GTP (Sengupta et al., 2008). Aparentemente, la sordarina atrapa al factor de elongación 2 entre el estado unido a GTP (GDPNP) y el estado unido a GDP (AIF₄). Por tanto, es posible que, al contrario de lo que se pensaba, el complejo eEF2•ribosoma unido a sordarina no refleje exactamente el estado de post-hidrólisis de GTP (POST•eEF2•GDP) (Sengupta et al., 2008).

8.2- eEF2•Sordarina en el Contexto Ribosómico

Una de las claves del modo de acción de la sordarina parece estar en el cambio de conformación que adquiere el dominio III de eEF2, tanto en el complejo eEF2•sordarina (Jorgensen et al., 2003) (ver el panel derecho de la Fig. 18b) como en el complejo eEF2•ribosoma unido a sordarina; lo que le permite interactuar con el SRL de la LSU (Spahn et al., 2004). Dicha interacción no ha sido identificada en el complejo eEF2•GTP (GDPNP), ni en el eEF2•GDP (AIF₄) (Sengupta et al., 2008). Es posible, que el dominio III de eEF2 adquiera en el ribosoma una conformación parecida a la que adquiere en el ribosoma en presencia de sordarina. En este caso, al menos parte del coste energético del reordenamiento de los dominios de eEF2 sería asumido por la interacción eEF2•ribosoma, explicando así la mayor afinidad de la sordarina por eEF2 unido al ribosoma (Dominguez and Martin, 1998).

Así, se ha sugerido que la interacción entre el dominio III y el SRL en presencia de sordarina, que impide al dominio III apartarse del SRL tras la hidrólisis de GTP, tiene un papel crucial en el mecanismo de inhibición de la sordarina al evitar la disociación de eEF2 del ribosoma (Spahn et al., 2004). Datos del complejo eEF2•ribosoma con AIF₄ confirman la idea de que el dominio III de eEF2 sufre una reorientación que lo lleva a una posición inusual en el complejo con sordarina, de manera que se inhibe la disociación de eEF2 del ribosoma (Sengupta et al., 2008).

9.- Unión de Ribonucleótidos a eEF2

Recientemente, se ha descrito que la sordarina se puede unir a eEF2, tanto unido a GDP como unido a GTP (GDPN) (Taylor et al., 2007), aunque de momento se desconoce si esto ocurre *in vivo* y las posibles consecuencias a nivel fisiológico de dicha unión.

Experimentos *in vitro* indican que eEF2 se une a nucleótidos adenílicos en una zona diferente a la de unión a nucleótidos guanílicos, y que la sordarina puede desplazar tanto al ADP como al ATP del eEF2 (Soe et al., 2007). Estos datos sugieren que, o bien la sordarina solapa con el sitio de unión de ADP/ATP, o bien induce un cambio conformacional en el factor que impide la unión de ADP/ATP. En cualquier caso, se ignora la función biológica de la posible unión de nucleótidos de adenina al eEF2.

Otros autores han descrito que, en presencia de ATP, eEF2 induce *in vitro* la disociación del ribosoma 80S en sus subunidades, y que la sordarina impide dicha disociación y estimula la actividad ATPasa (Demeshkina et al., 2007).

A Chemical Genomic Screen in *Saccharomyces cerevisiae* Reveals a Role for Diphthamidation of Translation Elongation Factor 2 in Inhibition of Protein Synthesis by Sordarin^{∇†}

Javier Botet,^{1#} María Rodríguez-Mateos,² Juan P. G. Ballesta,²
José Luis Revuelta,¹ and Miguel Remacha^{2*}

Departamento de Microbiología y Genética, Instituto de Microbiología Bioquímica, CSIC and Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain,¹ and Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC and Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain²

Received 13 December 2007/Returned for modification 10 January 2008/Accepted 9 February 2008

Sordarin and its derivatives are antifungal compounds of potential clinical interest. Despite the highly conserved nature of the fungal and mammalian protein synthesis machineries, sordarin is a selective inhibitor of protein synthesis in fungal organisms. In cells sensitive to sordarin, its mode of action is through preventing the release of translation elongation factor 2 (eEF2) during the translocation step, thus blocking protein synthesis. To further investigate the cellular components required for the effects of sordarin in fungal cells, we have used the haploid deletion collection of *Saccharomyces cerevisiae* to systematically identify genes whose deletion confers sensitivity or resistance to the compound. Our results indicate that genes in a number of cellular pathways previously unknown to play a role in sordarin response are involved in its growth effects on fungal cells and reveal a specific requirement for the diphthamidation pathway of cells in causing eEF2 to be sensitive to the effects of sordarin on protein synthesis. Our results underscore the importance of the powerful genomic tools developed in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) to more comprehensively understanding the cellular mechanisms involved in the response to therapeutic agents.

Sordarin is a natural product originally isolated from *Sordaria araneosa*. A family of sordarin-related compounds has been described, all of them inhibiting cell growth by interfering with protein synthesis (6, 7). Even though there is a high degree of homology between the fungal and mammalian protein synthesis machineries, these inhibitors are highly specific for the fungal elongation step (24). Moreover, the sordarin derivatives display various levels of antifungal activity when tested against different species of fungi, with some of them being sensitive while others are resistant (15, 28).

Two proteins have been described as targets of sordarin and its derivatives, both involved in protein synthesis: translation elongation factor 2 (eEF2) (5, 7, 21) and the large ribosomal subunit protein rpP0 (13, 22). In the former target, characterization in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) of spontaneous resistant mutants along with site-directed mutagenesis has been used to identify residues 521, 523, and 524 as the most important amino acids in eEF2 involved in the binding of sordarin (41). Additional residues located at other sites in eEF2 have also been implicated in sordarin resistance (5, 21). Regarding *RPP0*, spontaneous resistant mutants have been isolated in the region from amino acid 137 to 144 (13, 22), and site-directed mutagenesis results also have implicated residues 119, 124, and

126 of rpP0 in sordarin resistance (39, 40). In any case, as sordarin directly binds to eEF2, this factor seems to be the primary target of the drug. However, since the ribosome strongly increases the affinity for the drug, the eEF2-ribosome complex must be considered as the functional target, where mutations in the stalk P0 protein must induce resistance through allosteric effects. These data suggest that the sordarin binding site seems to be quite susceptible to long-distance conformational changes.

Sordarin has been a valuable tool in analyzing some structural and functional aspects of the eukaryotic ribosome. Thus, it has been used in cryo-electron microscopy to visualize stalled ribosomes, associated with eEF2 (14, 42, 45). Moreover, it has facilitated the crystallization of eEF2 (19, 20), making it possible to dock the eEF2-sordarin X-ray structure in the molecular model of the yeast ribosome, revealing conformational changes within eEF2 in the ribosome which facilitate tRNA translocation (18, 42, 45).

Since mutants highly resistant to sordarin have been isolated only from strains with mutations in eEF2 and rpP0, these are probably the main targets involved in the inhibitory mechanism. However, the participation of additional proteins and pathways in the process cannot be ruled out. As an example, the remaining components of the ribosome stalk have been shown to be somehow involved in the sordarin mode of action, since in spontaneous mutants sordarin resistance is diminished by deletion of rpP1 α and rpP2 β (13). Due to the specificity of the sordarin mechanism of protein synthesis inhibition, any protein that affects this inhibition is expected to be involved, either directly or indirectly, in the translocation mechanism. Therefore, the search for these proteins could provide a way to identify new effectors of the translation process.

* Corresponding author. Mailing address: Centro de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 – Cantoblanco, Madrid, Spain. Phone: 91 196 4506. Fax: 91 196 4420. E-mail: miguel.remacha@uam.es.

Present address: Centro de Investigación del Cáncer, CSIC and Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain.

† Supplemental material for this article may be found at <http://aac.asm.org/>.

[∇] Published ahead of print on 19 February 2008.

The availability of a nearly complete set of gene deletion mutants of yeast (49) enables genome-wide screenings of null mutants for a variety of phenotypes. Screening the yeast “disruptome” has proved to be a useful high-throughput functional genomic tool to identify genes involved in responsiveness to drugs (27, 44) as well as other phenotypes. Although mutations in genes encoding components involved in the translocation process are plausible candidates to render cells resistant or sensitive to sordarin, it is likely that other mechanisms participate in the response. Microbial cells can resist the action of any drug by three main mechanisms: (i) modification of the target, (ii) inactivation of the drug, and (iii) changes in the permeability of cells to the compound (31). Since it is highly improbable that deletion of a yeast gene can result in the inactivation of sordarin, we would expect to isolate mutants whose resistance to this compound is due to one of the other two mechanisms. Using this yeast deletion collection, we performed a chemical genomic screen to identify the spectrum of genes whose deletion alters the fitness profile in the presence of sordarin. This analysis revealed that a wide range of gene functions is required to protect cells against sordarin cytotoxicity. Most strikingly, our results reveal a role for diphthamide modification of eEF2 in sordarin-mediated toxicity.

MATERIALS AND METHODS

Yeast strains and growth conditions. The collection of nonessential haploid *MATa* yeast deletion strains derived from parent strain BY4741 (*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*) was obtained from Euroscarf (Frankfurt, Germany; <http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/index.html>) in a 96-well plate format. The deletion strains were generated by the *Saccharomyces* Genome Deletion Project (http://www-sequence.stanford.edu/group/yeast_deletion_project/deletions3.html) by replacing the target gene with a *Kan^r* cassette, *KanMX4*, by means of a PCR-based gene disruption strategy (49).

Yeast strains were grown on standard rich medium (yeast-peptone-dextrose [YPD; 1% yeast extract, 2% Bacto peptone, 2% glucose]), synthetic minimal medium (SD; 0.17% yeast nitrogen base without amino acids, 0.5% ammonium sulfate, 2% glucose supplemented according to the requirements of the strains), and synthetic complete medium (SC; SD medium with 0.079% complete supplement mixture [ForMedium, Norwich, United Kingdom]). Glucose was replaced by 2% galactose and 1% raffinose when noted. All cultures were incubated at 28°C.

Spontaneous sordarin-resistant yeast mutants, the *fpr1-19* (S523T) (5) and *fpr2-17* (N138H, A140W double mutant) (13) mutants, were provided by GlaxoSmithKline.

Petite mutants derived from parent strain BY4741 were isolated after growth in the presence of ethidium bromide (12). As expected, these cells were not viable when glycerol or ethanol were used as a nonfermentable carbon source.

Growth assays for sordarin sensitivity and resistance. (i) **High-throughput sordarin sensitivity/resistance screens.** Approximately 4,800 haploid deletion strains in the BY4741 background were screened for sensitivity/resistance to sordarin in SC liquid medium. Strains were pinned from 96-well frozen stock plates by using a stainless steel 96-pin replicator (Nalgene Nunc International) into 96-well plates containing 150 μ l of liquid YPD medium supplemented with G418 (150 mg/liter; Gibco-BRL). The plates were incubated at 28°C for 3 days until they were confluent and then pin replicated onto liquid SC 96-well plates containing either no drug or sordarin derivative GM193663 (a gift from GlaxoSmithKline [15, 28]) at 2 ng/ml for sensitivity tests and 62.5 ng/ml for resistance. Plates were incubated at 28°C and growth was quantitatively scored every 24 h over a period of 5 days by optical density at 595 nm (OD_{595}) readings using a microplate reader spectrophotometer (model 550; Bio-Rad Laboratories). The sordarin sensitivity/resistance was scored on the basis of the relative growth of each mutant against that of the wild type in the same plate and with that of the mutant in the control plates, where no inhibitor was added. Putative sordarin-sensitive and -resistant strains identified during the screening of the yeast knockout collection were further retested at least in duplicate under the same conditions described for the screening. Validation was performed at 62.5 ng/ml, 125

ng/ml, and 500 ng/ml for resistance phenotype testing and at 2 ng/ml for sensitivity testing.

(ii) **Plate spotting test analysis.** Cultures grown in 96-well plates were resuspended using a 96-well plate shaker (Microtec; Infors AG), and four serial 10-fold dilutions in water were done. Five-microliter portions of the diluted cultures were spotted using a replica plater for a 96-well plate (Sigma-Aldrich) to OmnyTray plates (Nalgene Nunc International) containing SC solid medium. The plates were incubated at 28°C for 6 days and were imaged every 24 h.

Data analysis and functional group classification. To identify functional clusters of genes, statistical analysis of overrepresentation of functional categories affected by sordarin was performed by using Gene Ontology (GO) (2), functional annotations tools from FatiGo, FUNSPEC (<http://funspec.med.utoronto.ca/>) (36), the GO term finder at the *Saccharomyces* Genome Database (SGD) (<http://www.yeastgenome.org/>), and the MIPS functional catalogue (<http://mips.gsf.de/genre/proj/yeast>).

The gene classification was done subjectively, supported by SGD, the Yeast Proteome Database, and the Comprehensive Yeast Genome Database at MIPS as well as the literature. Microsoft Excel was used to further manipulate and analyze data.

Molecular biology and yeast genetics procedures. Recombinant DNA techniques were carried out using standard molecular biology protocols (38). For the induced expression of diphtheria toxin fragment A (DTA), plasmid pYEUra3-Gal1-DTA was constructed. The primers DTA-F (5'-AGGATCCATATGGCG CTGATGATGTTGTTGA-3') and DTA-R (5'-CAGTCGACTCGTCAGACA CGATTTCCTG-3') (restriction sites BamHI and SalI underlined) were used to amplify DTA (23) from plasmid pT7-7-DTA (a gift from the laboratory of R. J. Collier at Harvard Medical School). The amplified product was cloned in pGEM-T (Promega) vector and subsequently digested with BamHI and SalI and cloned in the expression plasmid pYEUra3 (Clontech) under the control of the *GAL1* promoter to yield the galactose expression-induced plasmid pYEUra3-DTA. Yeast transformations were performed by a modification of the standard lithium acetate/polyethylene glycol method (11).

The *dph3Δ* mutant was constructed by use of a PCR-based gene deletion strategy using the *KanMX6* marker, flanked by 40 bases of homology to the region upstream of the *DPH3* open reading frame, including the AUG, and 40 bases of homology to the region downstream of it, including the stop codon. The PCR product was integrated by homologous recombination, replacing the wild-type gene with the *Kan^r* marker by standard transformation of the parental strain BY4741. The deletion was confirmed by colony PCR of 10 geneticin-resistant transformant clones by use of primers DPH3-5' (upstream of the deleted *DPH3*) and *KanB* (within the *KanMX6* module).

Biochemical methods. (i) **Polyphenylalanine synthesis.** Ribosomes and S-100 fractions were prepared from cells grown in YPD medium to an OD_{600} of 0.4 (37). The procedure and experimental conditions for polyphenylalanine synthesis directed by poly(U) are described in reference 35.

(ii) **ADP ribosylation assays.** Exponentially ($OD_{600} = 0.6$) growing cells in YPD were collected, washed, and disrupted with sea sand in 1 volume of 80 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 12.5 mM $MgCl_2$, 5 mM 2-mercaptoethanol. S-100 extracts were prepared and sequentially precipitated with ammonium sulfate (37). The 30 to 70% fraction was resuspended in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM 2-mercaptoethanol, and the protein concentration was determined by Bradford assay (3). The ADP ribosylation reaction was performed in a reaction mix containing, in 100 μ l, 0.5 mg of yeast extract, 2 μ g of DTA, and 2 μ M [^{14}C]NADH (9.18 GBq/mmol; Amersham Biosciences). The reaction was carried out for 40 min at 30°C and terminated by adding 1 ml of 10% trichloroacetic acid. Incorporation of ADP-ribose into eEF-2 was measured as radioactivity present in 10% trichloroacetic acid precipitates.

(iii) **Sordarin binding.** The sordarin in vitro binding assays were performed as described elsewhere (13). Cell-free S-50 extracts were prepared from cells grown in YPD medium to an OD_{600} of 1.5. To perform the assays, 0.5 mg of protein from an S-50 fraction and 0.1 μ g of [3H]sordarin (36 kBq, 20 nmol; a gift from GlaxoSmithKline) were mixed in a final volume of 500 μ l. After 30 min of incubation at room temperature, 400 μ l from each sample were applied to a prepacked PD-10 Sephadex G-25 column (GE Healthcare) equilibrated with binding buffer (80 mM HEPES-KOH, pH 7.4, 10 mM $MgOAc$, 1 mM dithiothreitol). [3H]sordarin bound to macromolecules was measured by counting the radioactivity in the excluded fractions. The radioactivity counts obtained in the presence of 10 μ g of cold sordarin were subtracted from all the data points. In addition, this radioactivity was corrected by the amount of eEF2 present in each sample (see “Electrophoretic methods” below).

Electrophoretic methods. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis was performed as described previously (38). Proteins transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon; Millipore) were treated either

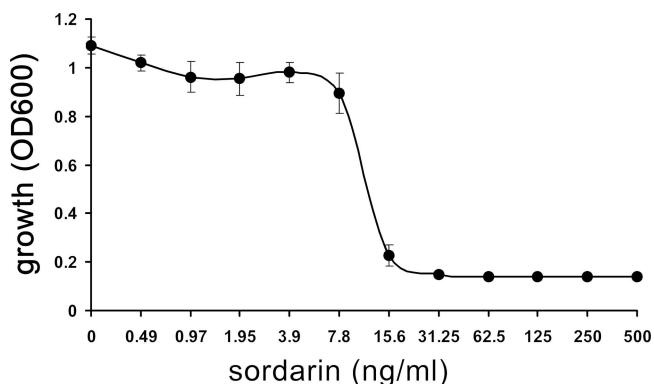


FIG. 1. Sordarin growth inhibition curve. *Saccharomyces cerevisiae* strain BY1741 was grown overnight in SC and then inoculated in microtiter plates with 200 μ l of the same medium containing successive twofold dilutions of sordarin, starting at 500 ng/ml. Growth was monitored for each condition by incubating the culture at 30°C over a 72-h period.

with polyclonal antibodies prepared against eEF2 or monoclonal antibody 3BH5 against the ribosomal protein P0 (48), and Western blots were developed with enhanced chemiluminescence. Densitometry of the films was processed using the software ImageJ 1.38x. The relative amount of eEF2 in each sample was normalized using the signal due to rpP0.

RESULTS

High-throughput sordarin phenotypic screen of a yeast knockout collection. The availability of a genome-wide set of *S. cerevisiae* deletion mutants (10, 49) makes it possible to identify nearly all the nonessential genes that could alter the yeast sordarin sensitivity and, consequently, that might be related to its mode of action. In order to identify these genes, the complete set of isogenic nonessential haploid yeast deletion mutants for putative open reading frames larger than 300 nucleotides was screened for their ability to grow in the presence of different concentrations of the sordarin derivative GM193663.

The screening was initiated by testing sordarin for the ability to inhibit growth in the yeast strain BY4741. Based on the results of a growth curve analysis in SC medium with a broad range of sordarin concentrations (0 to 500 ng/ml) (Fig. 1), the primary screening for hypersensitive mutants was performed at a semi-inhibitory concentration of sordarin (2 ng/ml), while for resistant mutants a drug concentration (62.5 ng/ml) that severely inhibited growth of the wild type in SC medium was used. Nine mutants that were repeatedly unable to grow at 2 ng/ml of sordarin (see Table S1 in the supplemental material) and 104 mutants showing enhanced resistance to this compound (see Table S2 in the supplemental material) were identified. Out of these, 58 mutants were able to grow at very high concentrations of the drug (500 ng/ml), and therefore they were considered as superresistant.

Analysis of sordarin-resistant mutants. The main cluster of the 104 genes (see Table S2 in the supplemental material), which when deleted induced resistance to 62.5 ng/ml of sordarin, is primarily involved in protein metabolism (39 out of 104 genes, or 37.5%), which is consistent with the known role of the drug as a protein synthesis inhibitor. According to GO at SGD, strains representing deletions of genes with functions in

mitochondria (28 out of 104 genes, or 26.9%) and ribosomes (17 out of 104 genes, or 16.3%) were overrepresented among the sordarin-resistant set.

The relatively large proportion of resistant mutants that have mitochondrial defects raised the question as to whether this organelle as a whole is somehow related to sordarin function. To test this possibility, the response to sordarin of *petite* strains derived from *S. cerevisiae* BY4741 by ethidium bromide treatment was tested. However, no significant difference was detected in their sensitivity to the drug compared with that of the parental strain (see Fig. S1 in the supplemental material).

Implication of diphthamide synthesis in sordarin resistance. The most striking feature in the sordarin-resistant screen was the significant overrepresentation of strains deleted for genes directly involved in peptidyl-diphthamide metabolism. Diphthamidation is a specific posttranslational modification of eEF2 unique for this protein (47). The biosynthesis of diphthamide is accomplished by stepwise enzymatic additions to the His699 residue of eEF2, due to the action of five proteins, Dph1p to Dph5p, and a still-unidentified amidating enzyme (26, 29, 30). We identified mutants with deletions in four out of the corresponding genes (*DPH1*, *DPH2*, *DPH4*, and *DPH5*) in the sordarin-resistant set, with the *dph1* Δ , *dph2* Δ , and *dph5* Δ mutants being among the most resistant subset (see Table S2 in the supplemental material). The strain lacking *DPH3* was not present in the deletion mutant collection, as this open reading frame is smaller than 300 nucleotides. Therefore, a strain with a knockout of this gene was generated as detailed in Materials and Methods and tested for sordarin resistance, together with the remaining *dph* Δ mutants, in a serial dilution spot test of growth. All the *dph* Δ mutants grew in the presence of 100 ng/ml of GM193663, a concentration that totally inhibited the growth of the parental strain (Fig. 2A). No differences were observed between *MATa* and *MAT α* yeast cells (data not shown). As the *dph3* Δ mutant seemed to grow slower than the remaining mutants on agar plates both in the absence and in the presence of sordarin, we performed a growth inhibition curve in liquid medium in order to have a more accurate estimation of the relative resistance level. The results shown in Fig. 2B indicate that all *dph1* Δ to *dph5* Δ mutants have similar 50% inhibitory concentration values, in the range of 300 to 500 ng/ml of sordarin, suggesting a relationship between eEF2 diphthamidation and sordarin resistance.

***dph* Δ sordarin-resistant strains are insensitive to diphtheria toxin.** We first wanted to confirm that, as expected, eEF2 is not diphthamidated in the selected *dph* Δ sordarin-resistant strains, testing their response to diphtheria toxin (26). We expressed in these strains the DTA under the control of the inducible *GAL1* promoter in plasmid pYEUr-Gal1-DTA. As shown in Fig. 3, the five *dph* Δ strains were resistant to DTA. Moreover, none of the *dph* Δ strains ADP ribosylate the factor when they were tested in a diphtheria toxin-dependent eEF2 ADP ribosylation assay from [¹⁴C]NADH (Table 1).

***dph* Δ mutants show resistance to sordarin inhibition of protein synthesis.** The preceding results indicated that yeast cells in which *DPH1-5* genes are deleted express a nondiphthamidated eEF2 and, as a consequence, are highly resistant to diphtheria toxin and moderately resistant to sordarin. Additional evidence supporting that this higher sordarin resistance is related to protein synthesis was provided by *in vitro* inhibi-

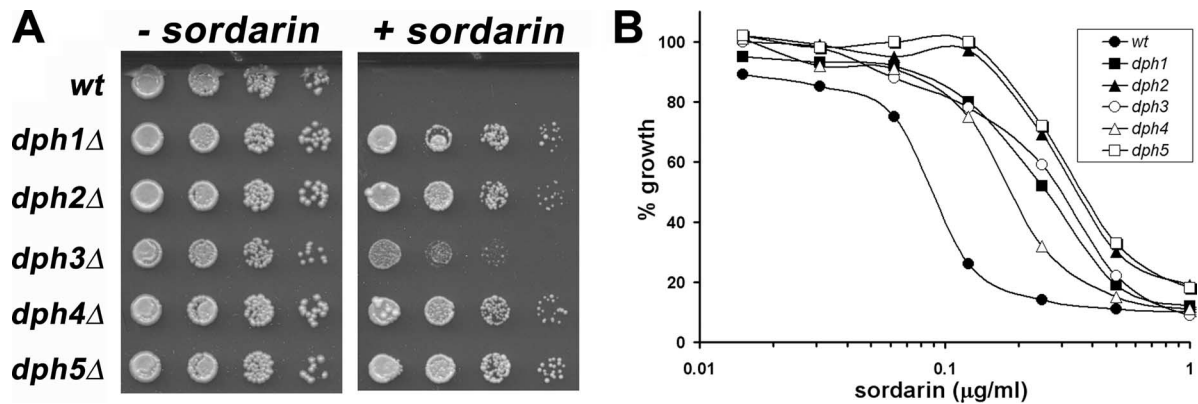


FIG. 2. *DPH1* to *DPH5* are required for sordarin sensitivity. (A) Plate assay. Drops containing 10^5 cells and 10-fold dilutions of the indicated yeast strains were spotted on SC plates containing glucose in the absence or presence of 100 ng/ml of sordarin. (B) Liquid growth assay. The indicated yeast mutant strains were grown overnight in YPD medium in flasks and then inoculated in microtiter YPD plates containing 200 μ l YPD with or without different amounts of sordarin. Under these conditions, 100% growth corresponds to an OD_{600} of 1.1. The relative growth after incubation for 24 h at 30°C in the presence versus the absence of the drug is represented as the mean of three independent experiments. wt, wild type.

tion of protein synthesis tests in extracts of the mutants. As shown in Fig. 4, the *dph* Δ mutants show a higher 50% inhibitory concentration than the wild type, confirming that the absence of diphthamide is directly related to a higher resistance of the translation machinery to sordarin. Among the five mutants, the behavior of the *dph3* Δ mutant is slightly different, as its sensitivity in this test is halfway between that of the wild type and those of the remaining *dph* Δ mutants.

Binding of [3 H]sordarin to yeast extracts of *dph* Δ mutants. We wondered whether sordarin resistance linked to the absence of diphthamide in eEF2 is associated with effects on the binding of the drug to the factor. Spontaneous mutations in eEF2 that confer resistance to sordarin have been explained by

the inability of sordarin to bind to the mutant eEF2 (7, 21). This can be observed in Fig. 5A, in the case of the *fpr1-19* mutant, which carries an S523T mutation in eEF2 that abolishes drug binding, indicating that the factor is the only macromolecular target of sordarin. Nevertheless, spontaneous sordarin-resistant mutations have been observed for other genes such as *RPP0*, in which sordarin binding to the factor is not completely abolished (see results in Fig. 5A for the *fpr2-17* strain, which carries a double mutation, N139H A140W, in ribosomal protein P0), although this binding does not seem to affect the function of the factor during translocation (13). We then performed binding assays of radioactive sordarin to yeast extracts derived from the *dph* Δ mutants (Fig. 5B). The bound radioactivity was normalized taking into account the amount of eEF2, the unique target of the drug, which was estimated by Western blotting using specific antibodies against this factor and also ribosomal protein P0 used as a loading control (Fig. 5C). As shown in Fig. 5B, all *dph* Δ extracts can bind sordarin to 60 to 80% of the level seen for the wild type.

DISCUSSION

To gain insights into the sordarin mode of action and to reveal possible resistance mechanisms of yeast to this antifungal, we performed a chemical genomics screen of the haploid yeast deletion mutant collection.

Deletion of nine genes has been found to induce hypersen-

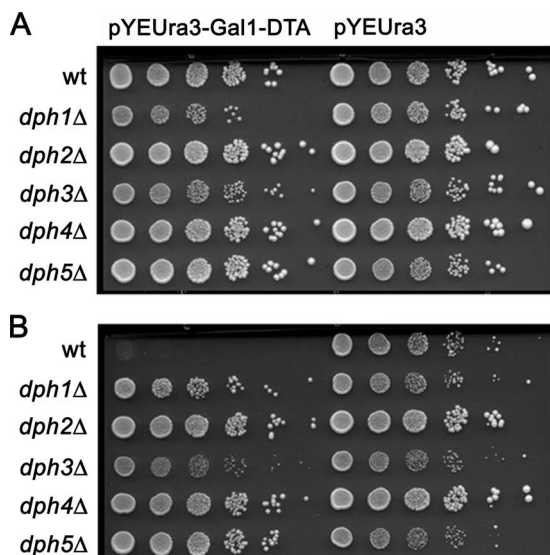


FIG. 3. *DPH1* to *DPH5* are required for diphtheria toxin sensitivity. The indicated yeast strains transformed with either plasmid pYEura3 or pYEura3-Gal1-DTA were grown in SD medium. Drops containing 10^5 cells and 10-fold dilutions were spotted on SC plates containing glucose (A) or galactose plus raffinose (B) as a carbon source and incubated at 28°C for 3 days. wt, wild type.

TABLE 1. ADP ribosylation of *dph* Δ mutants

Strain	[14 C]ADP incorporated (dpm/mg)
Wild type	40,512
<i>dph1</i> Δ mutant	38
<i>dph2</i> Δ mutant	123
<i>dph3</i> Δ mutant	526
<i>dph4</i> Δ mutant	242
<i>dph5</i> Δ mutant	345

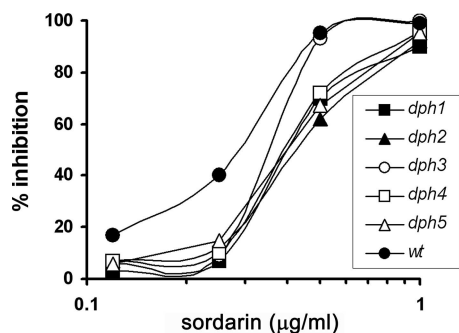


FIG. 4. Polyphenylalanine synthesis inhibition. Ribosomes and S100 fractions from the indicated strains were prepared as indicated in Materials and Methods. Poly(U)-directed in vitro translation with a cell-free system from each strain was performed in the absence or presence of different concentrations of sordarin. The percentage of inhibition of a representative experiment is shown, where the uninhibited synthesis rate was 6.4 pmol of phenylalanine polymerized per pmol of ribosomes. wt, wild type.

sitivity to the drug. Most of them encode mitochondrial proteins (*ATP1*, *ATP12*, *AFG3*, *SSQ1*, and *HEM14*). Deletants for all these genes are unable to grow in a nonfermentable carbon source (43). Therefore, there seems to be a relationship between respiratory defects and sordarin sensitivity.

The number of identified sordarin-resistant strains is rather large (see Table S2 in the supplemental material). Some of the identified genes also encode mitochondrial proteins that can be related to processes that could affect the drug transport if this process is energy dependent. However, this does not seem to be the case, as the sensitivity to sordarin of petite strains is not different from that of the wild-type strain. Deletion of genes coding for proteins involved in cell wall organization might also inhibit drug transport. Unfortunately, it is difficult to relate most of the identified genes with the transport pro-

cesses, and presently their relationship with sordarin resistance is not understood.

A number of the genes that we identified in our screen can be directly related to the sordarin target, namely, those encoding either ribosomal proteins or components of the diphthamide biosynthesis pathway. Seven ribosomal protein genes are found in this group, five of them encoding mitochondrial proteins. Since the prokaryote-type mitochondrial translation system is presumed insensitive to sordarin, it must be assumed that the detected effects are not directly related to their role as components of the sordarin target. Cytoplasmic ribosomal protein L12 is encoded by two gene copies, and deletion of the B copy results in about a 70% increase in the cell doubling time and a proportional reduction in the cellular content of rpL12 (4). Protein L12 binds closely to P0, forming the stalk base, and therefore the effect of its absence on sordarin interaction is not unexpected, as the absence of this protein in the stalk base may affect the interaction of eEF2 with the ribosome. While it is certainly surprising that only deletants in the *RPL12B* copy, and not in *RPL12A*, were found during the screening, this result provides an additional evidence confirming differences between the functional roles of ribosomal protein paralogs (25). Similarly to RPL12, ribosomal protein L1 is also encoded by two gene copies, and the disruption of the B copy results in a 100% doubling time increase (34). The effect of protein L1 on sordarin resistance is perhaps more surprising due to its location in the lateral protuberance at the opposite side of the stalk in the ribosomal 60S subunit (42). However, L1 with the aid of eEF3 is directly involved in the release of the deacylated tRNA from the ribosome (1, 46), and it cannot be ruled out that when the availability of L1 is reduced, the complete translocation process is slowed down, and an effect on the eEF2 conformation or the binding to the ribosome takes place, which affects the sordarin interaction. Alternatively, L1 ab-

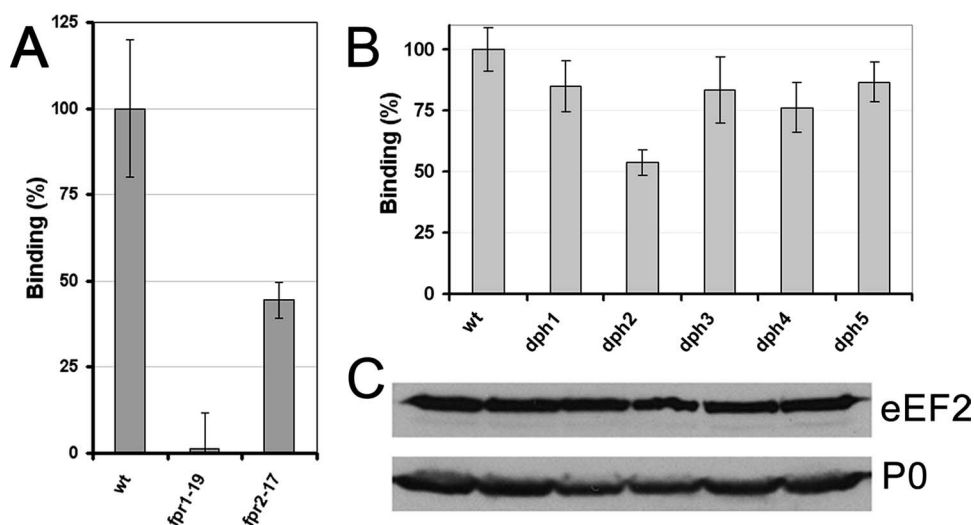


FIG. 5. [³H]sordarin binding to macromolecules in cell extracts. (A) Fifty-microgram portions of cell-free S-50 extracts from the wild type and spontaneously obtained sordarin-resistant yeast mutants *fpr1-19* and *fpr2-17* were assayed for the binding of radioactive [³H]sordarin. (B) S-50 extracts from the wild-type and *dphΔ* strains were assayed for the binding of radioactive sordarin. Binding was normalized to the amount of eEF2, as quantified by Western blotting with antibodies against the factor. (C) Western blotting against the ribosomal protein P0 was also done as a loading control. wt, wild type.

sence may lead to more-efficient eEF2 release from the ribosome, and therefore cells are less sordarin sensitive.

We also identified genes of unknown function, and these deserve further analysis that can provide information on their possible function. Among these, *YLR043w* has properties that could relate the encoded protein with ribosomal activities. Thus, besides having an ATP-binding region and a chorismate mutase-like domain, this cytoplasmic protein contains an endoribonuclease L-PSP domain. A rat liver protein with this domain has been described as an inhibitor of protein synthesis due to its single-stranded RNA endoribonuclease activity (32). It is therefore tempting to speculate that in the absence of this protein the conformation of the eEF2-ribosome complex might have a diminished affinity for sordarin.

The most interesting conclusion of this study is, however, the clear relationship between EF2 diphthamidation and sordarin activity. The following different evidences are presented indicating that diphthamide is involved in the mechanism of sordarin inhibition: (i) the growth of *dphΔ* mutants in the presence of inhibitory concentrations of the drug, (ii) the lower sensitivity to sordarin of in vitro cell-free translation systems derived from these mutants, and (iii) the reduced sordarin binding to cell extracts derived from *dphΔ* mutants. Altogether, the results strongly suggest that the binding of sordarin to the complex between the 80S ribosome and eEF2 is significantly weaker when the factor is not diphthamidated, thus offering an explanation for the observed resistance of strains defective in the diphthamide biosynthesis pathway. Interestingly, while mutations of His699 of eEF2 show a higher sensitivity to translational inhibitors (33), the strains carrying deletions in genes *DPH2* or *DPH5* do not confer sensitivity to the translation inhibitors cycloheximide and hygromycin B (33). With the exception of the *dph3Δ* mutant (see below), we have preliminary results extending this observation to the remaining *dphΔ* mutants (data not shown), highlighting the specificity of the connection between sordarin sensitivity and the diphthamidation of eEF2.

It is interesting that not all the *dphΔ* mutants behave similarly with respect to sordarin activity, suggesting that the various intermediates in the synthesis can affect the eEF2 response differently. In this respect, *dph3Δ* mutants have especially interesting peculiarities. These are remarkable considering that Dph1 to Dph4 proteins are involved in the first step of diphthamide synthesis, that is, the transfer of the 3-amino-3-carboxypropyl group of *S*-adenosylmethionine to the imidazole C-2 of the precursor histidine residue (26). While the overall in vivo sordarin resistance levels are similar, the in vitro protein synthesis in *dph3Δ* extracts is more sensitive to the drug than are those for the remaining *dphΔ* mutants. In addition, the growth rate of mutants lacking *DPH1*, *DPH2*, *DPH4*, and *DPH5* is largely indistinguishable from that of the wild type in the absence of sordarin, while *dph3Δ* mutants show a slow-growth phenotype. Moreover, there are reports indicating that *dph3Δ* mutants also show drug and temperature hypersensitivity not described for the remaining *dphΔ* mutants (9, 26) (our unpublished data). These differences may be due to the involvement of Dph3p in regulating the functions of the Elongator complex, the well-recognized target of zymocin (8, 16). Both Dph3p and the Elongator complex have been shown to be required for posttranscriptional modification of uridine in

tRNAs at the wobble position of the anticodon (16, 17). The absence of these modifications in the *dph3Δ* mutant and not in the other *dphΔ* mutants could account for the observed differences in sordarin resistance.

The mechanism by which diphthamide modification affects sordarin inhibition is not obvious, since residue H699 and the sordarin binding site are far away from each other in the eEF2 crystal structure (19, 20). While the binding site for sordarin on eEF2 is a pocket located between domains III, IV, and V (19), diphthamide has been mapped in the tip of domain IV in eEF2, protruding into the solvent, with no flexible elements spanning the two sites (20). In addition, cryo-electron microscopy maps of 80S-bound ADP-ribosylated eEF2-GDPNP or eEF2-GDPNP-sordarin do not support a conformational change in the factor due to the binding of sordarin (45). Additionally, it must be mentioned that some sordarin-resistant mutations in eEF2 have been mapped far from the sordarin binding site. These have been reported in residues R180/V187 (domain I), A475 (domain II), F612 (domain IV), and G790 (domain V) (5, 21), thus demonstrating that regions of eEF2 that are located relatively far from the binding site can affect the sordarin inhibitory action. In all these cases, the ribosome is probably playing an important role. Taken together, our results indicate that, modulated by the ribosomal particle, the absence of diphthamide has a long-range effect in eEF2, such that it decreases the affinity of sordarin for the ribosome-bound eEF2.

In sum, this is the first study identifying the diphthamide biosynthetic pathway as an effector of sordarin resistance. Collectively, the mutants uncovered by this screen represent a valuable collection of candidate genes, whose further investigation in the future may help to define additional cellular pathways participating in the responses of cells to sordarin treatment. Genes whose deletions scored as sensitive mutants in our screen may represent possible targets for the generation of novel sordarin derivatives. The identification of a set of genes whose loss of function leads to enhanced sordarin resistance in yeast may also provide avenues to investigate the orthologs of these targets in pathogenic fungal species, leading also to new opportunities for antifungal therapies.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank M. C. Fernández Moyano for expert technical assistance. We also thank GlaxoSmithKline for providing yeast mutants and sordarin derivatives and R. J. Collier for the plasmid expressing DTA.

This work was supported by grants GEN2001-4707-C08-01, AGL2005-07245-C03-03 (to J.L.R.), BMC2003-03387 (to J.P.G.B.), and BFU2004-03079 (to M.R.) from the Ministerio de Educación y Ciencia, Spain and by an institutional grant to the Centro de Biología Molecular Severo Ochoa from the Fundación Ramón Areces. M.R.-M. and J.B. were recipients of fellowships from the Ministerio de Educación y Ciencia and the Junta de Castilla y León, respectively.

REFERENCES

- Andersen, C. B., T. Becker, M. Blau, M. Anand, M. Halic, B. Balar, T. Mielke, T. Boesen, J. S. Pedersen, C. M. Spahn, T. G. Kinzy, G. R. Andersen, and R. Beckmann. 2006. Structure of eEF3 and the mechanism of transfer RNA release from the E-site. *Nature* **443**:663–668.
- Ashburner, M., C. A. Ball, J. A. Blake, D. Botstein, H. Butler, J. M. Cherry, A. P. Davis, K. Dolinski, S. S. Dwight, J. T. Eppig, M. A. Harris, D. P. Hill, L. Issel-Tarver, A. Kasarskis, S. Lewis, J. C. Matise, J. E. Richardson, M. Ringwald, G. M. Rubin, G. Sherlock, et al. 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. *Nat. Genet.* **25**:25–29.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of

- microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248–254.
4. Briones, E., C. Briones, M. Remacha, and J. P. Ballesta. 1998. The GTPase center protein L12 is required for correct ribosomal stalk assembly but not for *Saccharomyces cerevisiae* viability. *J. Biol. Chem.* **273**:31956–31961.
 5. Capa, L., A. Mendoza, J. L. Lavandera, F. Gomez de las Heras, and J. F. Garcia-Bustos. 1998. Translation elongation factor 2 is part of the target for a new family of antifungals. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:2694–2699.
 6. Dominguez, J. M., V. A. Kelly, O. S. Kinsman, M. S. Marriott, F. Gomez de las Heras, and J. J. Martin. 1998. Sordarins: a new class of antifungals with selective inhibition of the protein synthesis elongation cycle in yeasts. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:2274–2278.
 7. Dominguez, J. M., and J. J. Martin. 1998. Identification of elongation factor 2 as the essential protein targeted by sordarins in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:2279–2283.
 8. Fichtner, L., D. Jablonowski, A. Schierhorn, H. K. Kitamoto, M. J. Stark, and R. Schaffrath. 2003. Elongator's toxin-target (TOT) function is nuclear localization sequence dependent and suppressed by post-translational modification. *Mol. Microbiol.* **49**:1297–1307.
 9. Fichtner, L., and R. Schaffrath. 2002. *KTII1* and *KTII3*, *Saccharomyces cerevisiae* genes controlling sensitivity to G1 arrest induced by *Kluyveromyces lactis* zymocin. *Mol. Microbiol.* **44**:865–875.
 10. Giaever, G., A. M. Chu, L. Ni, C. Connelly, L. Riles, S. Veronneau, S. Dow, A. Lucau-Danila, K. Anderson, B. Andre, A. P. Arkin, A. Astromoff, M. El-Bakkoury, R. Bangham, R. Benito, S. Brachat, S. Campanaro, M. Curtiss, K. Davis, A. Deutschbauer, K. D. Entian, P. Flaherty, F. Foury, D. J. Garfinkel, M. Gerstein, D. Gotte, U. Guldener, J. H. Hegemann, S. Hempel, Z. Herman, D. F. Jaramillo, D. E. Kelly, S. L. Kelly, P. Kotter, D. LaBonte, D. C. Lamb, N. Lan, H. Liang, H. Liao, L. Liu, C. Luo, M. Lussier, R. Mao, P. Menard, S. L. Ooi, J. L. Revuelta, C. J. Roberts, M. Rose, P. Ross-Macdonald, B. Scherens, G. Schimmack, B. Shafer, D. D. Shoemaker, S. Sookhai-Mahadeo, R. K. Storms, J. N. Strathern, G. Valle, M. Voet, G. Volckaert, C. Y. Wang, T. R. Ward, J. Wilhelmy, E. A. Winzler, Y. Yang, G. Yen, E. Youngman, K. Yu, H. Bussey, J. D. Boeke, M. Snyder, P. Philippsen, R. W. Davis, and M. Johnston. 2002. Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* **418**:387–391.
 11. Gietz, R. D., and R. A. Woods. 2002. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol.* **350**:87–96.
 12. Goldring, E. S., L. I. Grossman, D. Krupnick, D. R. Cryer, and J. Marmur. 1970. The *petite* mutation in yeast. Loss of mitochondrial deoxyribonucleic acid during induction of petites with ethidium bromide. *J. Mol. Biol.* **52**:323–335.
 13. Gomez-Lorenzo, M. G., and J. F. Garcia-Bustos. 1998. Ribosomal P-protein stalk function is targeted by sordarin antifungals. *J. Biol. Chem.* **273**:25041–25044.
 14. Gomez-Lorenzo, M. G., C. M. Spahn, R. K. Agrawal, R. A. Grassucci, P. Penczek, K. Chakraborty, J. P. Ballesta, J. L. Lavandera, J. F. Garcia-Bustos, and J. Frank. 2000. Three-dimensional cryo-electron microscopy localization of eEF2 in the *Saccharomyces cerevisiae* 80S ribosome at 17.5 Å resolution. *EMBO J.* **19**:2710–2718.
 15. Herreros, E., C. M. Martinez, M. J. Almela, M. S. Marriott, F. G. De Las Heras, and D. Gargallo-Viola. 1998. Sordarins: in vitro activities of new antifungal derivatives against pathogenic yeasts, *Pneumocystis carinii*, and filamentous fungi. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:2863–2869.
 16. Huang, B., M. J. Johansson, and A. S. Bystrom. 2005. An early step in wobble uridine tRNA modification requires the Elongator complex. *RNA* **11**:424–436.
 17. Jablonowski, D., S. Zink, C. Mehlgarten, G. Daum, and R. Schaffrath. 2006. tRNAGlu wobble uridine methylation by Trm9 identifies Elongator's key role for zymocin-induced cell death in yeast. *Mol. Microbiol.* **59**:677–688.
 18. Jorgensen, R., A. R. Merrill, S. P. Yates, V. E. Marquez, A. L. Schwan, T. Boesen, and G. R. Andersen. 2005. Exotoxin A-eEF2 complex structure indicates ADP ribosylation by ribosome mimicry. *Nature* **436**:979–984.
 19. Jorgensen, R., P. A. Ortiz, A. Carr-Schmid, P. Nissen, T. G. Kinzy, and G. R. Andersen. 2003. Two crystal structures demonstrate large conformational changes in the eukaryotic ribosomal translocase. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **10**:379–385.
 20. Jorgensen, R., S. P. Yates, D. J. Teal, J. Nilsson, G. A. Prentice, A. R. Merrill, and G. R. Andersen. 2004. Crystal structure of ADP-ribosylated ribosomal translocase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **279**:45919–45925.
 21. Justice, M. C., M. J. Hsu, B. Tse, T. Ku, J. Balkovec, D. Schmatz, and J. Nielsen. 1998. Elongation factor 2 as a novel target for selective inhibition of fungal protein synthesis. *J. Biol. Chem.* **273**:3148–3151.
 22. Justice, M. C., T. Ku, M. J. Hsu, K. Carniol, D. Schmatz, and J. Nielsen. 1999. Mutations in ribosomal protein L10e confer resistance to the fungal-specific eukaryotic elongation factor 2 inhibitor sordarin. *J. Biol. Chem.* **274**:4869–4875.
 23. Killeen, K. P., V. Escuyer, J. J. Mekalanos, and R. J. Collier. 1992. Reversion of recombinant toxoids: mutations in diphtheria toxin that partially compensate for active-site deletions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:6207–6209.
 24. Kinsman, O. S., P. A. Chalk, H. C. Jackson, R. F. Middleton, A. Shuttleworth, B. A. Rudd, C. A. Jones, H. M. Noble, H. G. Wildman, M. J. Dawson, C. Stylli, P. J. Sidebottom, B. Lamont, S. Lynn, and M. V. Hayes. 1998. Isolation and characterisation of an antifungal antibiotic (GR135402) with protein synthesis inhibition. *J. Antibiot.* **51**:41–49.
 25. Komili, S., N. G. Farny, F. P. Roth, and P. A. Silver. 2007. Functional specificity among ribosomal proteins regulates gene expression. *Cell* **131**:557–571.
 26. Liu, S., G. T. Milne, J. G. Kuremsky, G. R. Fink, and S. H. Leppla. 2004. Identification of the proteins required for biosynthesis of diphthamide, the target of bacterial ADP-ribosylating toxins on translation elongation factor 2. *Mol. Cell. Biol.* **24**:9487–9497.
 27. Mager, W. H., and J. Winderickx. 2005. Yeast as a model for medical and medicinal research. *Trends Pharmacol. Sci.* **26**:265–273.
 28. Martinez, A., P. Aviles, E. Jimenez, J. Caballero, and D. Gargallo-Viola. 2000. Activities of sordarins in experimental models of candidiasis, aspergillosis, and pneumocystosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:3389–3394.
 29. Mattheakis, L. C., W. H. Shen, and R. J. Collier. 1992. *DPH5*, a methyltransferase gene required for diphthamide biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **12**:4026–4037.
 30. Mattheakis, L. C., F. Sor, and R. J. Collier. 1993. Diphthamide synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: structure of the *DPH2* gene. *Gene* **132**:149–154.
 31. McDermott, P. F., R. D. Walker, and D. G. White. 2003. Antimicrobials: modes of action and mechanisms of resistance. *Int. J. Toxicol.* **22**:135–143.
 32. Morishita, R., A. Kawagoshi, T. Sawasaki, K. Madin, T. Ogasawara, T. Oka, and Y. Endo. 1999. Ribonuclease activity of rat liver perchloric acid-soluble protein, a potent inhibitor of protein synthesis. *J. Biol. Chem.* **274**:20688–20692.
 33. Ortiz, P. A., R. Ulloque, G. K. Kihara, H. Zheng, and T. G. Kinzy. 2006. Translation elongation factor 2 anticodon mimicry domain mutants affect fidelity and diphtheria toxin resistance. *J. Biol. Chem.* **281**:32639–32648.
 34. Petitjean, A., N. Bonneaud, and F. Lacroute. 1995. The duplicated *Saccharomyces cerevisiae* gene *SSM1* encodes a eucaryotic homolog of the eubacterial and archaeobacterial L1 ribosomal proteins. *Mol. Cell. Biol.* **15**:5071–5081.
 35. Remacha, M., A. Jimenez-Diaz, B. Bermejo, M. A. Rodriguez-Gabriel, E. Guarinos, and J. P. Ballesta. 1995. Ribosomal acidic phosphoproteins P1 and P2 are not required for cell viability but regulate the pattern of protein expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **15**:4754–4762.
 36. Robinson, M. D., J. Grigull, N. Mohammad, and T. R. Hughes. 2002. FunSpec: a web-based cluster interpreter for yeast. *BMC Bioinformatics* **3**:35.
 37. Rodriguez-Gabriel, M. A., M. Remacha, and J. P. Ballesta. 1998. Phosphorylation of ribosomal protein P0 is not essential for ribosome function but can affect translation. *Biochemistry* **37**:16620–16626.
 38. Sambrook, J., and D. W. Russell. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
 39. Santos, C., and J. P. Ballesta. 2002. Role of the ribosomal stalk components in the resistance of *Aspergillus fumigatus* to the sordarin antifungals. *Mol. Microbiol.* **43**:227–237.
 40. Santos, C., M. A. Rodriguez-Gabriel, M. Remacha, and J. P. G. Ballesta. 2004. Ribosomal P0 protein domain involved in selectivity of antifungal sordarin derivatives. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:2930–2936.
 41. Shastry, M., J. Nielsen, T. Ku, M. J. Hsu, P. Liberator, J. Anderson, D. Schmatz, and M. C. Justice. 2001. Species-specific inhibition of fungal protein synthesis by sordarin: identification of a sordarin-specificity region in eukaryotic elongation factor 2. *Microbiology* **147**:383–390.
 42. Spahn, C. M., M. G. Gomez-Lorenzo, R. A. Grassucci, R. Jorgensen, G. R. Andersen, R. Beckmann, P. A. Penczek, J. P. Ballesta, and J. Frank. 2004. Domain movements of elongation factor eEF2 and the eukaryotic 80S ribosome facilitate tRNA translocation. *EMBO J.* **23**:1008–1019.
 43. Steinmetz, L. M., C. Scharfe, A. M. Deutschbauer, D. Mokranjac, Z. S. Herman, T. Jones, A. M. Chu, G. Giaever, H. Prokisch, P. J. Oefner, and R. W. Davis. 2002. Systematic screen for human disease genes in yeast. *Nat. Genet.* **31**:400–404.
 44. Sturgeon, C. M., D. Kemmer, H. J. Anderson, and M. Roberge. 2006. Yeast as a tool to uncover the cellular targets of drugs. *Biotechnol. J.* **1**:289–298.
 45. Taylor, D. J., J. Nilsson, A. R. Merrill, G. R. Andersen, P. Nissen, and J. Frank. 2007. Structures of modified eEF2 80S ribosome complexes reveal the role of GTP hydrolysis in translocation. *EMBO J.* **26**:2421–2431.
 46. Valle, M., A. Zavialov, J. Sengupta, U. Rawat, M. Ehrenberg, and J. Frank. 2003. Locking and unlocking of ribosomal motions. *Cell* **114**:123–134.
 47. Van Ness, B., J. Howard, and J. Bodley. 1980. ADP-ribosylation of elongation factor 2 by diphtheria toxin. Isolation and properties of the novel ribosyl-amino acid and its hydrolysis products. *J. Biol. Chem.* **255**:10717–10720.
 48. Vilella, M. D., M. Remacha, B. L. Ortíz, E. Méndez, and J. P. G. Ballesta. 1991. Characterization of yeast acidic ribosomal phosphoproteins using monoclonal antibodies. *Eur. J. Biochem.* **196**:407–414.
 49. Winzler, E. A., D. D. Shoemaker, A. Astromoff, H. Liang, K. Anderson, A. Andre, R. Bangham, R. Benito, and J. E. Boeke. 1999. Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* **285**:901–906.

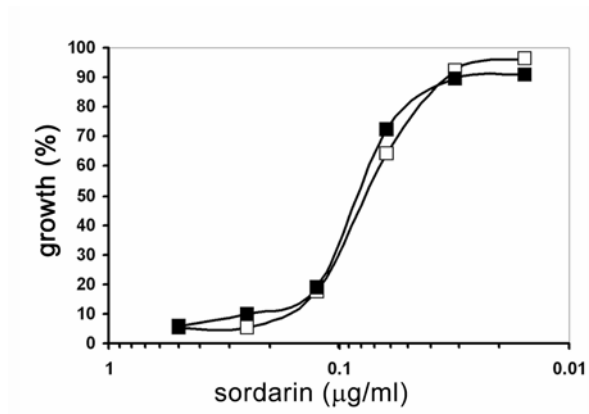


Figure S1. Mitochondria are not involved in sordarin resistance. Wild type BY1741 and petite strains were grown overnight in YPD medium in flasks and then inoculated in microtiter YPD plates containing 200 µl YPD with or without different amounts of sordarin. Under these conditions, 100% growth corresponds to an $OD_{600} = 1.1$. The relative growth after incubation for 24 h at 30 °C in the presence vs absence of the drug is represented as the mean of two independent experiments.

Table S1. Sordarin hypersensitive mutants unable to grow in the presence of 2 ng/ml. of sordarin.

Deleted ORF	Gene Name	Biological Process	Cellular Component
YER014W	<i>HEM14</i>	Heme biosynthesis	Mitochondrion
YER017C	<i>AFG3</i>	Protein complex assembly	Mitochondrial inner membrane
YLR369W	<i>SSQ1</i>	Intracellular sequestering of iron ion	Mitochondrial matrix
YJL180C	<i>ATP12</i>	Protein complex assembly	Mitochondrial matrix
YBL099W	<i>ATP1</i>	ATP synthesis coupled proton transport	Mitochondrial nucleoid
YBL100C		Unknown	Endoplasmic reticulum membrane
YPR072W	<i>NOT5</i>	transcription from RNA polymerase I	Cytoplasm
YDR523C	<i>SPS1</i>	Protein amino acid phosphorylation*	Cytoplasm
YNL225C	<i>CNM67</i>	Microtubule nucleation	Spindle pole body

TABLE S2. Sordarin resistant yeast mutants

Deleted ORF	Gene	Biological Process	Cellular Component	MIC (ng/ml)
Diphthamide biosynthesis				
YIL103W	<i>DPH1</i>	peptidyl-diphthamide biosynthesis	cytoplasm	>500
YKL191W	<i>DPH2</i>	peptidyl-diphthamide biosynthesis	cytoplasm	>500
YJR097W	<i>JJJ3/DPH4</i>	peptidyl-diphthamide biosynthesis	cytoplasm	>125
YLR172C	<i>DPH5</i>	peptidyl-diphthamide biosynthesis	cytoplasm	>500
Protein biosynthesis				
YDR418W	<i>RPL12B</i>	protein biosynthesis	cytosolic large ribosomal subunit	>500
YGL135W	<i>RPL1B</i>	protein biosynthesis	cytosolic large ribosomal subunit	>500
YNL069C	<i>RPL16B</i>	protein biosynthesis	cytosolic large ribosomal subunit	>125
YBR191W	<i>RPL21A</i>	protein biosynthesis	cytosolic large ribosomal subunit	>125
YDR450W	<i>RPS18A</i>	protein biosynthesis	cytosolic small ribosomal subunit	>62.5
YDR025W	<i>RPS11A</i>	protein biosynthesis	cytosolic small ribosomal subunit	>62.5
YJR145C	<i>RPS4A</i>	protein biosynthesis	cytosolic small ribosomal subunit	>62.5
YNR037C	<i>RSM19</i>	protein biosynthesis	mitochondrial small ribosomal subunit	>500
YBL090W	<i>MRP21</i>	protein biosynthesis	mitochondrial small ribosomal subunit	>500
YBR122C	<i>MRPL36</i>	protein biosynthesis	mitochondrial large ribosomal subunit	>500
YBR268W	<i>MRPL37</i>	protein biosynthesis	mitochondrial large ribosomal subunit	>500
YDR405W	<i>MRP20</i>	protein biosynthesis	mitochondrial large ribosomal subunit	>500
YDL202W	<i>MRPL11</i>	protein biosynthesis	mitochondrial large ribosomal subunit	>62.5
YMR193W	<i>MRPL24</i>	protein biosynthesis	mitochondrial large ribosomal subunit	>125
YMR024W	<i>MRPL3</i>	protein biosynthesis	mitochondrial large ribosomal subunit	>125
YHR091C	<i>MSR1</i>	protein biosynthesis	mitochondrion	>125
YAL035W	<i>FUN12</i>	translational initiation	cytoplasm	>125
Protein modification				
YDR410C	<i>STE14</i>	peptide pheromone maturation	endoplasmic reticulum membrane	>125
YDL090C	<i>RAM1</i>	protein amino acid farnesylation	protein farnesyltransferase complex	>500
YER075C	<i>PTP3</i>	protein amino acid dephosphorylation	cytoplasm	>125
YPR023C	<i>EAF3</i>	histone acetylation	histone acetyltransferase complex	>500
YPR131C	<i>NAT3</i>	N-terminal peptidyl-methionine acetylation	cytoplasm	>62.5
Protein catabolism				
YGL240W	<i>DOC1</i>	mitotic sister chromatid segregation	mitochondrion	>500
YGR135W	<i>PRE9</i>	ubiquitin-dependent protein catabolism	proteasome core complex	>500
YJR090C	<i>GRR1</i>	G1/S transition of mitotic cell cycle	cytoplasm	>500
YMR276W	<i>DSK2</i>	ER-associated protein catabolism	nucleus	>500
YDL104C	<i>QRI7</i>	proteolysis and peptidolysis	mitochondrion	>125
YDR363W-A	<i>SEM1</i>	ubiquitin-dependent protein catabolism	nucleus	>125
YMR264W	<i>CUE1</i>	ER-associated protein catabolism	mitochondrion	>62.5
YDL091C	<i>UBX3</i>	unknown	cytoplasm	>500
Cell wall organization and biogenesis				
YDR351W	<i>SBE2</i>	cell wall organization and biogenesis	Golgi apparatus	>500
YER155C	<i>BEM2</i>	cell wall organization and biogenesis	mitochondrion	>500
YIL085C	<i>KTR7</i>	cell wall organization and biogenesis	Golgi apparatus	>500
YOR092W	<i>ECM3</i>	cell wall organization and biogenesis	endoplasmic reticulum	>125
YJL042W	<i>MHP1</i>	cell wall organization and biogenesis	microtubule	>125
YGR041W	<i>BUD9</i>	bud site selection	bud neck	>125
Biosynthetic pathways				
YOR184W	<i>SER1</i>	purine base biosynthesis	cytoplasm	>500
YMR300C	<i>ADE4</i>	purine nucleotide biosynthesis	cytoplasm	>500
YDR035W	<i>ARO3</i>	aromatic amino acid family biosynthesis	cytoplasm	>500
YOL055C	<i>THI20</i>	thiamin biosynthesis	unknown	>500
YDR034C	<i>LYS14</i>	lysine biosynthesis, amino adipic pathway	nucleus	>500
Iron ion homeostasis				
YHL040C	<i>ARN1</i>	iron-siderophore transport	endosome	>500
YHL047C	<i>ARN2</i>	iron ion homeostasis	plasma membrane	>500
YDL198C	<i>GGC1</i>	iron ion homeostasis	mitochondrial inner membrane	>500
Mitochondrial genome maintenance				
YOL095C	<i>HMI1</i>	mitochondrial genome maintenance	mitochondrial matrix	>125
YOR330C	<i>MIP1</i>	DNA-dependent DNA replication	mitochondrion	>500
Transport				
YHR015W	<i>MIP6</i>	mRNA-nucleus export	nuclear pore	>500
YIR004W	<i>DJP1</i>	peroxisome matrix protein import	cytosol	>500
YBR068C	<i>BAP2</i>	amino acid transport	plasma membrane	>125
YHL036W	<i>MUP3</i>	amino acid transport	membrane	>500

Response to stress

YDR030C	<i>RAD28</i>	DNA repair	nucleus	>500
YDR078C	<i>SHU2</i>	error-free DNA repair	unknown	>500
YDL200C	<i>MGT1</i>	DNA dealkylation	nucleus	>125
YBR099C		response to DNA damage stimulus		>500

RNA metabolism

YLL013C	<i>PUF3</i>	deadenylation-dependent decay	cytoplasm	>500
YLR204W	<i>QRI5</i>	RNA processing	mitochondrion	>125
YDL160C	<i>DHH1</i>	deadenylation-dependent decapping	cytoplasm	>125
YHR011W	<i>DIA4</i>	aerobic respiration	cytoplasm	>62.5
YKL130C	<i>SHE2</i>	intracellular mRNA localization	cytoplasm	>125

Other

YDL189W	<i>RBS1</i>	galactose metabolism	cytoplasm	>500
YBR003W	<i>COQ1</i>	ubiquinone metabolism	mitochondrion	>500
YDL214C	<i>PRR2</i>	MAPKKK cascade	nucleus	>500
YNL164C	<i>IBD2</i>	mitotic spindle checkpoint	nucleus	>500
YLR216C	<i>CPR6</i>	protein holding	cytoplasm	>125
YDL239C	<i>ADY3</i>	protein complex assembly	spindle	>62.5
YLR381W	<i>CTF3</i>	chromosome segregation	kinetochore	>125
YMR228W	<i>MTF1</i>	transcription from mitochondrial promoter	mitochondrial matrix	>125
YJL093C	<i>TOK1</i>	potassium ion homeostasis	plasma membrane	>125
YGL156W	<i>AMS1</i>	carbohydrate metabolism	vacuolar membrane	>125
YIR031C	<i>DAL7</i>	allantoin catabolism	cytoplasm	>125
YDR297W	<i>SUR2</i>	sphingolipid biosynthesis	endoplasmic reticulum	>62.5
YPL132W	<i>COX11</i>	aerobic respiration	mitochondrial inner membrane*	>125

Biological process unknown

YBL049W	<i>MOH1</i>	unknown	Unknown	>500
YBL091C-A	<i>SCS22</i>	unknown	unknown	>500
YBR141C		unknown	nucleolus	>500
YBR255W		unknown	cytoplasm	>500
YCL042W		unknown	cytoplasm	>125
YDR008C		unknown	unknown	>500
YDR020C		unknown	cytoplasm	>500
YDR024W	<i>FYV1</i>	unknown	cytoplasm	>500
YER087W		unknown	unknown	>500
YGR228W		unknown	unknown	>500
YHL041W		unknown	unknown	>500
YHR017W	<i>YSC83</i>	unknown	mitochondrion	>500
YHR151C		unknown	unknown	>500
YIL157C	<i>FMP35</i>	unknown	mitochondrion	>500
YKL098W		unknown	unknown	>500
YLR143W		unknown	cytoplasm	>500
YLR202C		unknown	unknown	>500
YMR126C	<i>DLT1</i>	unknown	unknown	>125
YMR141C		unknown	unknown	>500
YOL079W		unknown	integral to membrane	>500
YDR033W	<i>MRH1</i>	unknown	mitochondrion	>125
YDL063C		unknown	cytoplasm	>125
YDL146W	<i>LDB17</i>	unknown	cytoplasm	>125
YDR042C		unknown	unknown	>125
YDL062W		unknown	unknown	>125
YER184C		unknown	unknown	>125
YLR125W		unknown	unknown	>125
YGL107C	<i>RMD9</i>	unknown	mitochondrion	>125

Capítulo II: Sordarina Resultados y Discusión Adicionales

1.- La Ruta de Síntesis de Diftamida: Antecedentes y Contexto

La biosíntesis de diftamida representa una de las rutas de modificación post-traduccionales más complejas. De hecho, cuando en el año 2003 iniciamos el escrutinio de mutantes resistentes a sordarina, aún no habían sido identificados los genes que codifican las enzimas responsables de la modificación post-traduccionales del residuo de diftamida en el eEF2, y el conocimiento que se tenía sobre dicha ruta era parcial, así:

- Desde el punto de vista bioquímico, se sabía que la síntesis de diftamida se produce por la modificación secuencial de la histidina precursora His699 de eEF2 (en *S. cerevisiae*): i) en primer lugar, se produce la transferencia de un grupo 3-amino-3-carboxipropilo de la S-adenosilmetionina al grupo C-2 imidazol de la histidina precursora, ii) posteriormente, de nuevo a partir de S-adenosilmetionina, tiene lugar la trimetilación del grupo amino resultante, produciendo un precursor al que se ha denominado diftina, iii) por último, la amidación del grupo carboxilo da lugar a la diftamida (Fig. 22) (Chen and Bodley, 1988; Moehring et al., 1980; Moehring et al., 1984).
- Desde el punto de vista genético, se habían identificado mutantes resistentes a la acción de la toxina diftérica (DT) y de la toxina ETA tanto en la levadura como en células de ovario de hámster chino (CHO). Estos mutantes fueron agrupados en cinco grupos de complementación, en el caso de *S. cerevisiae* (Chen et al., 1985), y en tres grupos de complementación en el caso de las células CHO (Moehring et al., 1984). Los análisis bioquímicos sugerían que los mutantes de los grupos 1-4 en levadura y 2-3 en células CHO, estaban afectados, directa o indirectamente, en el primer paso de síntesis, mientras que mutantes del grupo 5 en levadura y del grupo 1 en células CHO lo estaban en el paso de trimetilación (Fig. 22) (Chen and Bodley, 1988; Chen et al., 1985; Mattheakis et al., 1992; Moehring et al., 1984). No se había identificado ningún mutante en el paso final de amidación, ya que la diftina es capaz de ADP-ribosilarse, aunque a menor velocidad, impidiendo la selección del correspondiente mutante resistente a DT (Moehring et al., 1984). Los dos primeros genes de la ruta fueron clonados por complementación de mutantes de los grupos de complementación 2 y 5 en la levadura, por lo que fueron denominados *DPH2* y *DPH5* (Mattheakis et al., 1992; Mattheakis et al., 1993).

Entre los mutantes identificados en nuestro escrutinio de resistencia a sordarina, fueron identificados los mutantes *dph2* y *dph5*. El análisis funcional de los resultados, empleando herramientas basadas en *GO*, reveló que *DPH2* y *DPH5*, y por tanto la ruta en la que participan, se encontraba entre las categorías funcionales más significativas más afectadas por la sordarina (Botet et al., 2008). Basándonos en la hipótesis de que el resto de los mutantes en la ruta de síntesis de la diftamida también debían ser resistentes a la sordarina, nos propusimos tratar de identificar entre este grupo de mutantes aquellos que estuviesen también implicados en la ruta de biosíntesis de diftamida. Con este fin, se seleccionó un grupo de 14 mutantes candidatos, resistentes a sordarina y correspondientes a genes de función desconocida, que fueron

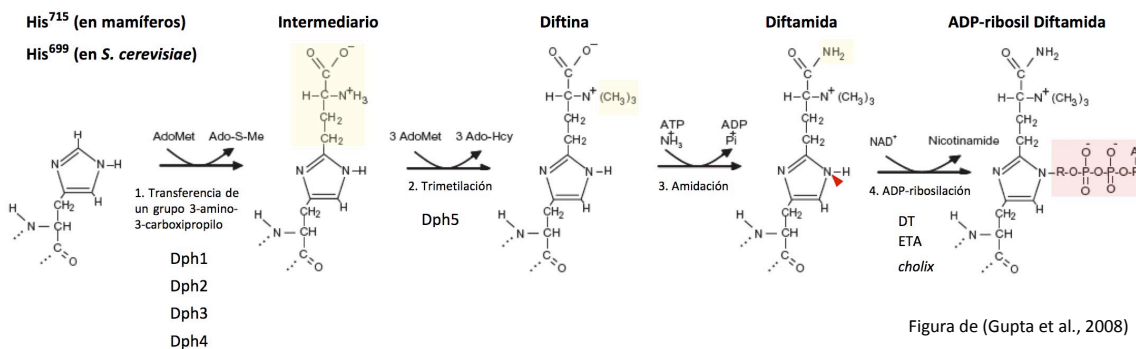


Figura 22. La ruta de biosíntesis de diftamida y su ADP-ribosilación. Al menos cinco genes, *DPH1* a *DPH5*, son necesarios para la modificación post-traduccional de la His699 localizada en el dominio IV de eEF2. Dph1 a Dph4 participan en el primer paso de la ruta, que consiste en la transferencia de un grupo 3-amino-3-carboxipropilo desde la S-adenosilmetionina donadora al C-2 imidazol de la histidina precursora. El segundo, paso es catalizado por Dph5, encargado de trimetilar el grupo 3-amino-3-carboxipropilo, dando lugar a un precursor al que se ha denominado diftina. El último paso, es la amidación del grupo carboxilo, por una amidasa aún sin identificar, dando lugar a diftamida. La flecha roja en el anillo imidazol de la His699 indica el sitio de ADP-ribosilación por la toxina diftérica (DT), la exotoxina A (ETA), y la toxina “cholix”. AdoMet, S-adenosilmetionina; Ado-S-Me, metiltioadenosina; Ado-Hcy, S-adenosilhomocisteína.

sometidos a ensayos de resistencia al fragmento A de la toxina diftérica (DTA). Se identificaron 3 mutantes resistentes a DTA correspondientes a los ORFs *YIL103W*, *YBL071C*, e *YJR097W*.

Al tiempo que se desarrollaba este trabajo, el grupo del Dr. Stephen Leppla publicó la identificación y la caracterización funcional de cinco de los genes de la ruta de síntesis de diftamida (Liu et al., 2004), definiendo a los genes *YIL103W* como *DPH1*, *YJR097W* como *DPH4*, e *YBL071W-A* como *DPH3*. Con excepción, de *YBL071W-A*, los genes identificados en este trabajo coincidían con los identificados en el escrutinio que habíamos realizado. Además, la delección del mutante *ybl071c*, identificado en nuestro escrutinio, se extiende afectando parcialmente al gen contiguo *YBL071W-A*, descrito en el trabajo de Leppla como el gen *DPH3*; demostrando que el extremo C-terminal de Dph3p, deleccionado en el mutante *ybl071c*, es esencial para su función; y la total coincidencia de los resultados en ambos trabajos. El estudio de la ruta de síntesis de diftamida perdió, por tanto, su carácter novedoso y nos hizo enfocar nuestros objetivos hacia el estudio de la relación entre la resistencia a sordarina y la ausencia de diftamida. Además, entre los objetivos que nos planteamos está el de conocer el papel funcional de la diftamida en la célula, un asunto aún sin resolver a pesar de los esfuerzos de numerosos grupos de investigación.

Por ello, aparte de los resultados incluidos en la publicación que se adjunta - en los que se describe el escrutinio, los resultados generales, y la relación entre la diftamidación y la toxicidad de la sordarina - nos planteamos una serie de experimentos con objeto de estudiar la función celular de la diftamida. Los resultados y discusión de dichos experimentos se presentan a continuación.

2.- La Ausencia de Diftamidación No Afecta al Crecimiento de la Levadura

Se ha descrito que los mutantes *dph2Δ* y *dph5Δ* no presentan retraso en el crecimiento, mientras que el mutante en la His699 de eEF2 (*H699N*), aunque crece bien a 30°C, es inviable a 37°C (Ortiz et al., 2006).

Para estudiar de manera sistemática si la ausencia de diftamidación tiene efectos sobre el crecimiento de la levadura, se analizó el fenotipo de los mutantes *dphΔ* tanto en las

condiciones de crecimiento “óptimas” (medio YPD y 28°C), como en condiciones “sub-óptimas” (medio SC, medio SC con la concentración de glucosa reducida diez veces, e incubación a distintas temperaturas (14°C, 25°C, 39°C, y 42°C)). Los resultados indican que el bloqueo en la ruta de diftamidación no compromete el crecimiento de la levadura en ninguna de las condiciones ensayadas (Fig. 23), con la excepción del mutante que carece de *DPH3*, cuyo crecimiento es más lento independientemente del medio empleado. El retraso en el crecimiento de *dph3Δ* es más evidente a temperaturas de incubación “sub-óptimas”, siendo crítico a la temperatura más elevada ensayada (42°C) (Fig. 23). Ya había sido descrito que la pérdida del gen *DPH3* tiene un efecto pleiotrópico sobre el crecimiento celular en la levadura, incluyendo crecimiento lento, sensibilidad a agentes estresantes (cafeína, 6-AU, calcofluor) y a temperaturas por encima de 38°C (Fichtner and Schaffrath, 2002). Este fenotipo diferencial de *dph3Δ* con respecto al resto de mutantes *dphΔ* puede deberse a las funciones adicionales que presenta, independientes de la diftamidación, y que comentaremos más adelante.

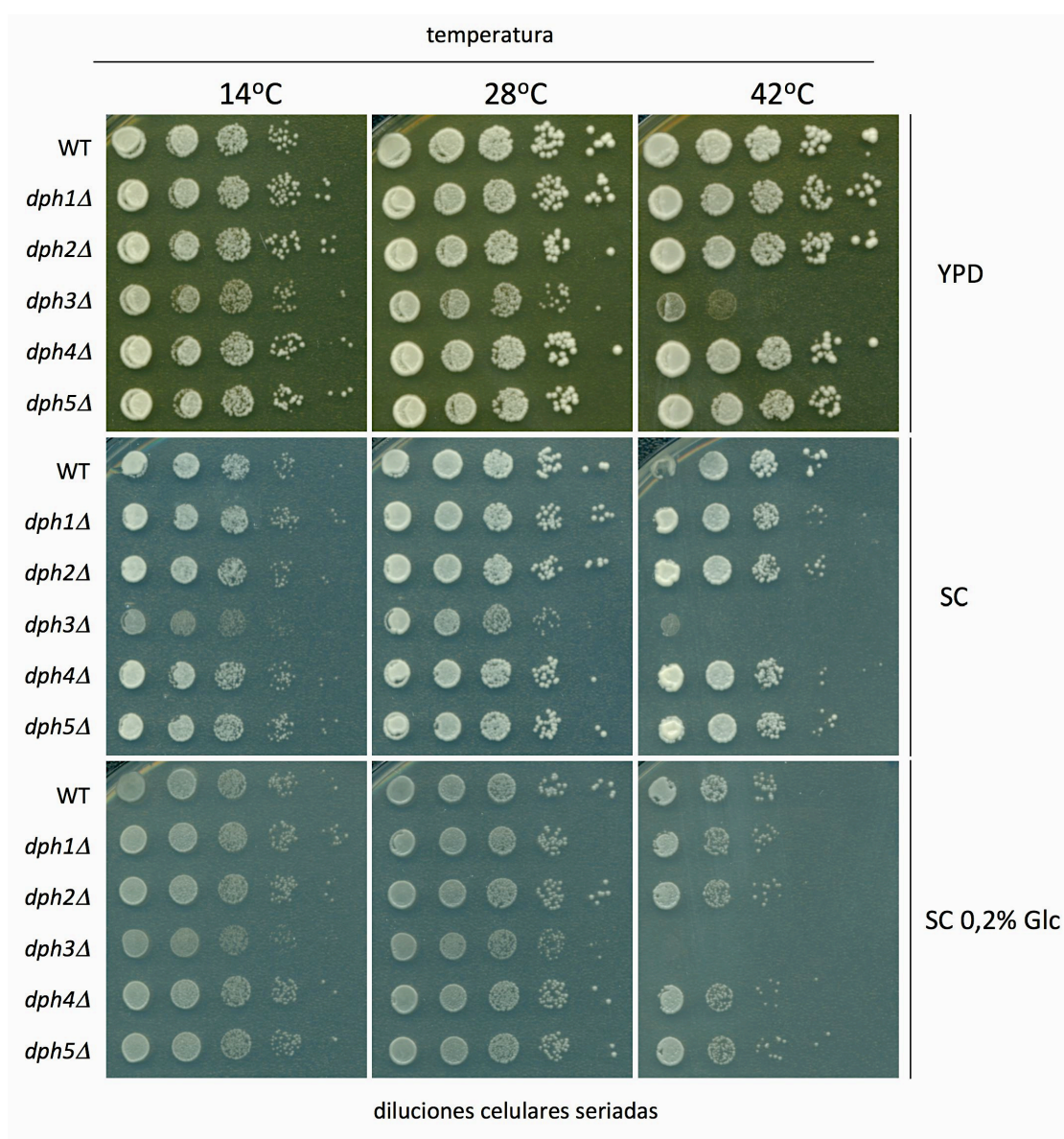


Figura 23. El bloqueo de la ruta de síntesis de diftamida no tiene efectos aparentes sobre el crecimiento de la levadura, a excepción del mutante *dph3*, cuyo retraso en el crecimiento es notable, sobre todo a temperaturas elevadas. Diluciones seriadas de cada una de las cepas *dphΔ*, así como de la cepa silvestre, se inocularon en medio YPD, SC, y SC con Glucosa al 0,2%. Las placas se incubaron a 14°C, 25°C, 28°C, 39°C, y 42°C, aunque en la figura sólo se muestran las temperaturas más extremas y la temperatura “óptima”.

3.- Sensibilidad a Aminoglicósidos y a Otros Agentes que Generan Estrés Traduccional

Se ha descrito que mutantes en el dominio IV de eEF2 (*D696A*, *I698A*, y *H699N*) son sensibles a paromomicina (Ortiz et al., 2006), un compuesto inhibidor de la traducción, cuya sensibilidad se ha asociado a errores en la fidelidad de la traducción (Palmer et al., 1979; Singh et al., 1979). Dichos mutantes son también sensibles a cicloheximida, pero no a higromicina B (Ortiz et al., 2006). Los mismos autores han descrito que las cepas que carecen de los genes *DPH2* o *DPH5* no presentan sensibilidad a los inhibidores de la traducción cicloheximida e higromicina B; la sensibilidad a paromomicina no fue ensayada debido a la presencia en dichas cepas del módulo *kanMX*, que confiere resistencia a dicha droga (Ortiz et al., 2006).

Además, muy recientemente, también se ha descrito que el mutante *dph3Δ*, pero no el resto de los mutantes *dphΔ*, presenta hipersensibilidad a paromomicina (Bar et al., 2008).

Estos resultados discordantes, sobre la sensibilidad de los mutantes incapaces de diftamidarse a compuestos inhibidores de la traducción, nos indujeron a analizar, de forma sistemática, la sensibilidad de todos los mutantes *dphΔ* a distintos agentes inhibidores de la traducción, como: los aminoglicósidos paromomicina, neomicina, geneticina e higromicina B; y a cicloheximida. Asimismo, también se realizaron ensayos de sensibilidad a cafeína y a 6-azauracilo (6-AU), ya que había sido descrito que algunos mutantes relacionados con el complejo *Elongator*, incluido *dph3Δ*, presentaban hipersensibilidad a cafeína y sensibilidad a 6-AU (Fichtner and Schaffrath, 2002).

Dado que el módulo de resistencia a geneticina *kanMX4*, presente en las cepas de la colección de deletantes, interfiere con la sensibilidad a paromomicina, se sustituyó dicho módulo por el marcador *LEU2*. Los ensayos de sensibilidad se realizaron en los mutantes *dphΔ::LEU2*.

Con objeto de comprometer la traducción en estos mutantes, los ensayos se realizaron en paralelo a tres temperaturas de incubación diferentes, a la temperatura “óptima” de crecimiento (28°C), y a temperaturas baja (18°C) y alta (39°C), en las que la maquinaria celular y por ende la traducción está comprometida.

Los ensayos se realizaron con tres clones independientes de cada uno de los deletantes *dphΔ::LEU2*, empleando medio sintético completo líquido (SC) con un amplio rango de concentraciones de cada uno de los inhibidores (ver Figs. 24a-h). Se determinó la densidad óptica de cada una de las cepas, en cada condición, a distintos tiempos de incubación (cada 12 horas durante un periodo de 5 días), generando un perfil de sensibilidad para cada uno de los mutantes *dphΔ::LEU2* y la correspondiente cepa silvestre.

De forma general, los resultados revelan que el bloqueo de la ruta de síntesis de diftamida induce sensibilidad a los compuestos inhibidores de la traducción, siendo ésta más acusada en el mutante *dph3Δ*, cuya hipersensibilidad es manifiesta (Figs. 24a-h). Un análisis más detallado de los resultados indica que:

- * Los mutantes *dphΔ* son sensibles a los aminoglicósidos paromomicina, neomicina y geneticina (Figs. 24b, 24c, y 24d, respectivamente).

Estos antibióticos, que presentan pequeñas diferencias en su estructura, actúan uniéndose al “*decoding center*” del sitio A, en la SSU. En concreto, se unen a la hélice

44 del RNAr 18s, donde interaccionan con dos adeninas universalmente conservadas (A1492 y A1493), estabilizándolas en una conformación “desplegada”. Estas adeninas desempeñan un papel muy importante en el reconocimiento del emparejamiento correcto entre las dos primeras bases del anticodón del RNAt y el codón del RNAm en el sitio A, donde tiene lugar el “descifrado” o “*decoding*”. Así, si el emparejamiento entre las bases es correcto, estas adeninas se “despliegan” fuera de la hélice 44, estabilizando la unión y el proceso de acoplamiento del RNAt en el sitio A. Si, por el contrario, el RNAt que llega al sitio A tiene un anticodón no correcto, dichas adeninas no se “despliegan”, por lo que no se estabiliza la unión anticodón RNAt-codón RNAm, y dicho RNAt sale del sitio A (ver las revisiones de (Ogle and Ramakrishnan, 2005; Poehlsgaard and Douthwaite, 2005; Ramakrishnan, 2008; Yonath, 2005)).

La unión de paromomicina, neomicina o geneticina, fuerzan a dichas adeninas a permanecer en su posición “desplegada”, independientemente de si el RNAt es el correcto o no. El efecto biológico es una disminución considerable de la fidelidad de la traducción, una mayor afinidad de los RNAt por el sitio A y una aceleración en la cinética de activación GTPasa de EF-Tu (eEF1A). En última instancia, estos defectos conducen a la generación de proteínas aberrantes y a la inhibición de la translocación. Aunque no se conocen las razones, el efecto citotóxico es más selectivo en bacterias aerobias gram negativas (Poehlsgaard and Douthwaite, 2005; Sutcliffe, 2005).

Recientemente, se ha descrito que estos aminoglicósidos se unen también a la hélice 69 de la LSU, restringiendo la dinámica de la misma e impidiendo los cambios conformacionales que induce el factor RRF (factor de reciclaje de los ribosomas) en dicha hélice y, por tanto, inhibiendo el reciclaje de los ribosomas. Este mecanismo podría explicar la potente inhibición de la translocación que causan estos compuestos, y su actividad antimicrobiana, ya que los eucariotas carecen del factor RRF (Borovinskaya et al., 2007).

El fenotipo de sensibilidad a paromomicina de los mutantes *dph* es similar al de otros mutantes que en su mayoría están relacionados con la traducción (Cui et al., 1998; Kalhor and Clarke, 2003; Ruiz-Echevarria et al., 1998). Curiosamente, algunos de estos mutantes comparten con los mutantes *dphΔ* una mayor proporción de cambios de fase de lectura de la traducción en dirección 5' (-1), como veremos más adelante.

- * Los mutantes *dphΔ* son sensibles a higromicina B (Figs. 24e), un aminoglicósido que presenta poca especificidad bacteriana debido a que se une a zonas universalmente conservadas del ribosoma. La higromicina B se une también a la hélice 44 del RNAr 18s, aunque en este caso un poco por encima de la zona de unión de la paromomicina, neomicina y geneticina; en concreto en un bolsillo entre las bases U1406:C1496 (Borovinskaya et al., 2008; Brodersen et al., 2000). La unión de higromicina B restringe los movimientos de la hélice 44 durante la translocación, lo que conduce a la limitación del movimiento del RNAt del sitio A al sitio P (Brodersen et al., 2000). Estructuralmente, la higromicina B provoca una reorientación de la adenina A1493 de la hélice 44 hacia una conformación “desplegada”, de forma que dicha adenina bloquea el movimiento de los RNAts entre los sitios A y P, en ambas direcciones (Borovinskaya et al., 2008).

- * Los mutantes *dphΔ* son levemente sensibles a cicloheximida (Figs. 24f), y este fenotipo solamente se observa a alta temperatura (39°C). El mutante *dph3* constituye una excepción ya que es sensible a este compuesto y el fenotipo es más acusado (hipersensibilidad) a elevada temperatura (39°C).

La cicloheximida inhibe la síntesis proteica exclusivamente en el citoplasma de eucariotas, sin afectar a la síntesis de proteínas en la mitocondria. La diana de la cicloheximida es el ribosoma y, en concreto, la LSU (Rao and Grollman, 1967; Stocklein and Piepersberg, 1980). Su modo de acción consiste en bloquear la iniciación y la elongación de la traducción, aunque el mecanismo molecular detallado no está bien definido.

Es destacable que, con la excepción de *dph3Δ*, los mutantes *dphΔ* muestren escasa o nula sensibilidad de a esta molécula, sugiriendo que la diftamida desempeña un papel específico en la translocación.

- * Los mutantes *dphΔ* son sensibles a cafeína (Fig. 24g). El mutante *dph3Δ* muestra hipersensibilidad a cafeína, confirmando el fenotipo de dicho mutante previamente observado por (Fichtner and Schaffrath, 2002).

La cafeína es un análogo de las purinas que induce efectos pleiotrópicos en las células pero cuyo mecanismo de acción a nivel celular es poco conocido. Kuranda *et al.* han sugerido recientemente que una de las dianas principales de la cafeína es la proteína quinasa Tor1p, cuya inhibición activa la ruta PKC de integridad celular, e inhibe la ruta de Ras/AMPC (Kuranda et al., 2006). Dado que Tor1p está implicado, entre otros procesos celulares, en la regulación de la síntesis proteica (Barbet et al., 1996) y en la biogénesis de ribosomas (Powers and Walter, 1999) en respuesta a estrés y a disponibilidad de nutrientes, es posible que la inhibición de Tor1p que ejerce la cafeína influya negativamente sobre la traducción, por alguna de la vías descritas de iniciación o elongación (Proud, 2004; Wang and Proud, 2006). Se puede especular que la sensibilidad a cafeína observada en los mutantes incapaces de sintetizar diftamida, es debida a una ralentización de la translocación. La inhibición de Tor1p y, por tanto, de mTOR por la cafeína permitiría a la proteína quinasa de eEF2 (eEF2k) fosforilar a este factor en el dominio de unión a GTP e inhibiría su unión al ribosoma ralentizando la translocación. Sería interesante comprobar esta hipótesis determinando si la inhibición de mTOR por otras vías, por ejemplo mediante rapamicina, también provoca, como la cafeína, sensibilidad en los mutantes *dphΔ*.

- * Los mutantes *dphΔ* son ligeramente sensibles a 6-AU (Fig. 24h).

El 6-AU es un inhibidor de la IMP deshidrogenasa y de la OMP descarboxilasa (Exinger and Lacroute, 1992), enzimas implicadas en la síntesis de purinas y pirimidinas, respectivamente. En levadura, el 6-AU disminuye los niveles de GTP y UTP intracelulares, induciendo estrés transcripcional (Exinger and Lacroute, 1992) mediante la reducción de la velocidad de elongación y de la procesividad de la RNA polimerasa II durante la transcripción (Mason and Struhl, 2005). Los mutantes que tienen comprometida la elongación de la transcripción vía RNA polimerasa II y III son sensibles a 6-AU (Hampsey, 1997; Riles et al., 2004); aunque, no obstante, este compuesto también afecta a otros procesos celulares (Riles et al., 2004).

El mutante que carece de *DPH3* es más sensible a 6-AU que el resto de los mutantes *dphΔ* (Fig. 24h), corroborando el fenotipo de dicho mutante previamente observado por (Fichtner and Schaffrath, 2002). Dichos autores sugieren que Dph3p podría desempeñar una función adicional, probablemente como parte del complejo *Elongator*, en la elongación de la transcripción.

Es interesante destacar que los fenotipos de sensibilidad, observados en los mutantes *dphΔ*, no son pleiotrópicos, ya que estos mutantes no presentan una sensibilidad generalizada a los demás compuestos ensayados en los otros escrutinios realizados que se citan en la memoria (datos no mostrados). La excepción podría ser *dph3Δ*, cuya ausencia en la colección de deletantes nos impide confirmar su fenotipo pleiotrópico en cuanto a sensibilidad a los compuestos analizados en la memoria. No obstante, el mutante deletante *YBL071c*, cuya deleción afecta parcialmente al extremo 3' de *DPH3* y a su funcionalidad, no es sensible a los otros compuestos objeto de estudio (datos no mostrados), pero como comentamos anteriormente, fenocopia a *dph3Δ* en cuanto a resistencia a sordarina y a DTA, sugiriendo por tanto que el extremo C-terminal de Dph3p es importante para su función en diftamidación, pero parece no ser tan necesario para las otras funciones que se le han asignado a dicha proteína.

En cuanto al efecto de la temperatura, se puede concluir que: la sensibilidad de la cepa silvestre y de los mutantes *dphΔ*, a los compuestos ensayados, es máxima a alta temperatura (39°C), mientras que a baja temperatura (18°C) la sensibilidad es mayor que a la temperatura "óptima" (Figs. 24a-h); quizás con la excepción de la cicloheximida que a elevadas concentraciones (0,075 µg/ml) induce una mayor sensibilidad a baja (18°C), que a alta (39°C) temperatura (datos no mostrados). Una interpretación biológica de este comportamiento es que, tanto una alta (a 39°C), como una baja (a 18°C), velocidad de elongación (Farewell and Neidhardt, 1998) influyen negativamente sobre la translocación cuando ésta se ve comprometida por agentes inhibidores de la misma o por mutaciones en el ribosoma-translocasa.

En resumen, nuestros datos indican que la ausencia de diftamidación induce sensibilidad a compuestos que afectan a la traducción, sensibilidad más acusada cuando el proceso afectado es la translocación, como muestra el tratamiento con aminoglicósidos. Hay varios mecanismos posibles por los que los aminoglicósidos podrían inhibir la traducción. Estos compuestos pueden estabilizar a los RNAt en sus sitios de unión al ribosoma y, por tanto, aumentar la barrera energética necesaria para que ocurra la translocación. Otra posibilidad, es que bloqueen los cambios conformacionales en el ribosoma necesarios para que tenga lugar la translocación; o bien que induzcan modificaciones estructurales en el ribosoma que impidan que dicho proceso tenga lugar. El modelo actual más aceptado es que, mientras que la paromomicina, neomicina y geneticina inducen cambios conformacionales que "atrapan" al RNAt en el sitio A y estabilizan el ribosoma en el estado PRE, la higromicina ejerce su acción bloqueando el movimiento de los RNAt entre los sitios A y P y restringiendo el movimiento del RNAm (Borovinskaya et al., 2008).

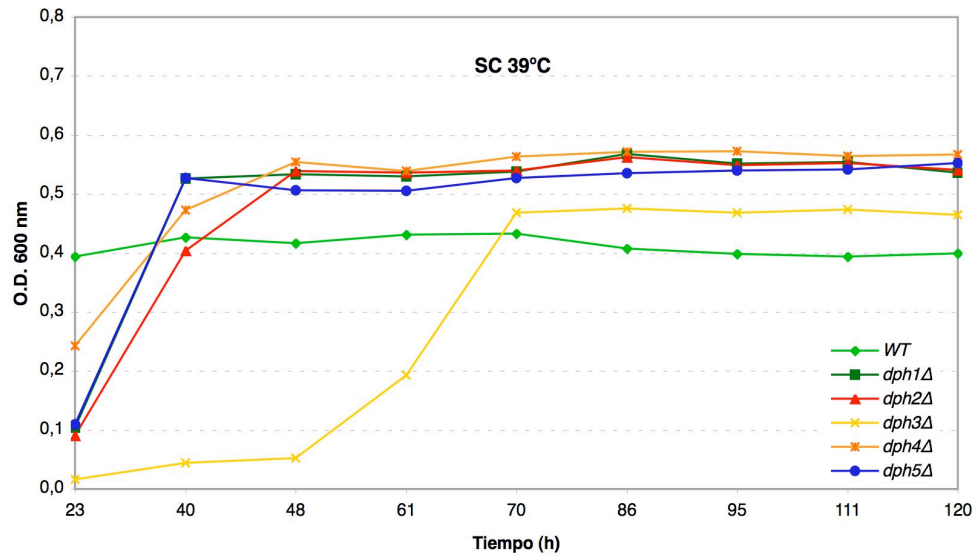
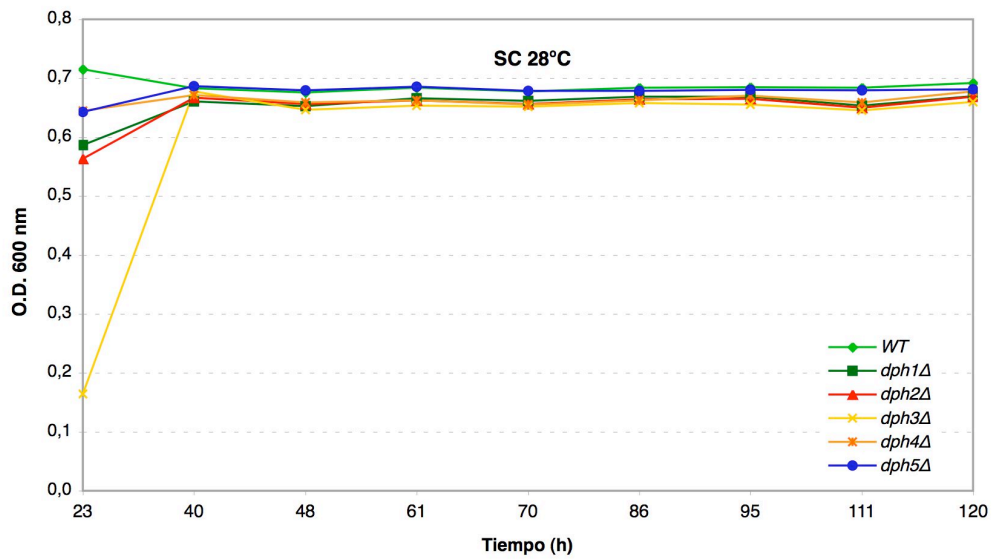
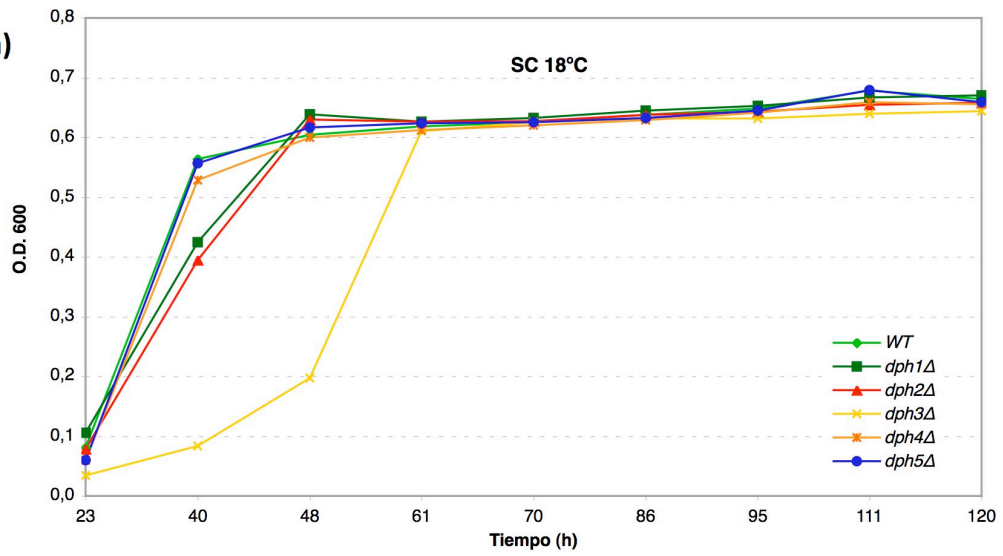
En cualquier caso, la modificación post-traducciona del la His699 en eEF2 en forma de diftamidación parece ser importante para que el proceso de translocación tenga lugar de forma óptima, ya que su ausencia aumenta la sensibilidad a los aminoglicósidos.

La sensibilidad a los aminoglicósidos, en los mutantes *dphΔ*, observada en este trabajo,

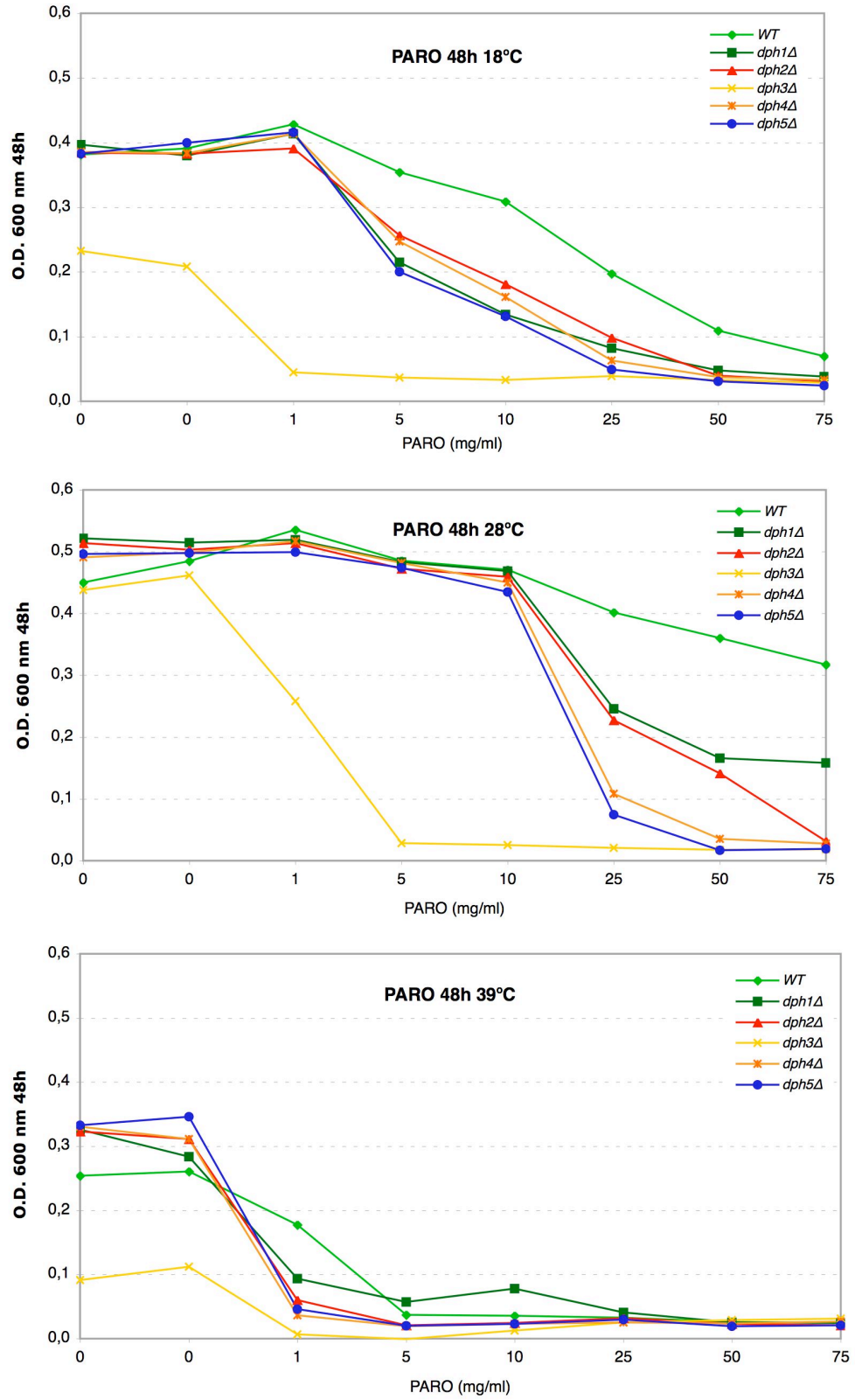
apoya a las evidencias estructurales que sugieren un papel importante del residuo de diftamida en el proceso de translocación; bien sea a nivel de mantenimiento de la fidelidad de la traducción, o a nivel mecánico o estructural, al proporcionar un resorte o palanca que fomente que la translocación ocurra de forma óptima.

Figura 24. El bloqueo de la ruta de síntesis de diftamida induce sensibilidad a agentes inhibidores de la traducción. Se emplearon 3 clones independientes, de cada uno de los mutantes *dph::LEU2* y de la cepa silvestre, para estudiar la sensibilidad a distintos agentes que generan estrés celular, principalmente a nivel de la síntesis proteica. Los ensayos se realizaron en paralelo a tres temperaturas de incubación diferentes: 18°C, 28°C, y 39°C. **(a)** Curvas de crecimiento en medio SC; **(b)** Crecimiento a las 48h de cultivo en presencia de distintas concentraciones de paromomicina (PARO); **(c)** Crecimiento a las 48h de cultivo en presencia de distintas concentraciones de neomicina (NEO); **(d)** Crecimiento a las 48h de cultivo en presencia de distintas concentraciones de geneticina (G418); **(e)** Curvas de crecimiento en presencia de 0,25 mg/ml de higromicina (HYG); **(f)** Curvas de crecimiento en presencia de 0,05 µg/ml de cicloheximida (CYH); **(g)** Curvas de crecimiento en presencia de 2 mg/ml de cafeína (CAF); y **(h)** Curvas de crecimiento en presencia de 1 mg/ml de 6-azauracilo (6-AU). En el caso de higromicina, cicloheximida, cafeína y 6-azauracilo, se ensayó una concentración adicional de la aquí representada: 0,1 mg/ml de higromicina; 0,075 µg/ml de cicloheximida; 0,5 mg/ml de cafeína; y 1,5 mg/ml de 6-azauracilo. En cada caso se muestra la concentración más representativa, de ahí que a 39°C se muestren las curvas de crecimiento en presencia de la concentración más baja empleada de cafeína y 6-azauracilo, ya que a la concentración más elevada no hay crecimiento de ninguna cepa. Nota: no se incluyen las desviaciones estándar para no abigarrar en exceso las figuras.

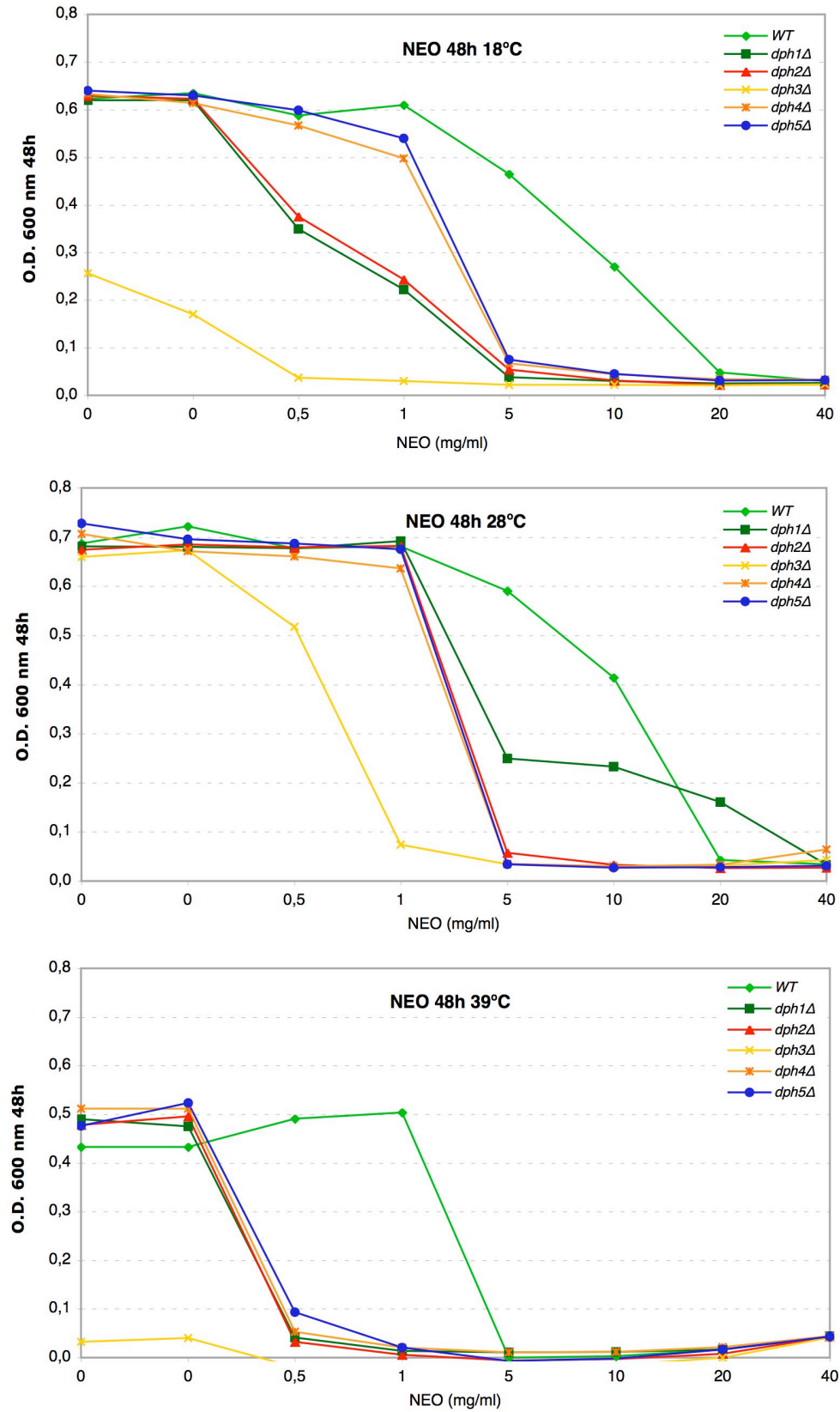
(Fig. 24a)



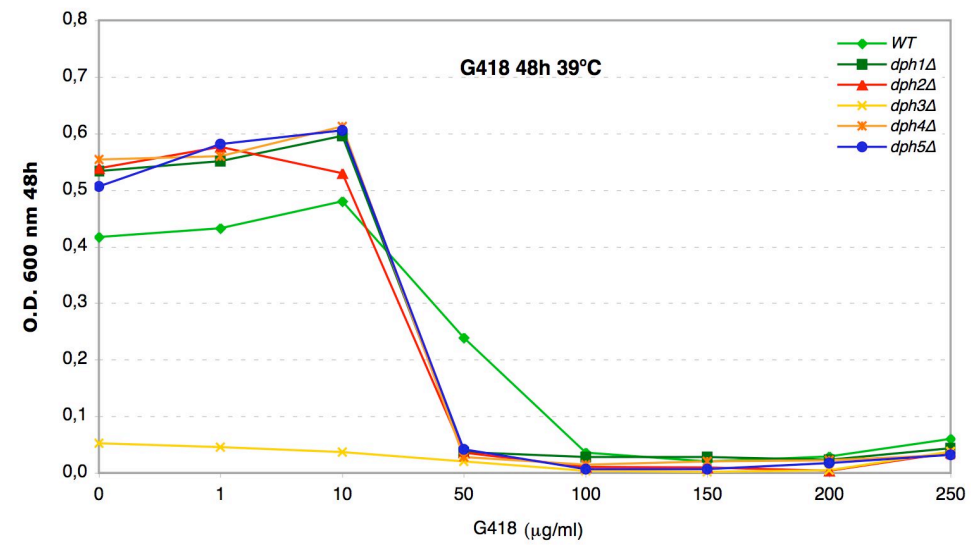
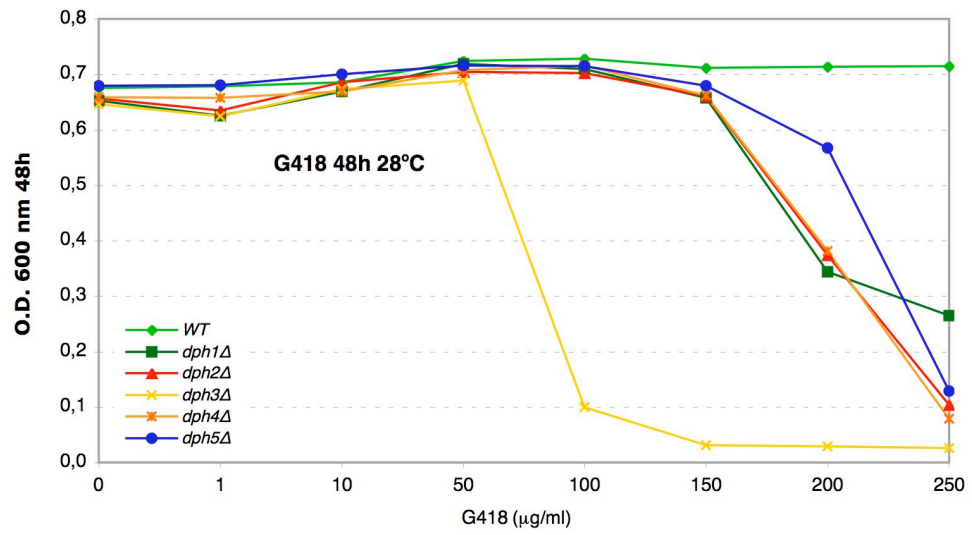
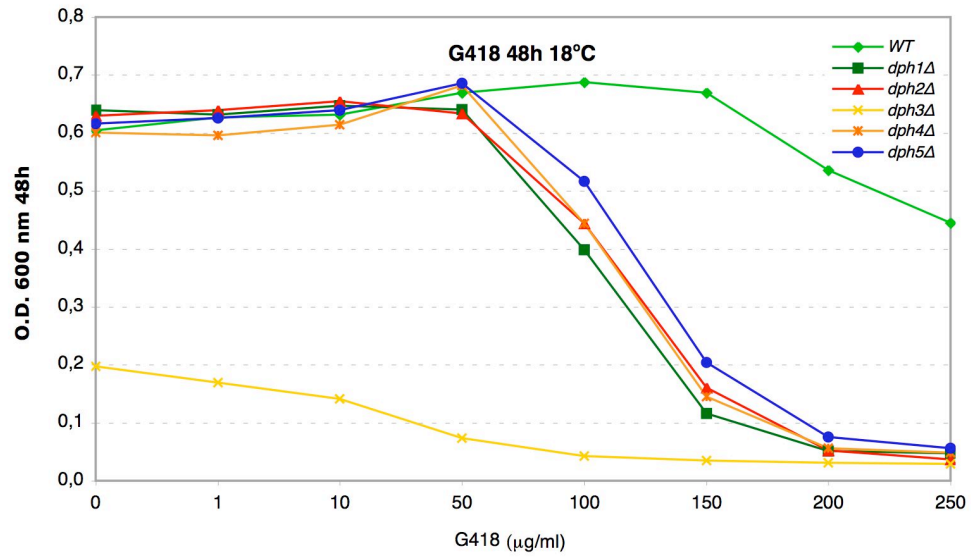
(Fig. 24b)



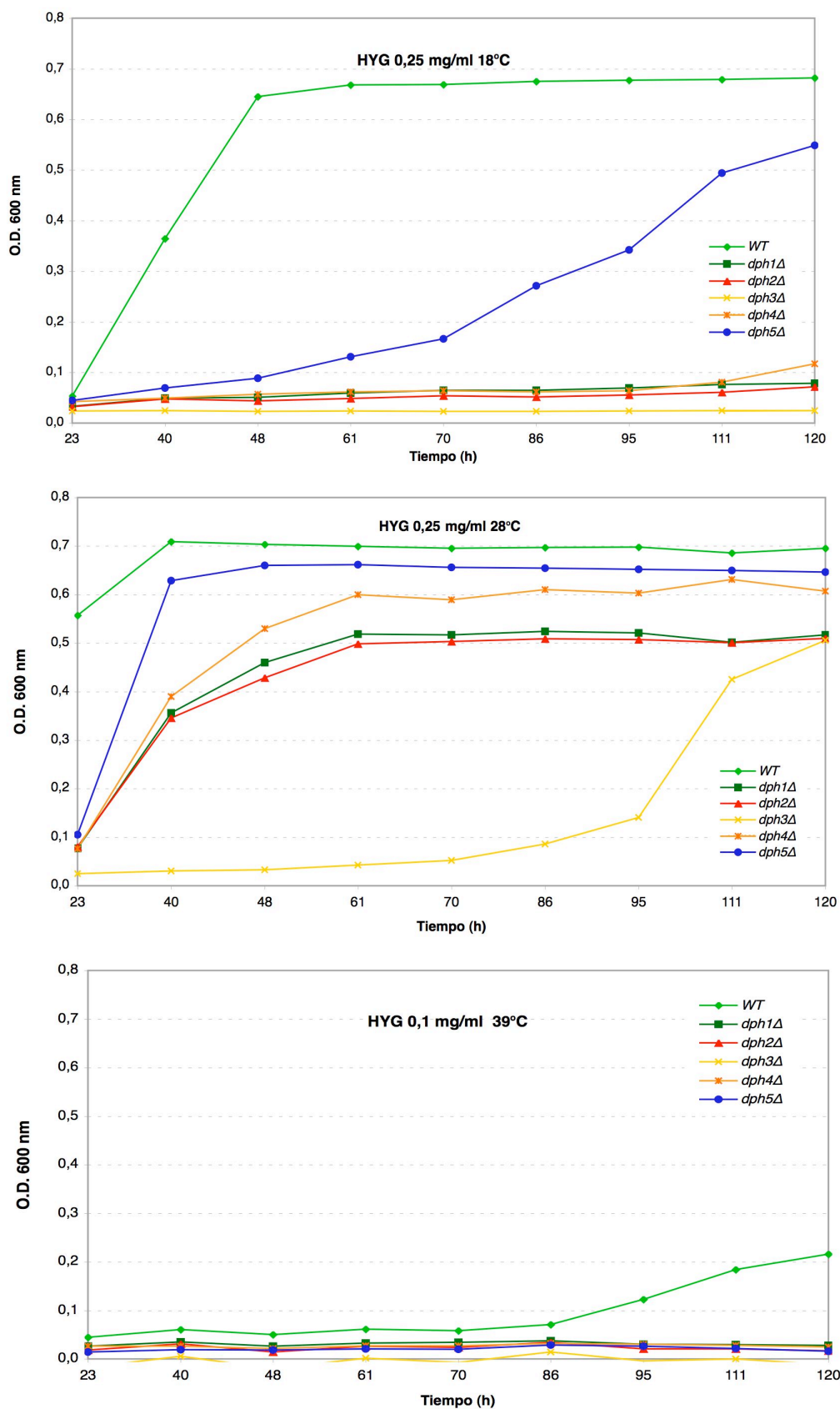
(Fig. 24c)



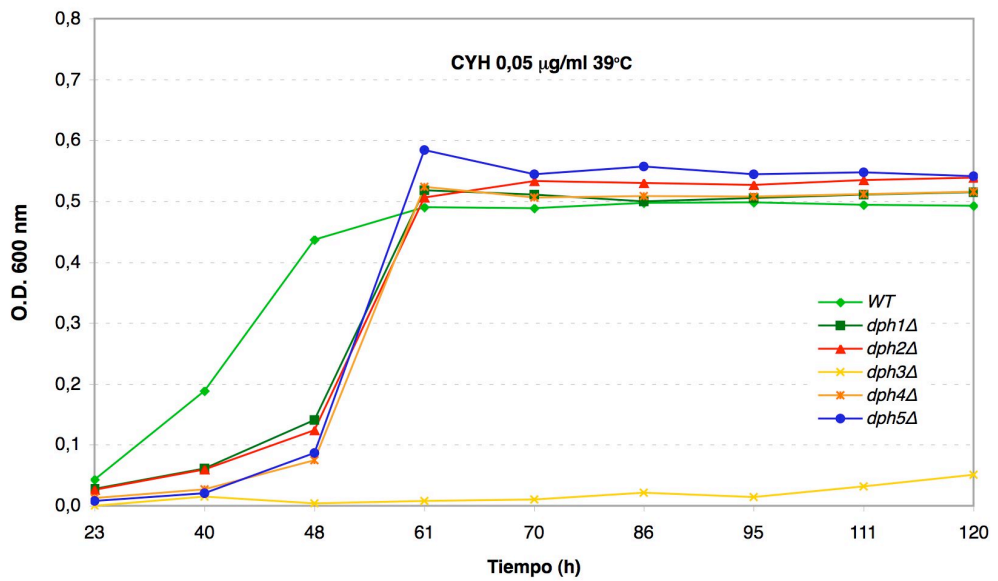
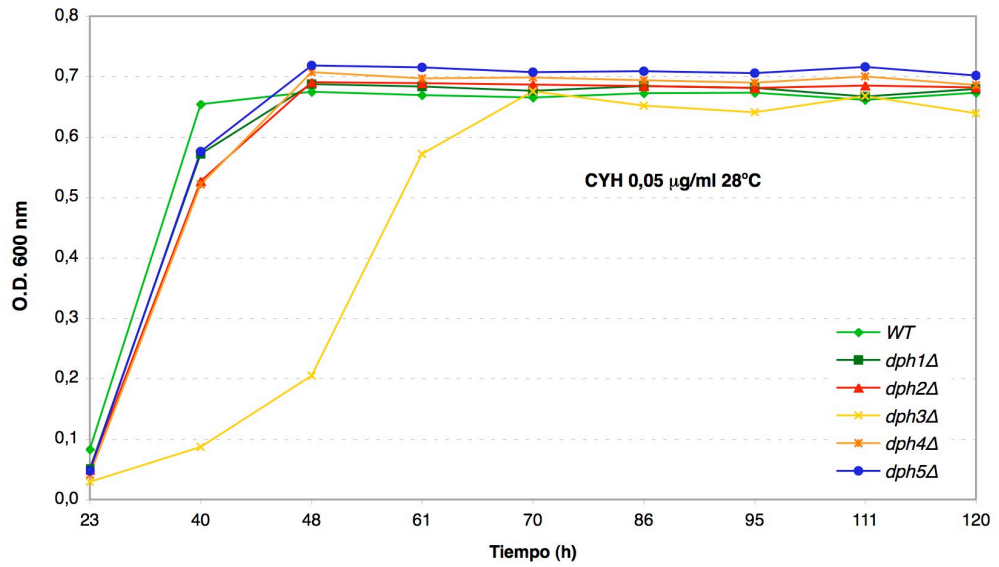
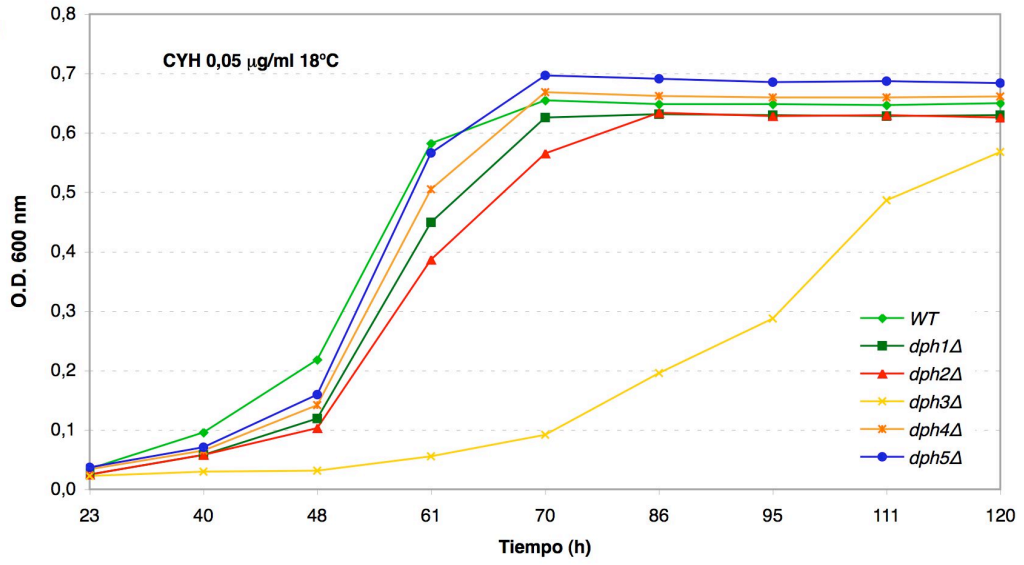
(Fig. 24d)



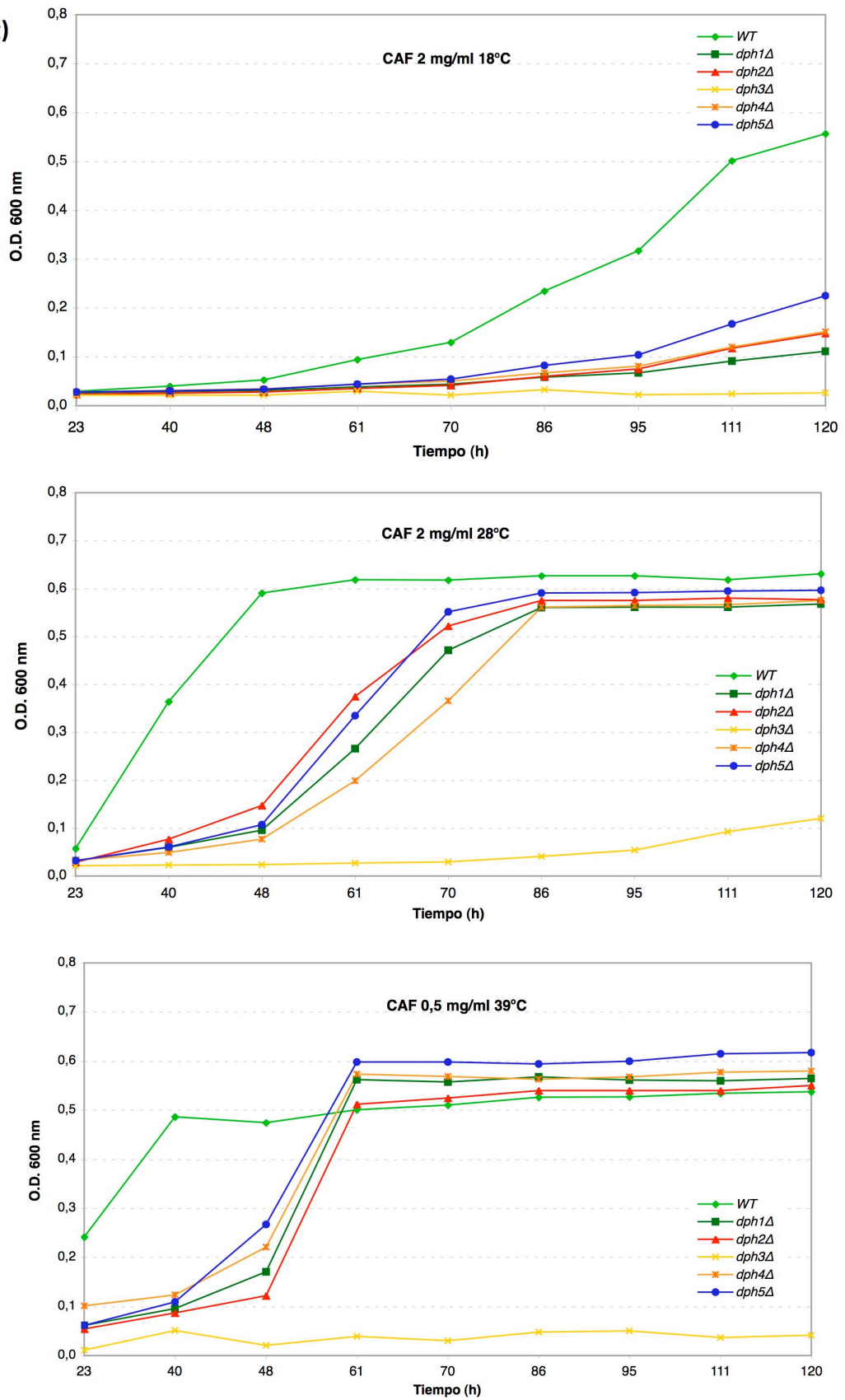
(Fig. 24e)



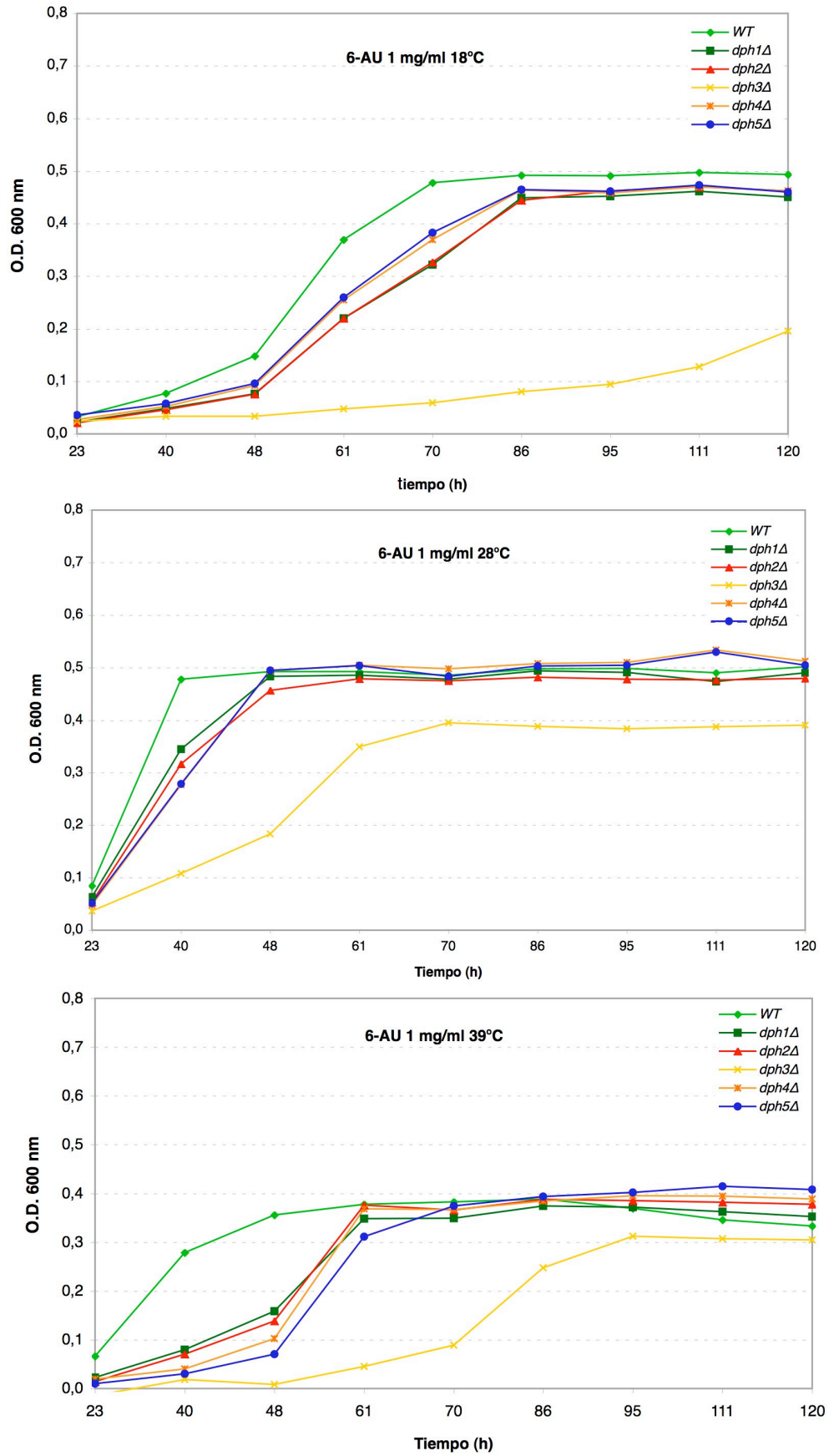
(Fig. 24f)



(Fig. 24g)



(Fig. 24h)



4.- Los Cambios de Fase de Lectura durante la Traducción

La precisión en la fidelidad durante la traducción del RNAm a proteínas se ve afectada por factores que actúan en *cis* y en *trans* durante las tres fases de la síntesis proteica (Valente and Kinzy, 2003). Durante la elongación es crucial mantener una fase de lectura de la traducción correcta. Así, la presencia de secuencias “deslizantes” (“*slippery*”) en el RNAm, junto con determinadas estructuras secundarias en el mismo, pueden dar lugar a un cambio en la decodificación del RNAm en dirección 5´ (-1) o 3´ (+1) (Harger et al., 2002), generando, por ejemplo, una proteína truncada. Este mecanismo es el empleado por la maquinaria de algunos virus para replicarse en el interior de las células huésped. Sin embargo, los mecanismos moleculares que dirigen dichos cambios de fase de lectura “programada” (PRF, de “*Programmed Ribosomal Frameshift*”) no se conocen de manera precisa (Harger et al., 2002; Leger et al., 2007; Namy et al., 2006).

En el contexto de la translocación, se ha propuesto que eEF2, y en particular la parte distal de su dominio IV, podría desempeñar un papel importante en el mantenimiento de la fidelidad de la traducción a través de la estabilización del emparejamiento codón-anticodón durante la translocación, previniendo cambios de fase de lectura (Spahn et al., 2004). La posible función de la diftamida en el mantenimiento de la fidelidad de la traducción, así como de la sordarina en la inhibición del PRF fue analizada según se describe a continuación.

4.1- La Ruta de Diftamidación y el Cambio de Fase de Lectura de la Traducción

Dado que el residuo de diftamida está localizado en el extremo del dominio IV de eEF2, región propuesta como mimetizadora del anticodón del RNAt (Wilson and Noller, 1998), se ha sugerido que dicho residuo desempeña un papel importante en la estabilización del emparejamiento codón-anticodón (Spahn et al., 2004). De esta forma, el residuo de diftamida podría participar en el mantenimiento de la fidelidad de la traducción previniendo los cambios de fase de lectura (“*frameshift*”). De hecho, se ha descrito que los mutantes que carecen de *DPH2* o *DPH5* presentan una mayor tasa de cambios de fase de lectura de la traducción del tipo -1 (Ortiz et al., 2006).

Para comprobar si el resto de mutantes en los genes *DPH* presentaban también problemas en el mantenimiento de la fase de lectura durante la traducción, se llevaron a cabo distintos experimentos (cuya metodología se puede consultar en la sección 6.3 de *Estrategia Experimental y Métodos*):

- En primer lugar, se empleó un sistema para determinar la tasa de traducción a través de un codón de parada (“*Translation termination codon readthrough*”, también conocido como “*Nonsense suppression assays*”). El sistema se basa en el uso de plásmidos con fusiones del gen 3-fosfoglicerato kinasa con el gen “*reporter*” *lacZ* cuya fase de lectura se interrumpe por la introducción entre ambos de un codón de parada prematura (Firoozan et al., 1991). Los resultados obtenidos indican que los mutantes *dph* no muestran diferencias con respecto a la cepa silvestre (datos no mostrados), resultados coincidentes con los descritos para *dph2Δ* y *dph5Δ* (Ortiz et al., 2006).
- Posteriormente, para determinar la tasa de cambio de fase de lectura de la traducción (“*frameshifting*”), empleamos un sistema basado en plásmidos con un sistema dual del gen “*reporter*” de la luciferasa (luciérnaga/*Renilla*) y las señales de cambio de fase

ribosómica programada (PRF) de los virus L-A (en dirección 5' o -1) y Ty1 (en dirección 3' o +1) (Harger and Dinman, 2003). Los resultados obtenidos con este sistema indican que los mutantes *dph*, a excepción de *dph2Δ*, presentan una mayor proporción de cambio de fase ribosómica programada en dirección 5' (-1) (Fig. 25b), mientras que los resultados de PRF +1 no muestran diferencias significativas con respecto a la cepa silvestre (Fig. 25a). Estos resultados coinciden parcialmente con los de Ortiz y colaboradores (Ortiz et al., 2006), y con los resultados recientemente publicados por Bar y colaboradores, en los que se muestra que el mutante *dph1Δ* presenta mayor proporción de cambios de fase de lectura de la traducción del tipo -1, aunque dicho fenotipo no ha sido observado en el mutante *dph3Δ* (Bar et al., 2008). La causa de las diferencias observadas entre los distintos experimentos, especialmente en lo que se refiere a *dph2Δ*, no está clara, aunque es posible que sea debida al uso de diferentes sistemas de detección, luciferasa como “reporter” en nuestro caso y β-galactosidasa (de menor sensibilidad) en el de los otros autores. Además, en nuestro caso, la delección de los locus *DPH* se realizó con el marcador de selección *LEU2*, mientras que en los otros trabajos (Ortiz et al., 2006; Bar et al., 2008) emplearon el marcador *kanMX4*. Las implicaciones funcionales de dicha diferencia son como veremos más adelante importantes en la resistencia a aminoglicósidos, pero no son evidentes en este caso.

Es lógico pensar que dado que la ausencia de diftamidación induce un aumento discreto en el cambio de fase de la traducción -1 (en los mutantes *D696A*, *I698A*, y *H699N*) (Ortiz et al., 2006), dicho fenotipo en los mutantes *dphΔ* se deba únicamente al bloqueo de la ruta de diftamidación; en cuyo caso el fenotipo observado debería ser el mismo para todos los mutantes *dphΔ*, quizá con la posible excepción de *dph3Δ*, a cuya proteína se le han asignado funciones adicionales al margen de la diftamidación, como comentaremos más adelante.

En cualquier caso, los datos indican que, al menos en algunos de los mutantes *dphΔ*, hay una mayor proporción de cambios de fase de lectura de la traducción en dirección 5' (-1) (Fig. 25b). Como ya se ha comentado, dicho fenotipo también ha sido descrito para mutantes con modificaciones en la zona distal del dominio IV de eEF2 (*D696A*, *I698A*, y *H699N*) que impiden su diftamidación (Ortiz et al., 2006). Ambos resultados indican que dicha zona de eEF2, y en especial el residuo de diftamida, son importantes en la prevención de errores en la fidelidad de la traducción, especialmente lo que afecta a cambios de fase de lectura (Spahn et al., 2004).

El significado biológico de una mayor frecuencia de cambio de fase de lectura de la traducción -1 hay que contextualizarlo en los modelos actuales de PRF y de translocación:

Según el modelo “integrado” de cambio de fase ribosómica programada (PRF) propuesto por el grupo del Dr. Dinman: a) El PRF -1 debe ocurrir cuando los sitios A y P están ocupados por RNAt. En el contexto de la elongación esto es, en teoría, después de la selección del aa-RNAt y antes de la translocación; b) El PRF +1 debe ocurrir cuando el sitio A está libre. En el contexto de la elongación esto es tras la translocación, pero antes de la llegada del nuevo aa-RNAt (Harger et al., 2002).

No obstante, estudios recientes de *cryo-EM* que han caracterizado al ribosoma “congelado” en el proceso de PRF -1, permiten concluir que este cambio de fase tiene lugar durante la translocación; concretamente en un estado “intermedio” posterior al estado pre-translocacional pero anterior al estado post-translocacional. Durante este proceso de PRF -1,

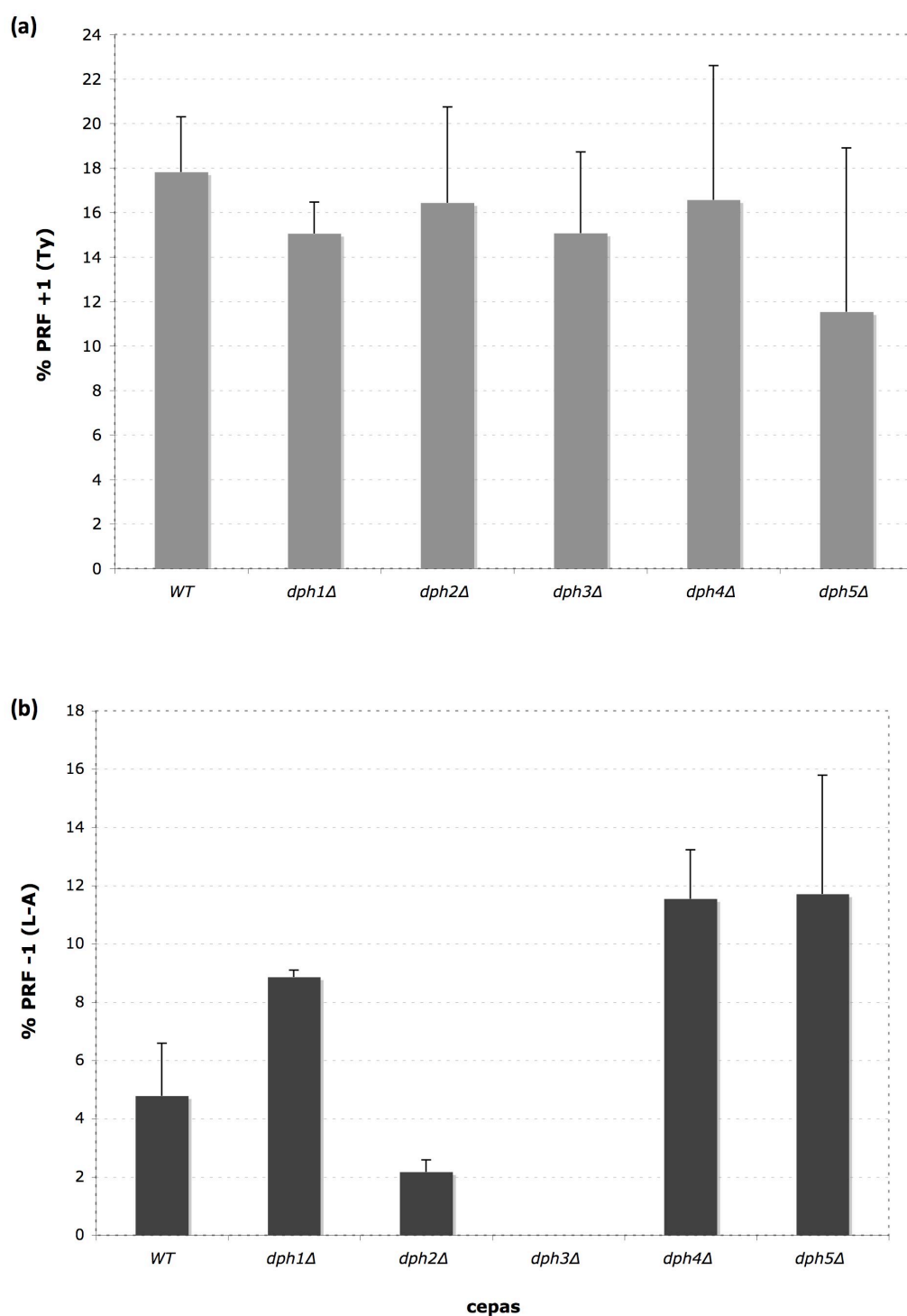


Figura 25. El cambio de fase ribosómica programada (PRF) del tipo -1 aumenta en ausencia de diftamida. El análisis del PRF +1 (a) y -1 (b), en las cepas mutantes *dphΔ* y en la cepa silvestre, se realizó transformando dichas cepas con los plásmidos Control, o con plásmidos con las señales de PRF, de los virus L-A (-1) o Ty1 (+1), colocadas entre el sistema dual de la luciferasa (luciérnaga y *Renilla*). Se emplearon tres clones independientes de cada cepa transformada. Los niveles de PRF +1 o -1 se expresan relativos al plásmido Control. Problemas técnicos impidieron disponer de los resultados de los niveles de PRF -1 para el mutante *dph3Δ*.

eEF2 se encuentra ocupando el sitio A, interactuando de forma directa con el RNAt del sitio P e impidiendo su deslizamiento hacia el sitio A y, al mismo tiempo, bloqueando la unión del RNAt en el sitio A (Namy et al., 2006). Este modelo “mecánico” de PRF -1, difiere del modelo “integrado” de Dinman y colaboradores, y sugiere que durante el PRF -1, el factor eEF2 y en especial su dominio IV desempeñan un papel importante en la tensión ejercida sobre el RNAt del sitio P y en la prevención del desplazamiento del mismo hacia el sitio A, necesario para que el PRF -1 tenga lugar (Moran et al., 2008). En ambos modelos, es posible que la ausencia de diftamidación en eEF2 neutralice los cambios conformacionales que induce la translocasa sobre los RNAts y sobre las subunidades ribosómicas, necesarios para que se complete la translocación de forma óptima, favoreciendo los fallos en la fidelidad de la traducción y, en particular el PRF -1.

Por tanto, se puede inferir que la diftamidación de eEF2 previene el PRF -1, permitiendo a eEF2 ejecutar las modificaciones estructurales necesarias para que el proceso de translocación tenga lugar de forma óptima (ver el modelo de translocación de la [Figura 19](#)), aunque por el momento se desconoce el mecanismo molecular responsable. En un contexto más amplio de mantenimiento de la fidelidad de la traducción, diversos autores han sugerido que la diftamida podría estar participando en el mantenimiento de la fase de lectura mediante su interacción con el duplex RNAm-RNAt en el sitio A (Frank et al., 2007; Jorgensen et al., 2005; Spahn et al., 2004; Taylor et al., 2007). En concreto, a través de la interacción con dos adeninas universalmente conservadas, A1492 y A1493, de la hélice 44 de la SSU, que desempeñan un papel central en el reconocimiento de los RNAts correctos en su unión al sitio A (“*decoding center*”) (Ogle and Ramakrishnan, 2005).

Puesto que los efectos de la ausencia de diftamidación del factor eEF2 sobre la fidelidad de la traducción son modestos, no se puede descartar que esta modificación post-traducciona del eEF2 ejerza otras posibles funciones adicionales.

4.2- La Sordarina y el Cambio de Fase de Lectura de la Traducción

La sordarina tiene el potencial de ser empleada como fármaco, ya que impide la retrotransposición del elemento Ty1. Esto es debido a que la sordarina inhibe el cambio de fase ribosómica programada en dirección 3' (+1) que inducen estos virus (Harger et al., 2001), que ocurre, según el modelo “integrado” de PRF, cuando el sitio A del ribosoma está vacío (Harger et al., 2002). Además, estos autores establecieron una correlación entre la resistencia a sordarina de mutantes con mutaciones en eEF2 (fundamentalmente en los dominios III y V) y en RPP0, y la inhibición de la retrotransposición de Ty1 (Harger et al., 2001).

Con objeto de profundizar en el posible papel de la sordarina en la inhibición del PRF decidimos analizar la proporción de PRF en la cepa silvestre, transformada con los plásmidos con el sistema dual de la luciferasa, en presencia de distintas concentraciones de sordarina. Los resultados obtenidos indican que la sordarina inhibe el PRF +1, inducido por la secuencia “deslizante” de Ty1, como ya había sido descrito por Harger y colaboradores (Harger et al., 2001), pero, a diferencia de estos autores, identificamos que la sordarina inhibe también el PRF -1, inducido por la secuencia “deslizante” de L-A ([Fig. 26](#)).

Según las premisas del modelo “integrado” de PRF propuesto por el grupo del Dr. Dinman, el modelo predice que la inhibición de la translocación estimularía el PRF -1 (aumentando la abundancia relativa de ribosomas con RNAt en los sitios A y P) e inhibiría el

PRF +1 (disminuyendo la abundancia relativa de ribosomas con el sitio A libre) (Harger et al., 2002).

El fenotipo observado de inhibición del PRF -1 producido por la sordarina (Fig. 26), se podría explicar por el bloqueo en el movimiento de los dominios C-terminales de eEF2, y/o por otros cambios conformacionales en el complejo eEF2•ribosoma inducidos por la acción de la sordarina (Sengupta et al., 2008; Spahn et al., 2004), que podrían a su vez impedir o limitar determinados movimientos de eEF2, o de su dominio IV, o incluso del ribosoma, de forma que se inhibiría el cambio conformacional (“deslizamiento”) del RNAt del sitio P, necesario para que ocurra el PRF -1. Dichos resultados se ajustarían al modelo “mecánico” de PRF -1, en el que, durante la translocación, el RNAt del sitio P debe sufrir un cambio conformacional (curvando el ASL del RNAt hacia el sitio A), inducido de forma conjunta por eEF2, por el ribosoma y por la estructura secundaria en el RNAm (frecuentemente en forma de “pseudo nudo”), para que tenga lugar el PRF -1 (Namy et al., 2006).

Se ha descrito que pequeños cambios en la eficiencia del PRF afectan la replicación de determinados virus, como el VIH-1 (Dulude et al., 2006). Por tanto, una de las potenciales aplicaciones prácticas del efecto inhibitorio del PRF +1 y -1 ejercido por la sordarina, podría ser su empleo en biomedicina, no ya como agente antifúngico, sino como molécula modelo para el desarrollo de un posible agente antiviral, siempre y cuando se modificara la especificidad de la molécula por la maquinaria de elongación fúngica.

Nuestros resultados y los de otros autores sugieren que la unión de sordarina a eEF2

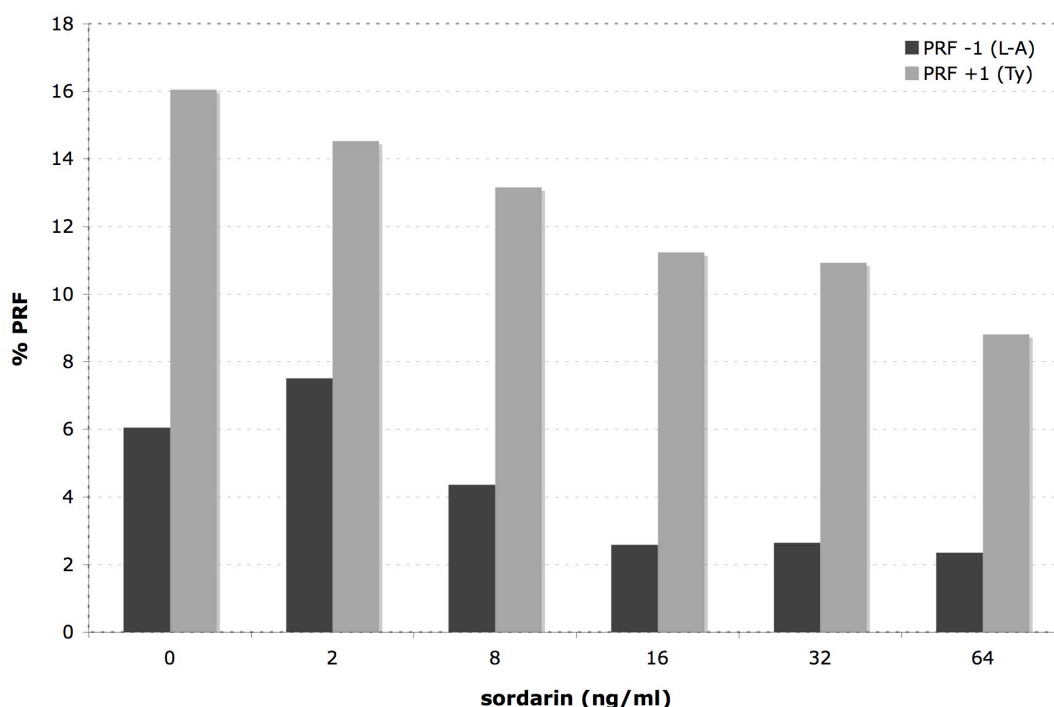


Figura 26. La sordarina inhibe el cambio de fase ribosómica programada +1 y -1. El análisis del PRF +1 y -1 en la cepa silvestre, en ausencia o en presencia de sordarina, se llevó a cabo transformando dicha cepa con los plásmidos Control, o con plásmidos con las señales de PRF, de los virus L-A (-1) o Ty1 (+1), colocadas entre el sistema dual de la luciferasa (luciérnaga y *Renilla*). Cada cepa transformada se expuso a concentraciones crecientes de sordarina, se recogieron las células en fase logarítmica, y se analizaron los niveles de PRF +1 o -1 relativos al plásmido Control.

restringe el movimiento de sus dominios C-terminales, dicha unión impide además que se produzcan los movimientos completos del dominio G' y del extremo del dominio IV que acompañan a la hidrólisis de GTP, atrapando por tanto al ribosoma en un estado translocacional intermedio tras la hidrólisis de GTP (Sengupta et al., 2008).

5.- Las Dph y el Posible Papel Molecular de la Diftamida

Por último, comentaremos brevemente el conocimiento existente sobre las proteínas Dph, para terminar con una reflexión sugiriendo la posible función molecular de la diftamida, una modificación post-traducciona identificada casi hace 30 años (Moehring et al., 1980; Van Ness et al., 1980) cuyo papel en la fisiología de la célula eucariota sigue siendo una incógnita.

5.1- Las Dph

☑ **Dph1:** Dph1, codificada por el gen *YIL103w*, es una proteína de 425 aminoácidos, que comparte un 49% de identidad con su ortólogo en ratón. El gen de mamíferos se denomina *OVCA1* o *DPH2L1*, y ha sido identificado como un supresor tumoral, con un papel importante en la regulación de la proliferación celular, desarrollo embrionario y tumorigénesis (Chen and Behringer, 2005). En ratón la pérdida de uno de los alelos induce un mayor desarrollo de tumores, mientras que la pérdida de ambos alelos da lugar a letalidad embrionaria (Chen and Behringer, 2004).

☑ **Dph2:** *DPH2/YKL191w* es un gen que codifica una proteína de 534 residuos, con una identidad del 16% con Dph1. Se ha descrito que, tanto en levaduras como en células de mamífero, Dph2 interacciona físicamente con Dph1 (Liu et al., 2004), sugiriendo que estas proteínas forman un heterodímero o participan conjuntamente en un complejo multiproteico junto con Dph3 (Bar et al., 2008; Fichtner et al., 2003).

☑ **Dph3:** Dph3, también llamada Kti11, es una pequeña y abundante proteína de la familia de proteínas CSL con dedos de zinc, que presenta un alto número de residuos conservados cargados negativamente. La ausencia de *DPH3* confiere resistencia a la toxina zymocina producida por *Kluyveromyces lactis*, fenotipo no compartido con el resto de *dphs* (Fichtner and Schaffrath, 2002). Dicha toxina, actúa a modo de RNAasa fragmentando de manera específica los RNAts que son modificados en la uridina en la primera posición del anticodón (“wobble uridines”) (U34) por la acción del complejo *Elongator* (Huang et al., 2005a). Dph3 está relacionada, física y genéticamente, con dicho complejo *Elongator* (Fichtner et al., 2003), complejo multifuncional implicado en la elongación de la transcripción vía RNAPol II, en la acetilación de histonas, en exocitosis, y en la modificación de los RNAt (Svejstrup, 2007).

No obstante, Dph3p también interacciona físicamente con eEF2, con Dph1p y Dph2p con las que parece formar un complejo, con proteínas ribosómicas (Rps7Ap y Rps19Ap), y proteínas relacionadas con el complejo *Elongator* (Kti13p) (Bar et al., 2008; Fichtner et al., 2003).

Dado que Dph3p está implicada en varias interacciones proteicas independientes, es factible que tenga varias funciones, en principio independientes, en la fisiología celular: i) funciones en la modificación post-traducciona de la uridina en primera

posición del anticodón (U34) de los RNAts (Bar et al., 2008; Huang et al., 2005a), junto con el complejo *Elongator*, importantes para la fidelidad de la traducción; ii) funciones con Kti13p (Zabel et al., 2008); y iii) funciones en la ruta de diftamidación (Liu et al., 2004), las únicas que, en principio, comparte con el resto de proteínas implicadas en la ruta.

La ausencia de Dph3p, influye por tanto en varios procesos celulares, lo que explica que el mutante en la levadura presente un fenotipo pleiotrópico, y en ratón presente letalidad embrionaria (Liu et al., 2006).

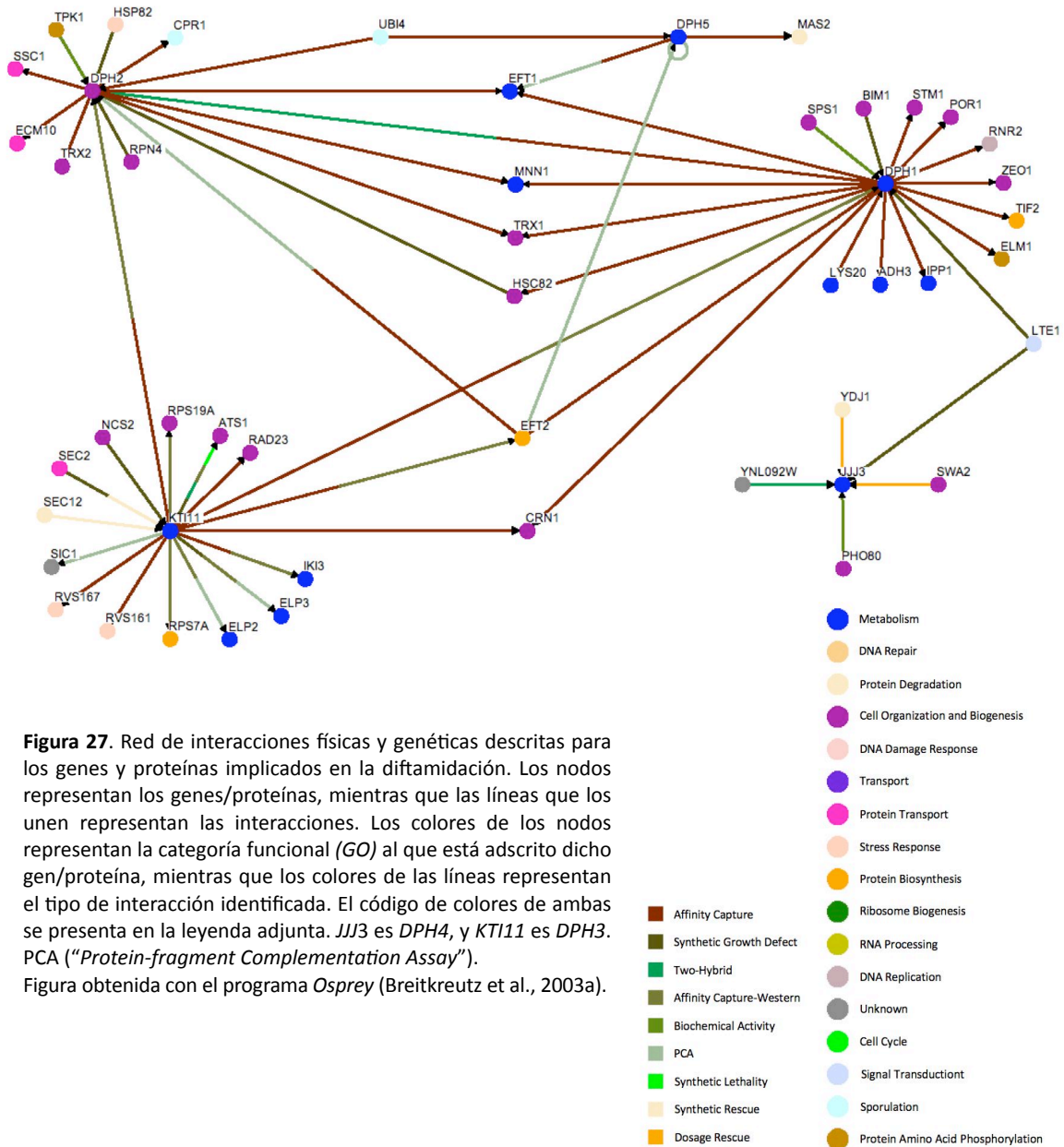
☑ **Dph4:** *DPH4* o *JJJ3/YJR097w* codifica una proteína de 172 aminoácidos de la familia de proteínas DNA-J, una familia de proteínas cuya función conocida es actuar como “co-chaperonas”, colaborando con proteínas tipo Hsp70 en el plegamiento de proteínas recién sintetizadas. Al igual que Dph3, presenta un dominio CSL de unión a zinc. Se postula que su función es asegurar el correcto plegamiento de una o más de las proteínas Dph, de eEF2, o de algún sustrato aún sin identificar (Liu et al., 2004). Ratones mutantes homocigotos para *DPH4* tienen retraso en el desarrollo embrionario y frecuente letalidad prenatal (Webb et al., 2008).

☑ **Dph5:** Dph5, codificada por el ORF *YLR172c*, es una metiltransferasa dependiente de S-adenosilmetionina que cataliza el segundo paso en la ruta de diftamidación. Esta proteína está muy conservada, presentando un 55% de identidad con su ortólogo de ratón (Liu et al., 2004).

Según un estudio masivo de localización subcelular de todas las proteínas de *S. cerevisiae*, las proteínas Dph se localizan en el citoplasma, excepto Dph3 y Dph4, que además se localizan en el núcleo (Huh et al., 2003).

5.2- Interacciones Físicas y Genéticas de las Dph

Las interacciones físicas y genéticas descritas para los genes y proteínas implicados en la diftamidación se visualizaron empleando herramientas de visualización de redes biológicas, como Osprey (Breitkreutz et al., 2003a), que a través de la base de datos de interacciones BioGRID (Breitkreutz et al., 2003b), exploran los resultados de distintos estudios proteómicos a gran escala y de escrutinios de interacciones genéticas en la levadura. La [Figura 27](#) representa las interacciones descritas para los Dph, entre las que cabe destacar aquellas comunes a varios de ellos, como Hsc82, Mnn1, Trx1, Ubi4, Crn1, Lte1, o Eft1 y Eft2; siendo estos dos últimos los únicos claramente relacionados con la elongación de la traducción, ya que ambos codifican al factor de elongación 2 (eEF2). No nos extenderemos en profundidad en este aspecto ya que, aunque este tipo de análisis puede proporcionar información interesante desde el punto de vista funcional, hay que tener en cuenta ciertas limitaciones: la naturaleza de los datos es heterogénea ya que los estudios (fundamentalmente los proteómicos) presentan distintos niveles de confianza (varía mucho el número de falsos positivos y de falsos negativos); los datos son sesgados e incompletos, como en el caso de las interacciones genéticas en las que para un determinado gen puede existir todo el rango de interacciones posibles, mientras que para otros genes apenas existen datos.



5.3- Regulación de los Genes *DPH* y de las Proteínas que Codifican

La ausencia de información referente a la regulación transcripcional de los genes *DPH*, así como de las posibles modificaciones post-transcripcionales o incluso post-traduccionales, nos llevó a recabar información al respecto. A continuación, comentaremos algunas observaciones realizadas referentes a la regulación de los genes y proteínas *Dph*.

La exploración de los datos de diversos estudios transcripcionales realizados en la levadura mediante la herramienta *Expression Connection* del SDG (Ball et al., 2001), nos ha revelado que los genes *DPH* presentan un perfil de transcripción similar en determinadas condiciones, entre las que cabe destacar las siguientes:

- Estrés ambiental (varias condiciones): los genes *DPH* se reprimen en fase estacionaria, y en choque térmico ("heat shock"), correlacionando con la expresión de genes implicados en biogénesis de ribosomas (Gasch et al., 2000).

- Cambio “diaúxico” (“*Diauxic shift*”), cambio en el metabolismo de la levadura, de crecimiento anaerobio (fermentación) a respiración, que ocurre cuando la glucosa del medio se agota: los genes *DPH* se reprimen en esta situación, de forma similar a genes implicados en síntesis de proteínas, como aquellos que codifican proteínas ribosómicas, RNAt sintetasas, y factores de iniciación y elongación (DeRisi et al., 1997).
- Rapamicina (inhibidor de TORC1): reprime fuertemente a los genes *DPH*, y dicha represión es dependiente de Tor1p. Genes implicados en traducción y en biogénesis de ribosomas tienen una respuesta transcripcional similar a los *DPH* (Huang et al., 2004), lógico teniendo en cuenta que TOR modula el crecimiento celular en respuesta a la disponibilidad de nutrientes en el medio.
- Calcio y Sodio: la expresión de los genes *DPH* se encuentra reprimida en presencia de Ca^{2+} y Na^+ (Yoshimoto et al., 2002). Este patrón transcripcional es similar al de genes implicados en la biogénesis de ribosomas.
- Deleción de *PHO85*: los genes *DPH* se encuentran reprimidos en el mutante en esta quinasa dependiente de ciclinas (Ogawa et al., 2000), implicada en regular la respuesta celular a la cantidad de nutrientes en el medio y la progresión del ciclo celular.
- Además, la expresión de los genes *DPH* fluctúa de manera periódica, de manera similar a genes implicados en traducción durante experimentos de crecimiento continuo, con picos de expresión durante el periodo en el que las células están respirando. Los autores de este estudio proponen que esto es debido a que la síntesis de proteínas es uno de los procesos celulares mas costosos energéticamente, por lo que es lógico que el ensamblaje de la maquinaria traduccional tenga lugar cuando la disponibilidad de ATP es mayor (Tu et al., 2005).

Por otro lado, la búsqueda bioinformática de potenciales motivos comunes en los promotores de los genes *DPH*, mediante el algoritmo MEME (Bailey and Elkan, 1994), ha mostrado varios motivos significativos en los promotores de los cinco genes *DPH*; siendo el más significativo el motivo GCGATG[AG], motivo que se encuentra sobre-representado en el promotor de genes que codifican proteínas del ribosoma y de la biogénesis y ensamblaje del mismo (Boden and Bailey, 2008). Aunque no hemos podido asociar dicho motivo con el sitio de unión de factores de transcripción concretos, el análisis de la literatura apunta que al menos parte del motivo es común con el motivo PAC (“*Polymerase A and C*”), motivo asociado a genes implicados en RNAr y biogénesis de ribosomas, que en *S. cerevisiae* es el sitio de unión de los factores de transcripción Pbf2/Dot6 y Pbf1/Tod6 (Zhu et al., 2009).

El análisis bioinformático de los potenciales sitios de unión de factores de transcripción a los promotores de los genes *DPH* se llevó a cabo mediante el programa YEASTRACT (Teixeira et al., 2006), revelando una serie de potenciales factores de transcripción que se podrían unir a todos los promotores de estos genes, entre los que se encuentran, Rph1, Fkh1, Fkh2, Gcr1, Gis1, Mot3, Nrg1, Msn4, Ash1, o Msn2, algunos de los cuales están relacionados con la respuesta a estrés. Mediante YEASTRACT también identificamos factores de transcripción “documentados” que regulan a los genes *DPH*, pero en este caso ninguno de estos factores regula a todos los genes *DPH*. No obstante, los factores “documentados” identificados se pueden regular unos a otros, formando una potencial red de regulación transcripcional, en

cuyo vértice se encontraría el factor Sfp1 (ver Figura 28), que en respuesta a nutrientes y estrés controla la expresión de genes ribosómicos y de biogénesis del ribosoma (Cipollina et al., 2008). Es interesante comentar que *SFP1* está a su vez regulada por TORC1 y Mrs6, de forma que Sfp1 integra las señales de las rutas de respuesta a nutrientes y estrés modulando la expresión de los genes ribosómicos y de biogénesis de ribosomas según las condiciones del medio (Lempiainen et al., 2009). Adicionalmente, la exploración bibliográfica nos ha permitido descubrir que había sido descrita la presencia de un sitio PAC consenso en el promotor de *DPH2* (Wade et al., 2006); así como la unión de unión de los factores de transcripción Rap1, Fhl1 y Hmo1, implicados en la regulación de genes ribosómicos, al promotor de *DPH3/KTI11* (Kasahara et al., 2007).

Desde el punto de vista de la regulación post-traduccional, un estudio masivo de proteínas que son fosforiladas por quinasas conocidas, ha mostrado que Dph1, Dph2 y Dph4 son fosforiladas por Sps1, Tpk1, y Pho85, respectivamente (Ptacek et al., 2005). Tpk1 y Pho85 están implicadas en la regulación de la respuesta celular a la presencia de nutrientes y de condiciones estresantes en el medio.

Todas estas observaciones sugieren que los genes *DPH*, junto con genes implicados en la ensamblaje de la maquinaria traduccional, se transcriben de forma coordinada como respuesta adaptativa de la célula frente a determinadas condiciones del medio, en general disminuyendo su expresión en respuesta a falta de nutrientes en el medio. Los datos sugieren que al menos parte del control transcripcional de los genes *DPH* se podría producir por la vía de TORC1, encargada de orquestar la respuesta de la célula frente a cambios en el medio, ya sean nutricionales o condiciones estresantes. Sería interesante estudiar, en mayor profundidad, otras condiciones en las que estos genes estén co-regulados, y de forma experimental caracterizar los factores de transcripción responsables de dicha regulación.

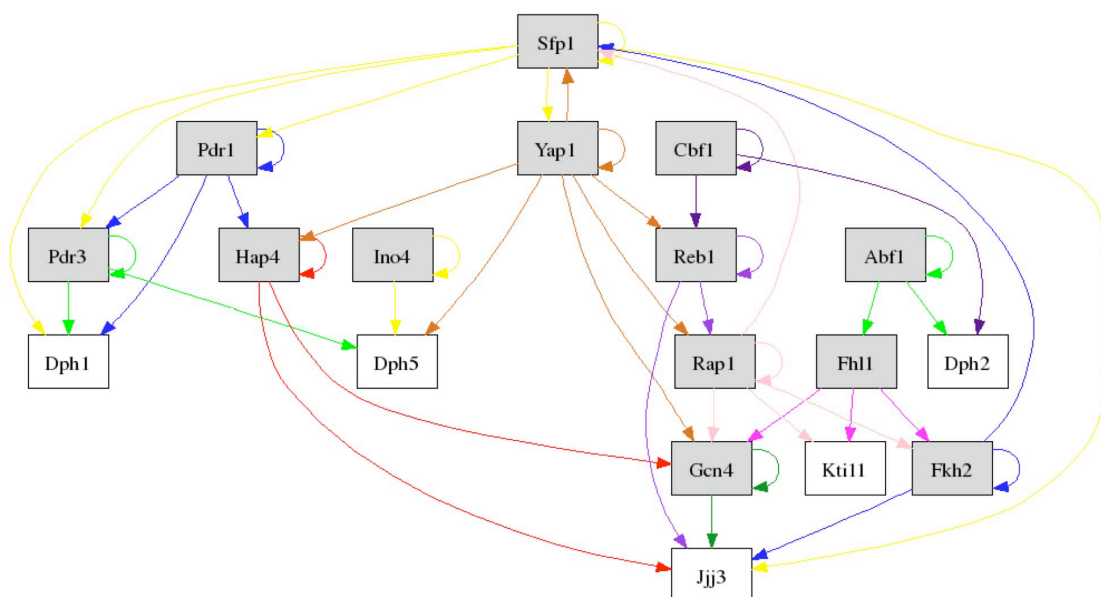


Figura 28. Posible red de regulación transcripcional de los genes *DPH*. Empleando el programa YEASTRACT (Teixeira et al., 2006) se identificaron los factores de transcripción “documentados” (cajas grises) que regulan a los genes de la ruta de biosíntesis de diftamida (cajas blancas), así como las regulaciones entre ellos. *JJJ3* es *DPH4*, y *KTI11* es *DPH3*.

5.4- Hipótesis acerca del Posible Papel Molecular y Fisiológico de la Diftamida

Aunque la modificación post-traducciona de la histidina conservada (His699 en *S. cerevisiae*/His715 en humanos) de eEF2 hasta diftamida precisa de al menos seis enzimas (Liu et al., 2004), las células que carecen de diftamida, ya sean células animales o levaduras, son viables (Chen et al., 1985; Liu et al., 2004; Phan et al., 1993); y eEF2 sin diftamida es capaz de llevar a cabo su función en la síntesis proteica a una velocidad y con una precisión suficientes como para mantener la viabilidad celular (ver la Fig. 23). La cuestión que surge es, por qué esta compleja y aparentemente prescindible modificación post-traducciona ha evolucionado y se ha mantenido en eucariotas y en arqueobacterias (Pappenheimer et al., 1983). Además, el que los organismos eucariotas conserven la diana que les hace susceptibles al ataque de bacterias patógenas, indica claramente que la diftamida debe de tener un papel clave en la fisiología celular. Este papel debe de ser sutil, dada la no esencialidad de la diftamidación, y es posible que su importancia se ponga de manifiesto en determinadas condiciones ambientales, como en condiciones de estrés o carencia de nutrientes, o en el contexto de un organismo pluricelular. En relación con este último punto, y como ya hemos comentado anteriormente, la diftamida tiene una función importante durante el desarrollo del ratón (Chen and Behringer, 2004; Liu et al., 2006; Webb et al., 2008), sugiriendo que incluso cambios relativamente pequeños en la fidelidad, en la eficiencia de la traducción, o incluso en la traducción de determinados RNAm, puede tener efectos importantes en el desarrollo del animal.

Diversas investigaciones han tratado de dilucidar el papel de la diftamida, y se han formulado numerosas hipótesis acerca de la posible función celular de la diftamidación. A continuación, comentaremos algunas de las más relevantes y plantearemos nuestro modelo sobre la base del conocimiento generado:

- Leppla y colaboradores han observado que mutantes en la ruta de diftamidación son sensibles a ricina, una proteína inactivadora del ribosoma (*RIP*), y sugieren que la diftamida puede haber surgido para proteger a los ribosomas contra la acción de las *RIPs*. Las *RIPs* son proteínas tóxicas producidas por hongos (*alpha-sarcin*), bacterias patógenas (toxina Shiga), o plantas (ricina) que se unen al ribosoma en el mismo sitio que eEF2 y cortan el RNA de la unidad ribosómica grande, inhibiendo la traducción (Gupta et al., 2008).
- Otra alternativa es que la diftamida, como posible sitio de ADP-ribosilación endógena, tenga una función reguladora sobre eEF2 y en consecuencia sobre la síntesis proteica. Se ha sugerido la existencia una ADP-ribosiltransferasa endógena, con el mismo mecanismo de acción que la DT (Fendrick et al., 1992; Iglewski et al., 1984; Lee and Iglewski, 1984). Sería factible que en determinadas condiciones, por ejemplo falta de nutrientes o entrada en fase estacionaria, una fracción del eEF2 celular se ADP-ribosilara, disminuyendo la síntesis de proteínas total. Dicha ADP-ribosilación endógena podría ser eliminada cuando las condiciones varíen mediante la acción de ADP-ribosil hidrolasas (Mueller-Dieckmann et al., 2006).
- Se ha propuesto que el extremo del dominio IV de eEF2 mimetiza el anticodón del RNAt (Wilson and Noller, 1998). De acuerdo con este modelo, la diftamida podría actuar estabilizando la interacción codón-anticodón durante la translocación, participando en el mantenimiento de la fidelidad de la traducción. La sensibilidad a

paromomicina de los mutantes en el dominio IV de eEF2 (*D696A*, *I698A*, y *H699N*) (Ortiz et al., 2006) y *dph3Δ* (Bar et al., 2008), junto a los problemas para mantener la fidelidad de la traducción de *dph1Δ* (Bar et al., 2008), *dph2Δ*, *dph5Δ* y de los mutantes en el dominio IV de eEF2 (Ortiz et al., 2006), apoyan esta hipótesis. La sensibilidad de los mutantes en la ruta de diftamidación a los aminoglicósidos paromomicina, neomicina, geneticina, e higromicina B (Fig. 24b-e), así como la mayor proporción de cambios de fase de lectura de la traducción en dirección 5' (-1) observada en dichos mutantes (Fig. 25), fortalecen la idea de que el extremo del dominio IV de eEF2, y en particular el residuo de diftamida, es importante para que el proceso de translocación ocurra de forma óptima, y en particular para prevenir errores en la fidelidad de la traducción (Spahn et al., 2004).

- Nuestra hipótesis se fundamenta en la idea previamente expuesta, pero haciendo especial hincapié en el papel mecánico/estructural del residuo de diftamida y en su dinámica durante la translocación, donde el mantenimiento de la fidelidad de la traducción sería circunstancial (secundaria). Es probable que la diftamida en eEF2 actúe a modo de resorte o palanca, influyendo en el estado conformacional del ribosoma durante el proceso de elongación, favoreciendo que durante dicho proceso tengan lugar las interacciones adecuadas, entre el ribosoma, eEF2, los RNAts y el RNAm, para que la translocación ocurra de forma eficiente. El mecanismo preciso por el cual tienen lugar estas modificaciones no está del todo definido, pero el modelo propuesto es el siguiente:

i) La unión de eEF2 al ribosoma induce un movimiento de rotación (“*ratcheting*”) de la SSU, que induce la estabilización de los RNAt en su estado híbrido (Fig. 19 paneles a y b). En esta etapa, el extremo del dominio IV de eEF2, donde se localiza el residuo de diftamida, se encuentra en contacto con duplex anticodón RNAt-codón RNAm del sitio A. Se ha sugerido que esta interacción podría estabilizar el apareamiento de bases codón-anticodón.

ii) La posterior hidrólisis de GTP induce cambios conformacionales en eEF2. Como resultado de los mismos, el extremo del dominio IV de eEF2 se desplaza interrumpiendo las interacciones que se producen durante el proceso de “descifrado”, entre el duplex anticodón RNAt-codón RNAm del sitio A y las adeninas universalmente conservadas de la hélice 44 de la SSU. La liberación de dicha unión (“*unlocking*”) permite que la cabeza de la SSU rote en la dirección de la translocación, movimiento que arrastra a los RNAts a su posición final (Fig. 19 paneles c y d). Además, el movimiento de la diftamida hace replegarse a las adeninas en el surco menor de la hélice 44 de la SSU, “poniendo a cero” el centro de “descifrado” del ribosoma para otra ronda de elongación (Frank et al., 2007; Sengupta et al., 2008; Taylor et al., 2007) (la Película adjunta en el DVD, producida por Taylor et al., 2007, permite visualizar la compleja dinámica de movimientos que tiene lugar durante la translocación).

iii) Los modelos sugieren que la translocación se completa mediante la combinación del movimiento inverso de la cabeza de la SSU y la rotación inversa (“*reverse ratcheting*”) de toda la SSU, que ocurren cuando eEF2•GDP

se disocia del ribosoma (Fig. 19 panel e). El papel de la diftamida durante esta etapa no está claro, pero algunos autores sugieren que podría impedir que el RNAt del sitio P se deslice hacia el sitio A, induciendo un cambio de fase de lectura. En apoyo de este modelo hay evidencias experimentales de que efectivamente la diftamida interacciona con las dos adeninas universalmente conservadas de la hélice 44 de la SSU (Jorgensen et al., 2005; Yates et al., 2006), las cuales, como ya hemos comentado, tienen un papel central en el reconocimiento de los RNAts correctos en la unión al sitio A.

No queremos dejar de apuntar la posible regulación de la traducción de forma dependiente de la diftamidación, ya sea mediante la ADP-ribosilación endógena de eEF2 vía diftamida, o directamente mediante la diftamidación de la translocasa. También es importante señalar que es posible que en la célula co-existan fracciones de eEF2 diftamidado y sin diftamidar, con lo cual su función en translocación no sería “todo o nada”, sino que habría una modulación fina del proceso de translocación, y que, como hemos apuntado, podría depender de las condiciones del medio. Experimentos no publicados del grupo del Dr. Gerald Fink, muestran que los mutantes *dph* son sensibles a rapamicina, pierden viabilidad, y tardan más en recuperarse tras mantener a las células en cultivo durante tiempos largos de incubación (Milne, G.T., and Fink, G.R. (1998). *The biosynthesis of diphthamide and its role in stationary phase. Yeast Genetics and Molecular Biology Meeting* 1998). Estos resultados, junto a la sensibilidad a la cafeína de dichos mutantes (Fig. 24g) y a la posible regulación transcripcional de los genes *DPH* dependiente de la disponibilidad de nutrientes, sugieren que la diftamida podría estar participando en la regulación de la traducción en respuesta a la disponibilidad de nutrientes en el medio. Es posible también, que la diftamidación sea una modificación adicional dentro del modelo de regulación traduccional recientemente planteado, que sería equiparable en cuanto a complejidad al modelo actual de regulación de la transcripción. Según este modelo, habría heterogeneidad en el proceso de traducción, debido a modificaciones post-traduccionales de las proteínas que participan en la traducción, a la existencia de parálogos en las proteínas ribosómicas, o de diferentes formas de RNA. Todo ello, contribuiría a la existencia de un “código ribosómico”, que regularía de manera diferente la traducción de distintos RNA mensajeros según las condiciones del medio o las condiciones fisiológicas de la célula (Komili et al., 2007).

La elevada conservación evolutiva de la diftamida y el mantenimiento de una ruta de biosíntesis tan compleja, indican que debe cumplir una función fundamental en la célula. Diversos estudios han tratado de arrojar luz al respecto, pero debido a la complejidad intrínseca del proceso de translocación, quedan aún muchas incógnitas sobre su función a nivel molecular y en la fisiología de la célula. Investigaciones recientes sobre la participación en elongación y su posible implicación en translocación de eIF5A, un factor descrito como de iniciación, y única proteína en eucariotas y arqueas que se modifica post-traduccionalmente en la lisina 51 al aminoácido hipusina (Saini et al., 2009), suscitan nuevas cuestiones acerca de la regulación de la traducción y su elevada complejidad.

La especificidad de la diftamida en eucariotas y arqueobacterias, su papel en la síntesis de proteínas, y su posible regulación, hacen que eEF2 diftamidado constituya una potencial

diana molecular para controlar la proliferación celular. Podemos especular que una vez que se defina la proporción de eEF2 diftamidado en la célula, y si ésta varía dependiendo del tipo celular o estado fisiológico de la célula, se podría tratar de inhibir la síntesis proteica de forma específica en determinadas células con proliferación aberrante. Como hipotética herramienta farmacológica sería posible emplear toxinas modificadas que se unan a la fracción de eEF2 diftamidado, como podría ser el caso de la DT, o que se unan a la fracción de eEF2 sin diftamidar, como podría ser el caso de las RIPs.

Por último, la diftamida o algunas de las proteínas implicadas en su síntesis, podrían tener funciones adicionales, entre las que se podría encontrar el control de la estabilidad proteica durante la traducción, en el caso de Dph4p.

Capítulo III
Ácido Micofenólico
y 4-NQO

Capítulo III: Ácido Micofenólico y 4-NQO

1.- Ácido Micofenólico y 4-Nitroquinolina 1-óxido: Antecedentes y Objetivos

Uno de los objetivos del proyecto *LEVAS3* incidía en el estudio de la relación entre transcripción e inestabilidad genómica y, en particular, en la identificación de factores implicados en la reparación del DNA acoplada al proceso de transcripción. El objetivo último es tratar de comprender los mecanismos responsables de la inestabilidad genómica en eucariotas, en particular aquellos relacionados con la transcripción.

En colaboración con el grupo del Dr. Andrés Aguilera (Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa, Sevilla) se planificó la identificación y análisis de mutantes nulos de *S. cerevisiae* sensibles al ácido micofenólico (MPA) y a 4-nitroquinolina 1-óxido (4-NQO), empleando para ello el abordaje genético y funcional del genoma de *S. cerevisiae* descrito en la sección *Estrategia Experimental y Métodos*. El empleo del MPA en el escrutinio realizado se basa en el efecto negativo que ejerce dicho compuesto sobre la elongación de la transcripción, mientras que el uso de 4-NQO se fundamenta en el tipo de daño en el DNA que genera.

2.- El Ácido Micofenólico, un Inhibidor de la IMPDH

El ácido micofenólico (MPA) o micofenolato (ver Fig. 15), es un inmunosupresor de origen natural producido por especies del hongo *Penicillium*, que muestra una amplia gama de actividades biológicas, que incluyen acción antibacteriana, antifúngica, antiviral y antitumoral (Bentley, 2000).

El MPA es un inhibidor no competitivo y reversible de la inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH) (Nimmegern et al., 1996), la enzima que cataliza la conversión de inosina monofosfato (IMP) en xantosina monofosfato (XMP) y, consecuentemente, es el punto de control de la tasa de síntesis de guanosina monofosfato (GMP) en la ruta *de novo* de biosíntesis de purinas (ver ruta metabólica en el SGD: <http://pathway.yeastgenome.org//YEAST/NEW-IMAGE?type=NIL&object=DENOVOPURINE3-PWY>). Por tanto, la acción del MPA provoca una gran reducción de los niveles intracelulares de GTP (Qiu et al., 2000) y, en última instancia, inhibe la síntesis de DNA.

Este fármaco, que se comercializa bajo las marcas CellCept (Roche) y Myfortic (Novartis Pharmaceuticals Corporation), se emplea en clínica como agente inmunosupresor para prevenir rechazos en el trasplante de órganos y en el tratamiento de algunas enfermedades autoinmunes, gracias al control que ejerce sobre la proliferación de linfocitos B y T; ya que éstos dependen totalmente de la ruta *de novo* de biosíntesis de purinas (Eugui et al., 1991).

La levadura *S. cerevisiae* ha sido utilizada como modelo para estudiar la respuesta celular a MPA a nivel de ciclo celular (Sagot et al., 2005), y para identificar potenciales dianas del fármaco (Escobar-Henriques et al., 2001). Además, empleando la colección completa de mutantes de delección en genes no esenciales de *S. cerevisiae*, se han realizado escrutinios fenotípicos a gran escala para caracterizar el efecto a nivel celular del tratamiento con MPA. Estos estudios han puesto de manifiesto la hipersensibilidad a MPA de mutantes afectados en el proceso de transcripción (Desmoucelles et al., 2002).

3.- El 4-NQO, un Carcinógeno Modelo que “Mimetiza” a la Luz UV

La 4-nitroquinolina 1-óxido (4-NQO) (ver Fig. 15), es un derivado de la quinolina que se emplea en investigación como agente tumorigénico modelo y cuyas propiedades carcinogénicas y mutagénicas son conocidas desde el año 1957 (Nakahara et al., 1957). Es un compuesto que “mimetiza” el efecto de la luz ultravioleta (UV) a 254 nm, ya que genera en el DNA lesiones en forma de aductos de alto peso molecular (“*bulky adducts*”). Para reaccionar con el DNA, el 4-NQO debe primero activarse metabólicamente a 4-hidroxi-aminoquinolina 1-óxido, molécula que es capaz de establecer monoadductos estables con las purinas a través de la formación de enlaces covalentes con C8 o N2 deoxiguanina, y con N6 deoxiadenina (Bailleul et al., 1989; Galiegue-Zouitina et al., 1986; Nagao and Sugimura, 1976; Tada and Tada, 1976). Las lesiones en el DNA producidas por el 4-NQO, al igual que las producidas por la luz UV, son reparadas mayoritariamente por la maquinaria de reparación de DNA por escisión de nucleótidos (NER, de “*Nucleotide Excision Repair*”). La maquinaria de NER reconoce la distorsión en el DNA producida por el aducto y provoca su eliminación mediante dos cortes de cadena sencilla en el DNA a ambos lados del aducto, generando un hueco o “*gap*”, que es finalmente rellenado por la DNA polimerasa (Hoeijmakers, 1993; Prakash et al., 1993).

El 4-NQO es, además, un potente inductor de estrés oxidativo debido a que sufre ciclos de oxidación-reducción en los que genera especies reactivas de oxígeno (ROS) como el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno que, a su vez, pueden convertirse en otros ROS como el oxígeno singlete y los radicales hidroxilo (Nunoshiba and Demple, 1993). Todo ello, contribuye al estrés oxidativo, que puede desembocar en mayor daño al DNA (Yamamoto et al., 1993).

En *S. cerevisiae* se han realizado varios escrutinios con la colección de deletantes para estudiar el efecto a nivel celular de agentes genotóxicos que generan distintos tipos de daño en el DNA (ver Tabla 3). Algunos de estos escrutinios han incluido al carcinógeno 4-NQO, dando lugar a la identificación de un grupo de mutantes sensibles a dicho compuesto entre los que destacan por su hipersensibilidad varios mutantes afectados en el proceso NER (Begley et al., 2004; Hillenmeyer et al., 2008; Lee et al., 2005; Said et al., 2004).

4.- Reparación de DNA Acoplada a la Transcripción

Como se ha descrito anteriormente, la reparación por escisión de nucleótidos (NER) es una vía de reparación del DNA que se encarga de reconocer y eliminar bases del DNA que se encuentran modificadas con grandes aductos (“*bulky adducts*”) así como uniones intracatenarias de nucleótidos, como las producidas por los dímeros de pirimidina inducidos por luz UV. En el proceso de reconocimiento del daño en el DNA, la maquinaria de NER se subdivide en dos rutas: una reconoce el daño que se produce a nivel genómico (GG-NER o GGR, de “*Global Genome Repair*”), mientras que la otra ruta se circunscribe al daño que se produce en aquellas zonas que se están transcribiendo de manera activa (TC-NER o TCR, de “*Transcription Coupled Repair*”).

Algunas revisiones recientes abordan los mecanismos que generan inestabilidad genómica haciendo particular énfasis en aquéllos relacionados con el proceso de transcripción (Aguilera and Gomez-Gonzalez, 2008; Hanawalt and Spivak, 2008).

A pesar de los numerosos estudios realizados en este tema, el proceso de TC-NER es uno de los procesos de reparación del DNA menos conocidos a nivel molecular. Por ello, en este

trabajo, nos planteamos como objetivo la identificación de nuevos elementos celulares implicados en transcripción y en TC-NER, para así, mejorar nuestro conocimiento sobre la conexión funcional existente entre TC-NER y la elongación de la transcripción.

Los resultados de este trabajo se presentan a continuación en la correspondiente separata del artículo (Gaillard et al., 2009).

Genome-Wide Analysis of Factors Affecting Transcription Elongation and DNA Repair: A New Role for PAF and Ccr4-Not in Transcription-Coupled Repair

Hélène Gaillard^{1,2}, Cristina Tous^{1,2}, Javier Botet³, Cristina González-Aguilera^{1,2}, Maria José Quintero², Laia Viladevall⁴, María L. García-Rubio^{1,2}, Alfonso Rodríguez-Gil², Antonio Marín², Joaquín Ariño⁴, José Luis Revuelta³, Sebastián Chávez², Andrés Aguilera^{1,2*}

1 Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa CABIMER, Universidad de Sevilla-CSIC, Sevilla, Spain, **2** Departamento de Genética, F. Biología, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain, **3** Instituto de Microbiología Bioquímica, Universidad de Salamanca-CSIC, Salamanca, Spain, **4** Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, F. Veterinaria, Universitat Autònoma Barcelona, Barcelona, Spain

Abstract

RNA polymerases frequently deal with a number of obstacles during transcription elongation that need to be removed for transcription resumption. One important type of hindrance consists of DNA lesions, which are removed by transcription-coupled repair (TC-NER), a specific sub-pathway of nucleotide excision repair. To improve our knowledge of transcription elongation and its coupling to TC-NER, we used the yeast library of non-essential knock-out mutations to screen for genes conferring resistance to the transcription-elongation inhibitor mycophenolic acid and the DNA-damaging agent 4-nitroquinoline-N-oxide. Our data provide evidence that subunits of the SAGA and Ccr4-Not complexes, Mediator, Bre1, Bur2, and Fun12 affect transcription elongation to different extents. Given the dependency of TC-NER on RNA Polymerase II transcription and the fact that the few proteins known to be involved in TC-NER are related to transcription, we performed an in-depth TC-NER analysis of a selection of mutants. We found that mutants of the PAF and Ccr4-Not complexes are impaired in TC-NER. This study provides evidence that PAF and Ccr4-Not are required for efficient TC-NER in yeast, unraveling a novel function for these transcription complexes and opening new perspectives for the understanding of TC-NER and its functional interconnection with transcription elongation.

Citation: Gaillard H, Tous C, Botet J, González-Aguilera C, Quintero MJ, et al. (2009) Genome-Wide Analysis of Factors Affecting Transcription Elongation and DNA Repair: A New Role for PAF and Ccr4-Not in Transcription-Coupled Repair. *PLoS Genet* 5(2): e1000364. doi:10.1371/journal.pgen.1000364

Editor: James M. Ford, Stanford University School of Medicine, United States of America

Received: July 11, 2008; **Accepted:** December 31, 2008; **Published:** February 6, 2009

Copyright: © 2009 Gaillard et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This research was funded by a grant from the Spanish Ministry of Science and Education (GEN2001-4707-C08 and BFU2006-05260) and the Junta de Andalucía (CVI-625). HG was supported by a grant from the Swiss National Science Foundation (PA00A-105027).

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

* E-mail: aguilo@us.es

Introduction

Synthesis of an RNA transcript by RNA polymerase II (RNAPII) requires the successful completion of at least four steps in the transcription cycle: promoter binding and initiation, promoter clearance, elongation, and termination. While many studies have focused on the regulation of initiation, more recent studies have demonstrated that transcription elongation is a dynamic and highly regulated stage of the transcription cycle capable of coordinating downstream events. Numerous factors have been identified that specifically target elongation [1]. Importantly, multiple steps in mRNA maturation, including pre-mRNA capping, splicing, 3'-end processing, surveillance, and export, are modulated through interactions with the RNAPII machinery [2,3]. It also appears that distinct factors act in specific transcriptional contexts; the requirements of these factors are largely unknown and highlight the need to improve our understanding of elongation *in vivo*. Several lines of evidence indicate that transcript elongation by RNAPII involves frequent pausing and stalling, and an important role of the many accessory factors may be to minimize the negative impact of such events on transcription [4].

Nucleotide excision repair (NER) is an evolutionarily conserved DNA repair pathway that deals with severely distorting DNA lesions including intrastrand crosslinks such as UV-induced pyrimidine dimers (CPDs) and DNA bulky adducts such as those generated by the model carcinogen 4-nitroquinoline-N-oxide (4-NQO). Within NER two damage-sensing pathways are recognized: one for the entire genome, global genome repair (GG-NER), and the other for transcribed strand of active genes, transcription coupled repair (TC-NER). As ongoing transcription is required for TC-NER, damage recognition is likely triggered by the elongating RNAP itself, whose progression gets obstructed at the site of damage. RNAP arrests at injuries in the template strand initiating, likely via additional specific factors, the recruitment of the DNA repair machinery [5,6].

In eukaryotes, the precise mechanism of TC-NER remains poorly understood. Mutations in proteins required for NER lead to severe disorders known as Xeroderma pigmentosum and Cockayne's syndrome. One of these proteins, Cockayne syndrome B protein (CSB), and its yeast orthologue Rad26, share conserved functions [7,8] and represent putative eukaryotic transcription-repair coupling factor (TRCF) candidates. The putative function of CSB as a TRCF has been substantiated by *in vitro* reconstitution

Author Summary

Dealing with DNA lesions is one of the most important tasks of both prokaryotic and eukaryotic cells. This is particularly relevant for damage occurring inside genes, in the DNA strands that are actively transcribed, because transcription cannot proceed through a damaged site and the persisting lesion can cause either genome instability or cell death. Cells have evolved specific mechanisms to repair these DNA lesions, the malfunction of which leads to severe genetic syndromes in humans. Despite many years of intensive research, the mechanisms underlying transcription-coupled repair is still poorly understood. To gain insight into this phenomenon, we undertook a genome-wide screening in the model eukaryotic organism *Saccharomyces cerevisiae* for genes that affect this type of repair that is coupled to transcription. Our study has permitted us to identify and demonstrate new roles in DNA repair for factors with a previously known function in transcription, opening new perspectives for the understanding of DNA repair and its functional interconnection with transcription.

of the TC-NER initiation steps, in which an elongating RNAPII arrested at a DNA lesion was shown to mediate an ATP-dependent incision of the damaged DNA only in the presence of CSB [9]. XPG, one of the structure-specific DNA endonuclease responsible for the removal of an oligonucleotide containing the DNA lesion in NER, is another protein involved in TC-NER. Recent results imply a coordinated recognition of stalled RNAPII by XPG and CSB in TC-NER initiation in mammalian cells and suggest that TFIIF-dependent remodeling of stalled RNAPII without release may be sufficient to allow repair [10]. In yeast, the Rpb4 and Rpb9 subunits of RNAPII have also been shown to contribute to TC-NER [11,12]. Recently, proteins of the THO, Sub2-Yra1 and Thp1-Sac3 complexes, which are involved in mRNP biogenesis and export [13], have also been shown to be required for efficient TC-NER [14].

In addition, RNAPII is subject to ubiquitylation and proteasome-mediated degradation in response to UV damage [15]. It has been proposed that degradation of damage-stalled RNAPII complexes might assist TC-NER [16]. Indeed, recent studies in yeast have shown that arrested RNAPII elongation complexes are the preferred substrate for ubiquitylation, which is mediated by Def1, Rpb9, and the C-terminal repeat domain (CTD) of RNAPII [17–19].

To improve our knowledge of gene products that function at the interface between transcription and DNA repair, we used a yeast mutant library covering the yeast non-essential genes for a genome-wide analysis of the genes conferring resistance to the inosine monophosphate dehydrogenase inhibitor mycophenolic acid (MPA), and the DNA-damaging agent 4-NQO. This approach allowed us to identify new putative candidates for genes involved in transcription and TC-NER. Our study unravels a new function for known transcription complexes in TC-NER and open new perspectives for the understanding of TC-NER and its functional interconnection with transcription elongation.

Results

Genome-Wide Analysis of mRNA Accumulation and 4-NQO- and MPA-Sensitivity

We were interested in analyzing and comparing the genes conferring resistance to 4-NQO and MPA. To explore the functional consequences of the treatments with 4-NQO and MPA,

we first determined the expression levels of the whole genome after treating wild-type cells with either 75 ng/ml 4-NQO or 50 µg/ml MPA during 30 min each. Expression of a total of 2374 genes was evaluated by microarray analysis (data available at www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/ under the access number GSE11561). Among these genes, mRNA levels that were at least 2-fold above or below mock treated cells were found for 376 genes in cells treated with 4-NQO and for 295 genes in cells treated with MPA (Table S1). Of the genes affected by either treatment, very few were coincident, which is consistent with the fact that 4-NQO and MPA affect different cellular processes (Figure 1A). Ontology analysis of the 644 genes showing significant variations in expression levels indicated that there is not a relevant class of genes specifically affected by any of the compounds used (data not shown).

For the analysis of genes required for resistance to 4-NQO and MPA, a collection of 4894 yeast haploid knock-out mutants, covering 85% of all yeast genes and virtually all (99,4%) of yeast non-essential genes, were grown in SC medium supplemented either with 150 ng/ml 4-NQO or 25 µg/ml MPA. Cells were incubated at 30°C and growth monitored after 48, 72, and 120 for 4-NQO and 72 hours for MPA. Analysis of the strains showing at least 80% growth inhibition by 4-NQO at the indicated time led to a classification of sensitive strains into three groups (Table S2): group A contains 189 strains whose sensitivity to 4-NQO is observed from early on (48 h) and is maintained over time, B contains 308 strains whose sensitivity was observed only at early time points (48 h), and C contains 100 slow-growing strains whose sensitivity is observed later on (from 72 h). Direct comparison of cell sensitivity to different DNA-damaging agents and stress conditions (4-NQO, methyl-methanesulfonate [MMS], menadione [Mnd], UV, and 37°C) in a selection of 4-NQO-sensitive mutants validated our high-throughput results and confirmed that 4-NQO in addition to being a ‘UV-mimetic’ agent, causes oxidative damage (Table S3). In the same line, comparison of the mutants found sensitive to 4-NQO with the mutants found sensitive to at least one of five oxidants [20] revealed that 35% of the 4-NQO sensitive strains are sensitive to oxidative damage as well. As compared to a genome-wide study in which deletion strains were pooled and grown competitively in the presence of 4-NQO [21], our set of 4-NQO sensitive strains contains the 10 strains found as top sensitive and 31 out of the 37 most sensitive strains.

Correspondingly, 85 MPA-sensitive deletions showing at least 50% growth inhibition were found (Table S4), of which 40 had been reported in a previous analysis for MPA sensitivity of the yeast disruptome [22] and 45 had not been described as MPA-sensitive to date. We focused on 289 4-NQO-sensitive (groups A and C) and 68 MPA-sensitive deletions showing at least 60% growth inhibition. Ontology analysis of the genes identified for each drug is consistent with the fact that 4-NQO affects DNA repair whereas MPA affects transcription (Figure 1B). Only 25 mutations led to sensitivity to both compounds (Figure 1C). From these mutations, 13 identified known genes involved in aspects of transcription and mRNP biogenesis, and 12 identified genes involved in protein modification, intracellular trafficking, and primary and secondary metabolism. Direct comparison of the genes showing significant variations in their patterns of expression, as determined by microarray analyses, with those showing sensitivity to either MPA or 4-NQO reveals no obvious correlation (data not shown). Therefore, a higher expression of a gene in the presence of 4-NQO or MPA does not imply requirement for resistance, but rather it is the result of an adaptation of the cell to the new conditions of growth.

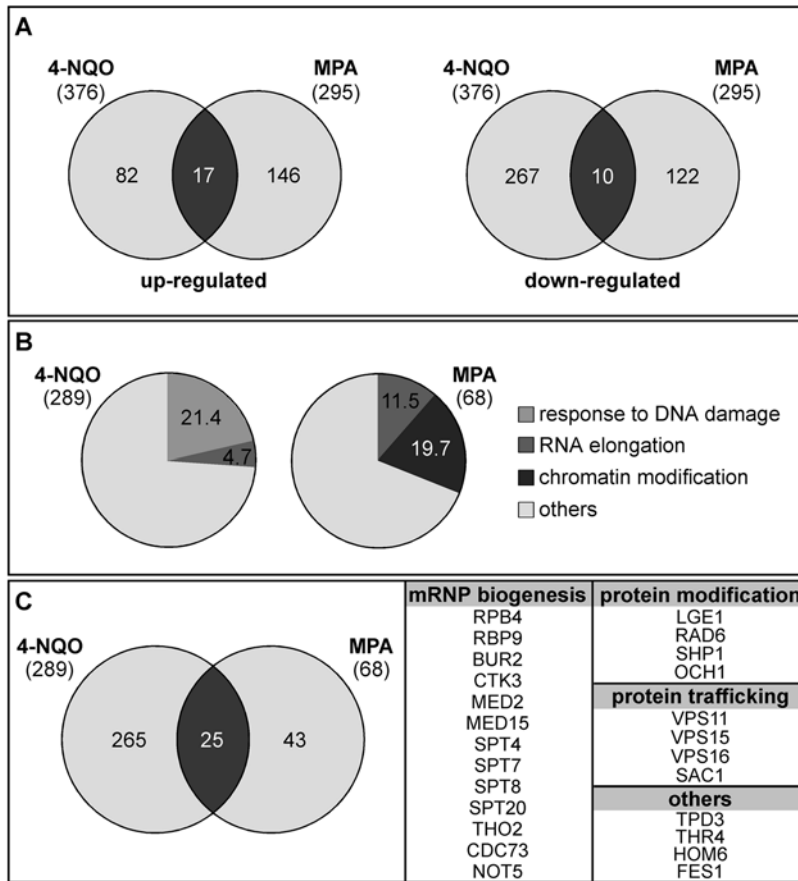


Figure 1. Analysis of genes similarly affected by 4-NQO and MPA. (A) Venn diagram representing the overlap between genes whose expression is changed after treatment with 4-nitroquinoline-N-oxide (4-NQO) and mycophenolic acid (MPA). (B) Fraction of mutant strains sensitive to 4-NQO (left) and MPA (right), classified by GO annotation. The MPA-sensitive set is significantly enriched in genes with the label “RNA elongation” and “chromatin modification” ($p < 3.38E-03$ and $p < 7.96E-05$, respectively), and the 4-NQO-sensitive set in “response to DNA damage” ($p < 6.3E-19$). Enrichment analyses were carried out with the GO Term Finder tool of the SGD. (C) Venn diagram representing the overlap between genes conferring resistance to 4-NQO and MPA. The 25 genes common to both analyses are listed to the right.
doi:10.1371/journal.pgen.1000364.g001

Effect of SAGA, CTK, Mediator, Ccr4-Not, Bre1-Rad6, and Fun12 in Transcription Elongation

We have previously shown that mutants impaired in transcription elongation display lower efficiency in the transcription of long *vs.* short transcription units [23]. To gain insight into the putative defects in RNAPII transcription of 45 MPA-sensitive mutants, the ratios of acid phosphatase activity for a long (*PHO5-lacZ* or *PHO5-LAC4*) *vs.* a short transcription unit (*PHO5*), which is taken as an approximate measurement of Gene Length Accumulation of mRNA (GLAM) were determined (Table S4). GLAM-ratios were previously used as an indirect estimation of RNAPII elongation [24]. Similar GLAM-ratios were obtained with the two long transcription units (Figure S1). Out of the assayed mutants, 24 showed values below 0.5, which were taken as criteria for candidates with defects in RNAPII elongation. 6 mutants carried deletions of genes encoding subunits of protein complexes that were previously related to RNAPII elongation, including RNAPII (*rpb4A* and *rpb9A*), THO (*tho2A*), Spt4-Spt5 (*spt4A*), and PAF (*rtf1A* and *cdc73A*). 7 mutants carried deletions of genes encoding proteins affecting transcription, for which an implication in transcription elongation has been proposed in the past. These included subunits of SAGA (*spt3A* and *spt20A*) [25], CDK (*bur2A*) [26], and Ccr4-Not (*ccr4A*) [27] complexes as well as proteins involved in H2B ubiquitylation (*bre1A*, *rad6A*, and *lge1A*) [28].

Another 4 mutants carried deletions of genes encoding proteins affecting transcription, but that had not been related to RNAPII elongation. These included subunits of Mediator (*med2A* and *med15A*) and Ccr4-Not (*not5A*) complexes as well as the Uvs1 putative transcription factor (*YPL230wA*). The remaining 7 mutants affected proteins whose function has not been previously linked to transcription (*tpd3A*, *fun12A*, *shp1A*, *lip2A*, *est2A*, and *ubp15A*) or is unknown (*YJR018wA*). To evaluate the significance of these putative new links with RNAPII elongation, and because some mutants of the SAGA (*spt7A* and *spt8A*), CDK (*ctk1A* and *ctk3A*), and Mediator (*med12A*) complexes did not exhibit expression deficiencies, we extended our analysis to deletions of other functionally related genes.

Gene expression was analyzed in all viable SAGA deletions (Figure 2). We found that, in addition to *spt20A* and *spt3A*, the absence of three other subunits (Hfi1, Sgf73, and Sgf29) showed a clear gene expression defect (GLAM < 0.5) while the remaining 5 viable deletions (*gcn5A*, *ada2A*, *ubp8A*, *ngg1A*, and *sgf11A*) were only poorly or not affected, as observed for *spt7A* and *spt8A*.

Since the H2B-ubiquitylases Rad6, Bre1, and Lge1, two PAF subunits (Cdc73 and Rtf1) as well as Bur2 belonged to the MPA-sensitive mutants exhibiting low GLAM-ratios, we extended the analysis to mutants of COMPASS, the complex responsible for H3-K4 methylation. Low GLAM values were observed for some

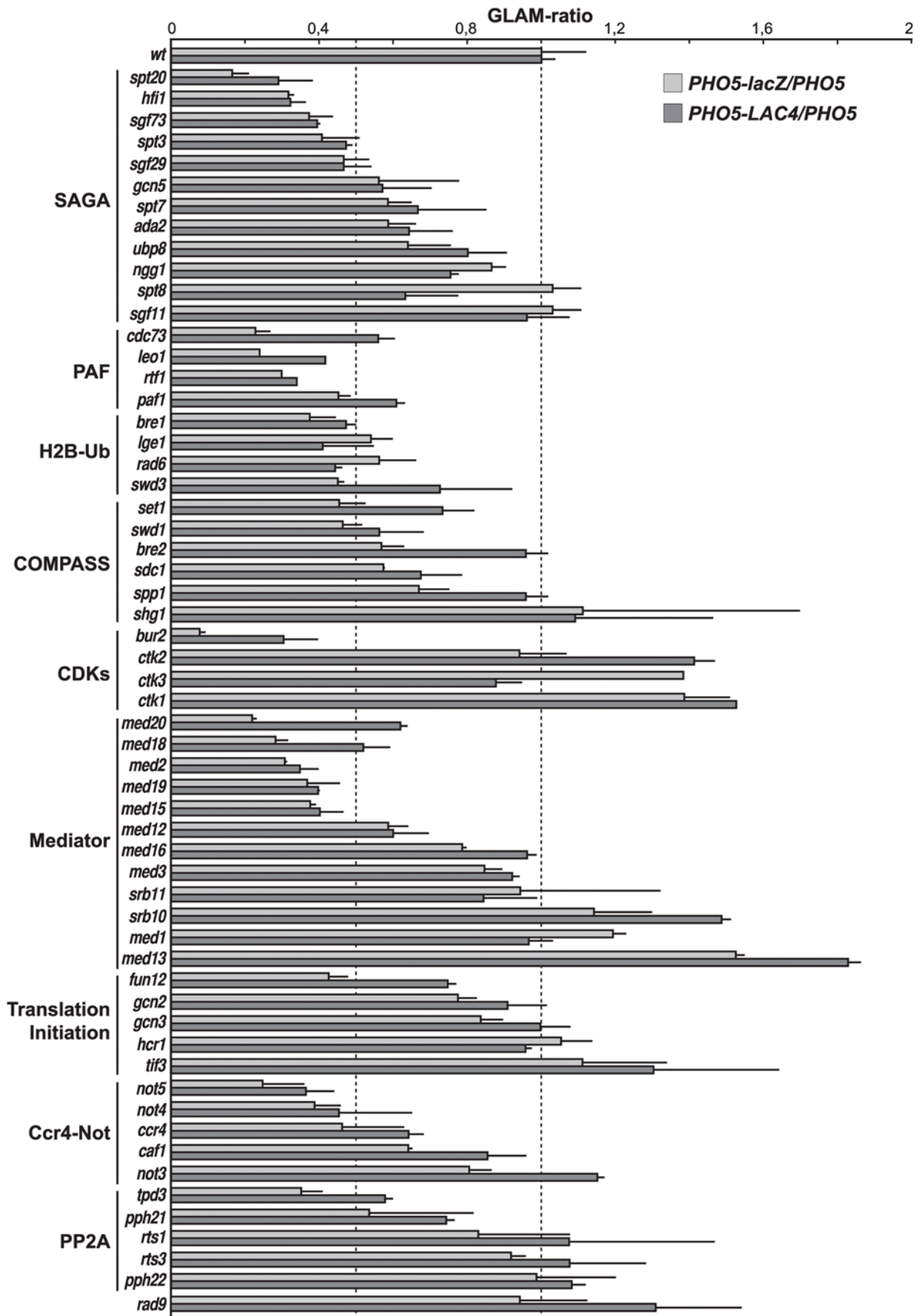


Figure 2. Gene expression analyses of selected MPA-sensitive and functionally related mutants. *PHO5-lacZ/PHO5* and *PHO5-LAC4/PHO5* ratios were calculated after assaying acid phosphatase activity of mutants lacking the indicated gene. Averages of at least three independent assays are shown. Error bars indicate standard deviation. doi:10.1371/journal.pgen.1000364.g002

of the COMPASS and H2B ubiquitylation mutants (Figure 2), suggesting that both H2B ubiquitylation and H3-K4 methylation may be important for transcription elongation. Interestingly, analysis of Ctk1-Ctk2-Ctk3 (CTDK-I)—the other cyclin-dependent protein kinase involved in transcription elongation [29]—suggests that, despite *ctk1Δ* and *ctk3Δ* being MPA-sensitive, CTDK-I might be dispensable for the expression of long genes.

Most viable deletions lacking Mediator subunits and the viable deletions lacking other subunits of the Ccr4-Not complex were also assayed (Figure 2). The results indicated that in addition to Med2 and Med15, the Med18, Med19 and Med20 subunits might affect transcription elongation, whereas the remaining viable subunits may be dispensable. For the Ccr4-Not complex, *not4Δ* showed low expression of long genes, as observed for *not5Δ* and *ccr4Δ*, whereas this was not the case for *caf1Δ* and *not3Δ*.

Finally, since the only known function of Fun12 is related to translation initiation, we assayed other viable deletions of translational machinery elements playing a role during initiation (Gcn2, Gcn3, Hcr1 and Tif3). To understand the low GLAM-ratios of *tpd3Δ*, all other deletions lacking subunits of the PP2A complex were assayed. Figure 2 shows that neither the translation initiation machinery nor the PP2A complex influence gene expression in a gene length-dependent way.

Since the analysis of GLAM-ratios relies on measurement of enzymatic activities, we decided to assess directly the efficiency of transcription of representative mutants using an *in vitro* elongation assay. This assay is based on a plasmid (pGCYGI-402) in which a hybrid *GAL4-CYC1* promoter containing a Gal4 binding site is fused to a 1.88-kb DNA fragment coding for two G-less cassettes. The first cassette is right downstream of the promoter and is 84-nt-long. The second is located 1.48-kb from the promoter and is 376-nt-long. The efficiency of elongation is determined in whole cell extracts (WCEs) by the values of the ratio of accumulation of the 376- versus the 84-nt-long G-less RNA fragments after RNase T1 digestion [30].

WCEs from representative mutants of Mediator (*med15Δ*), CTK (*bur2Δ*), Bre1-Rad6 (*bre1Δ*), SAGA (*spt20Δ*), Ccr4-Not (*not5Δ*), and PP2A (*tpd3Δ*) complexes as well as the translation initiation mutant *fun12Δ* were analyzed. As can be seen in Figure 3, *bre1Δ*, *spt20Δ*, and *not5Δ* WCEs transcribed the 376-nt G-less cassette with efficiencies around or below 60% of the wild-type levels. These results indicate severe defects in transcription elongation in those subunits of the Bre1-Rad6, SAGA, and Ccr4-Not complexes. Strikingly, *fun12Δ* cell extracts also led to a clear transcription elongation phenotype in our assay (62%). WCEs extracts of *bur2* and *med15* mutants were moderately affected in transcription

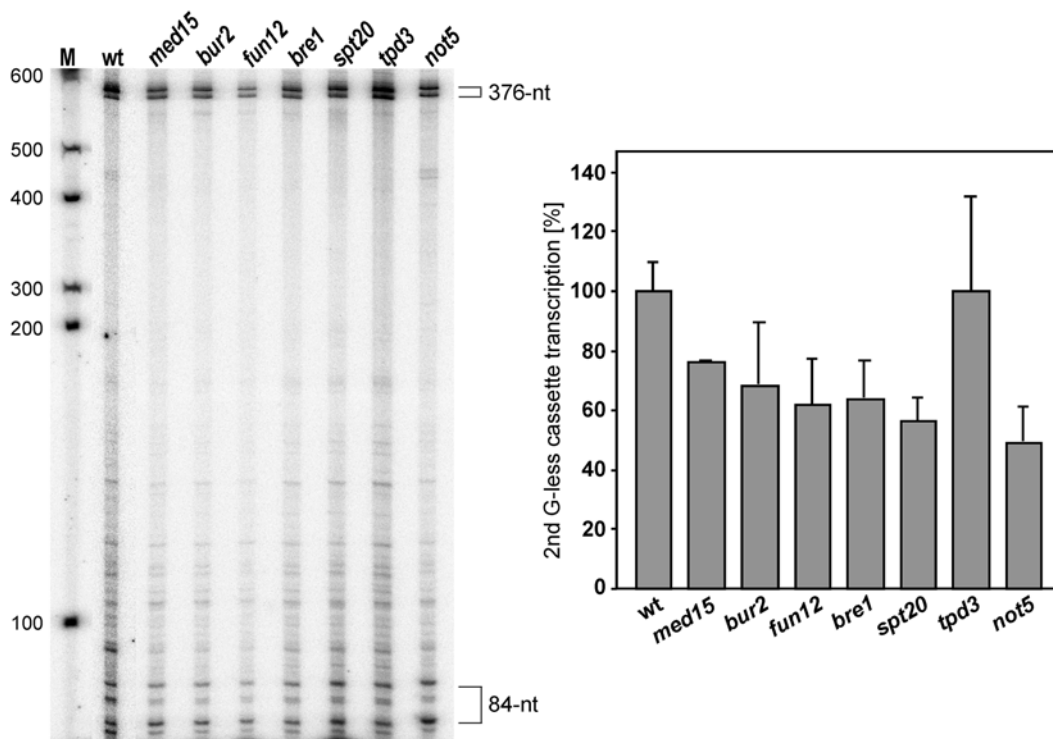


Figure 3. *In vitro* transcription elongation. *In vitro* transcription assay of WCEs from BY4741 (wt), *med15*, *bur2*, *fun12*, *bre1*, *spt20*, *tpd3*, and *not5* strains. Each reaction was stopped after 30 min, treated with RNaseT1 and run in a 6% PAGE. Two bands from each G-less cassette were obtained, probably due to incomplete action of RNaseT1. Efficiency of transcription elongation was determined as the percentage of transcripts that reach the 376-nt cassette in respect to those that cover the 84-nt cassette. Radioactivity incorporated into the cassettes was quantified in a Fuji FLA3000 and normalized with respect to the C content of each cassette. The mean value of the wt (84%) was normalized to 100%. Mean value and standard deviation of three independent experiments are shown. doi:10.1371/journal.pgen.1000364.g003

elongation, with efficiencies ranging from 68 to 77% of wild-type levels. Transcription elongation efficiencies of *tpd3Δ* WCEs reached wild-type levels, indicating that this mutant was fully transcription elongation-proficient in this assay.

In addition, we aimed at testing whether the candidate mutations changed the distribution of RNAPII along a transcribed unit, as an alternative method to measure elongation [31]. Therefore, RNAPII occupancy was analyzed by ChIP for the representative mutants selected for the *in vitro* assay in the LAUR expression system [32], which contains a 4.15 kb *lacZ-URA3* translational fusion under the control of the *Tet* promoter. The presence of RNAPII was determined at a 5'-end and a 3'-end region of the *lacZ* sequence, as well as within the fused *URA3* gene (Figure 4). The *spt20Δ*, *not5Δ* mutants and, to a lesser extent, *bur2Δ* were impaired in elongation in this assay, as less RNAPII was found toward the 3'-end than at the 5'-end of the transcription unit. Strikingly, RNAPII appeared to accumulate toward the 3'-end of the gene in *med15Δ* cells. No significant changes in RNAPII distribution were observed in the *bre1Δ*, *fun12Δ*, and *tpd3Δ* mutants, the latter of which is consistent with the *in vitro* result.

Therefore, our results indicate that subunits of SAGA, Ccr4-Not, Mediator, and, to a lesser extent, CDK affect transcription elongation, as seen with the three different assays tested while the effect of Bre1-Rad6 and the translation factor Fun12 on transcription elongation depends on the assay used.

Genetic Analysis of UV Sensitivity in the Absence of Global Genome Repair

Given the strong dependency of TC-NER on RNAPII transcription and the fact that the few proteins known to be involved in TC-NER are related to transcription, we made use of the results of our MPA-sensitivity screen to select 18 mutants encoding for transcription factors, protein de-ubiquitylase, H2B-ubiquitylase, subunits of the CDK, SWI/SNF, SAGA, Mediator, PAF, Ccr4-Not complexes, and RNAPII and look for those possibly involved in TC-NER. For this purpose, we abolished GG-NER by deleting the *RAD7* gene in the chosen mutants. In the

absence of GG-NER, deficiencies in TC-NER lead to increased UV-sensitivity, a phenotype that we screened for by drop assay (Figure 5). Growth of each double mutant was compared to the growth of *rad7Δ*, giving rise to the classification of 5 mutants as not more sensitive than *rad7Δ* (*dst1Δ*, *ubp15Δ*, *ctk3Δ*, *bur2Δ*, and *spt7Δ*) and 4 mutants as slightly more sensitive to UV than *rad7Δ* (*snf6Δ*, *spt4Δ*, *spt8Δ*, and *med12Δ*), this effect being more obvious when higher UV doses were used (data not shown). The remaining 9 strains were much more sensitive to UV than *rad7Δ* (*rad6Δ*, *rpb9Δ*, *med2Δ*, *med15Δ*, *spt20Δ*, *spt3Δ*, *rtf1Δ*, *cdc73Δ*, and *not5Δ*). Rad6 and Rpb9 are known to be involved in post-replication repair of UV-damaged DNA and TC-NER, respectively [11,33]. However, the 7 other mutants have no known connection to any UV-damaged DNA repair pathway. These mutants include subunits of the mediator (*med2Δ* and *med15Δ*), SAGA (*spt3Δ* and *spt20Δ*), PAF (*rtf1Δ* and *cdc73Δ*), and Ccr4-Not (*not5Δ*) complexes. Given the fact that other subunits of the Mediator and SAGA complexes were represented in the moderately UV-sensitive strains (*med12Δ*, *spt7Δ*, and *spt8Δ*), we focused on the PAF and Ccr4-Not complexes for a more detailed analysis.

TC-NER Is Impaired in Cells Defective in the PAF and Ccr4-Not Complexes

To refine the UV sensitivity analysis of PAF and Ccr4-Not mutants in the absence of GG-NER, UV survival curves were performed for all viable PAF and Ccr4-Not mutants (*rtf1Δ*, *cdc73Δ*, *pafl1Δ*, *leo1Δ*, *not5Δ*, *not4Δ*, *not3Δ*, *caf1Δ*, *ccr4Δ*) alone or in combination with the *rad7Δ* mutation (Figure 6). The *rtf1Δ*, *cdc73Δ*, *leo1Δ*, *not3Δ*, *caf1Δ* and *ccr4Δ* single mutants show no increased UV sensitivity as compared with wild-type cells. However, upon UV irradiation viability of the corresponding double mutants dropped below the levels of the *rad7Δ* single mutant. The *pafl1Δ*, *not5Δ* and *not4Δ* single mutants showed a moderate UV sensitivity, reaching levels very close to that of *rad7Δ* in the case of *pafl1Δ* and *not4Δ*. Nevertheless, the viability of the *pafl1Δ rad7Δ*, *not5Δ rad7Δ*, and *not4Δ rad7Δ* double mutants dropped far below the levels of the corresponding single mutants upon UV irradiation.

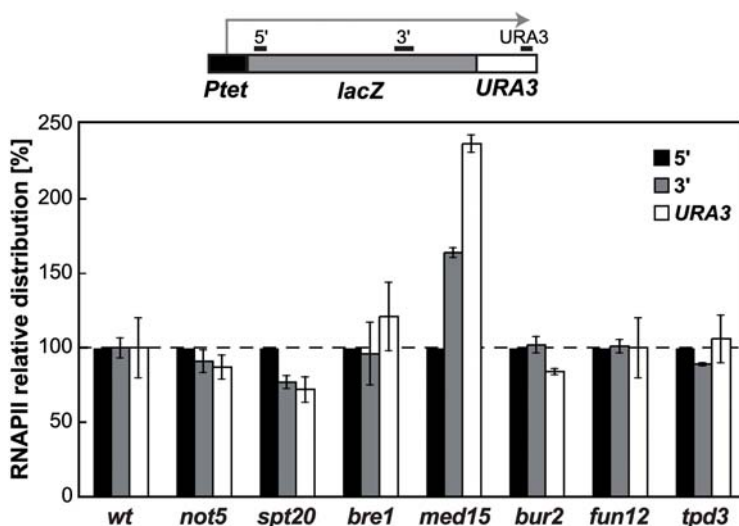


Figure 4. RNAPII occupancy analysis. ChIP analyses in BY4741 (wt), *not5*, *spt20*, *bre1*, *med15*, *bur2*, *fun12*, and *tpd3* strains in the LAUR expression system. The scheme of the gene and the PCR-amplified fragments are shown. The DNA ratios in region 5', 3' and URA3 were calculated from their signal relative to the signal of the intergenic region. The recruitment data shown are referred to the value of the 5' region taken as 100%. ChIPs were performed from 3 independent cultures, and quantitative PCRs were repeated three times for each culture. Error bars, SDs. doi:10.1371/journal.pgen.1000364.g004

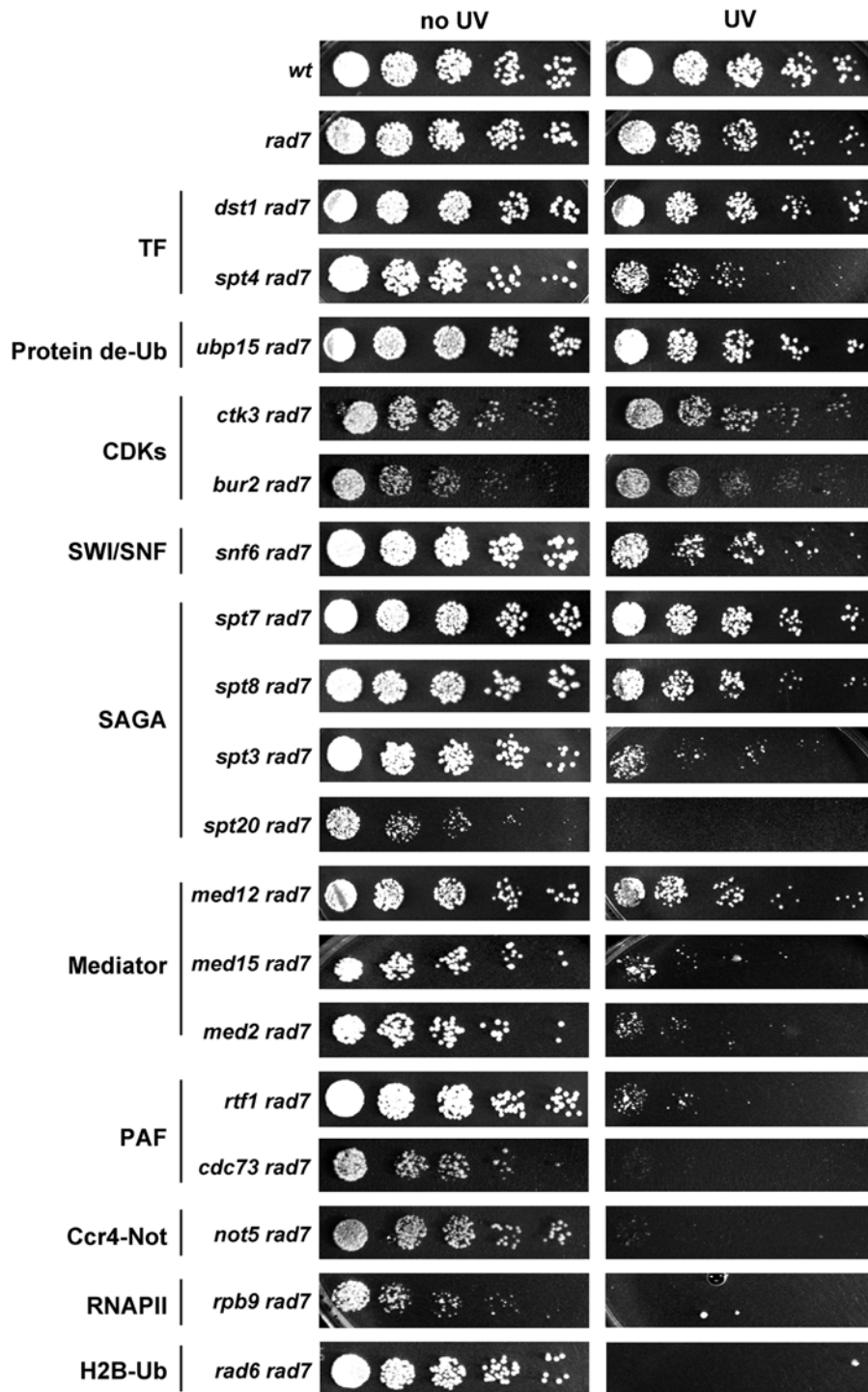


Figure 5. UV sensitivity in the absence of global genome repair in selected MPA-sensitive mutants. UV sensitivity analysis of 18 mutant strains in which the *RAD7* gene has been disrupted. *rad7* and wild-type strains were used as control. Cell dilutions were dropped on YPDA plates, UV irradiated with 15 J/m^2 and grown at 30°C in the dark for 3 days. doi:10.1371/journal.pgen.1000364.g005

Both the PAF and the Ccr4-Not complexes have been previously linked to the DNA damage checkpoint pathway [34–37]. Therefore, we wondered whether the observed UV sensitivity might rely on checkpoint activation defects. Firstly, we checked the GLAM-ratios of cells lacking the DNA damage checkpoint protein Rad9 (Figure 2). No transcription defects were observed in this assay. Secondly, we performed UV survival curves of the DNA

damage checkpoint *rad9Δ* and the *bre1Δ* mutants alone or in combination with the *rad7Δ* mutation (Figure 7A). The *rad9Δ* single mutant was sensitive to UV irradiation, as previously shown [38]. Deletion of the GG-NER factor Rad7 increased the UV sensitivity of *rad9Δ* cells. Together, these data indicate that a functional DNA damage checkpoint response is important for viability upon UV irradiation both in repair proficient and in GG-

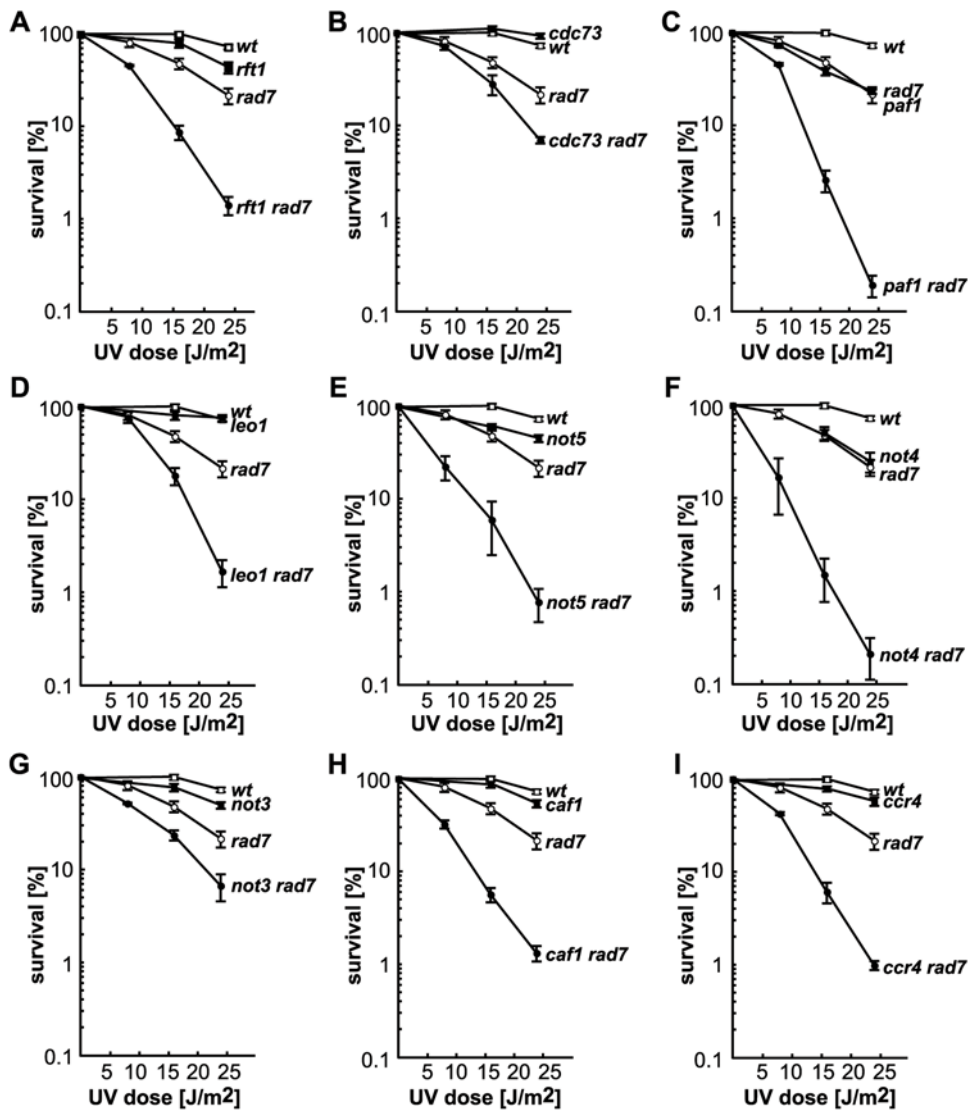


Figure 6. PAF and Ccr4-Not mutants are sensitive to UV in the absence of global genome repair. UV sensitivity curves of strains carrying single and double combinations of the (A) *rtf1*, (B) *cdc73*, (C) *paf1*, (D) *leo1*, (E) *not5*, (F) *not4*, (G) *not3*, (H) *caf1*, (I) *ccr4*, and *rad7* mutations. Mutants shown in (A–D) are subunits of the PAF and mutants shown in (E–I) of the Ccr4-Not complex. Average values and standard deviations from 3 independent experiments are shown. doi:10.1371/journal.pgen.1000364.g006

NER deficient cells. Surprisingly, the *bre1Δ* mutant behaved differently, as the single mutant was not UV-sensitive while the *bre1Δ rad7Δ* double mutant was not more sensitive to UV irradiation than the *rad7Δ* single mutant. Finally, we analyzed the impact of the *rad9Δ* mutation on the UV survival of the *rtf1Δ*, *rtf1Δ rad7Δ*, *not5Δ*, and *not5Δ rad7Δ* strains. A similar set of UV survival curves were performed with the TC-NER mutant *rpb9Δ* as a control. As shown in Figure 7B, a synergistic effect was observed in the absence of GG-NER in mutants of the PAF and Ccr4-Not complexes, since the *rtf1Δ rad9Δ* and *not5Δ rad9Δ* mutants were as sensitive to UV irradiation as the *rad9Δ* mutant alone, while both the *rtf1Δ rad7Δ rad9Δ* and the *not5Δ rad7Δ rad9Δ* strains were significantly more sensitive to UV than the corresponding double mutants. In the TC-NER deficient *rpb9Δ* strains, a synergistic effect with *rad9Δ* was observed independently of the *rad7Δ* mutation. Consequently, the enhanced UV sensitivity of mutants of the PAF and Ccr4-Not complexes in the absence of GG-NER is not due to Rad9-dependent checkpoint activation failure.

Thus, because UV sensitivity in the absence of GG-NER is a phenotype mostly associated with TC-NER deficiencies, we tested whether PAF and Ccr4-Not are required for proficient TC-NER by monitoring the repair rates on the transcribed (TS) and non-transcribed (NTS) strands of the constitutively expressed *RPB2* gene. Molecular analysis of strand-specific removal of UV photoproducts was performed in *rtf1Δ* and *not5Δ* cells. Wild-type and TC-NER-deficient *tho2Δ* [14] strains were used as controls. Repair at various time points after UV irradiation was determined in a 4.4-kb *RPB2* restriction fragment by T4 endonuclease V (T4 endoV) digestion -resulting in ssDNA cleavage at CPD sites- followed by alkaline electrophoresis and indirect end-labeling with strand-specific probes (Figure 8). Non-irradiated and DNA not treated with T4 endoV show the intact restriction fragment. Repair of CPDs is visualized by a time-dependent increase of the T4 endoV-resistant fraction of restriction fragments. In *rtf1Δ* and *not5Δ* cells, repair of the TS was significantly reduced compared to wild-type level. As observed by UV sensitivity assays in the absence

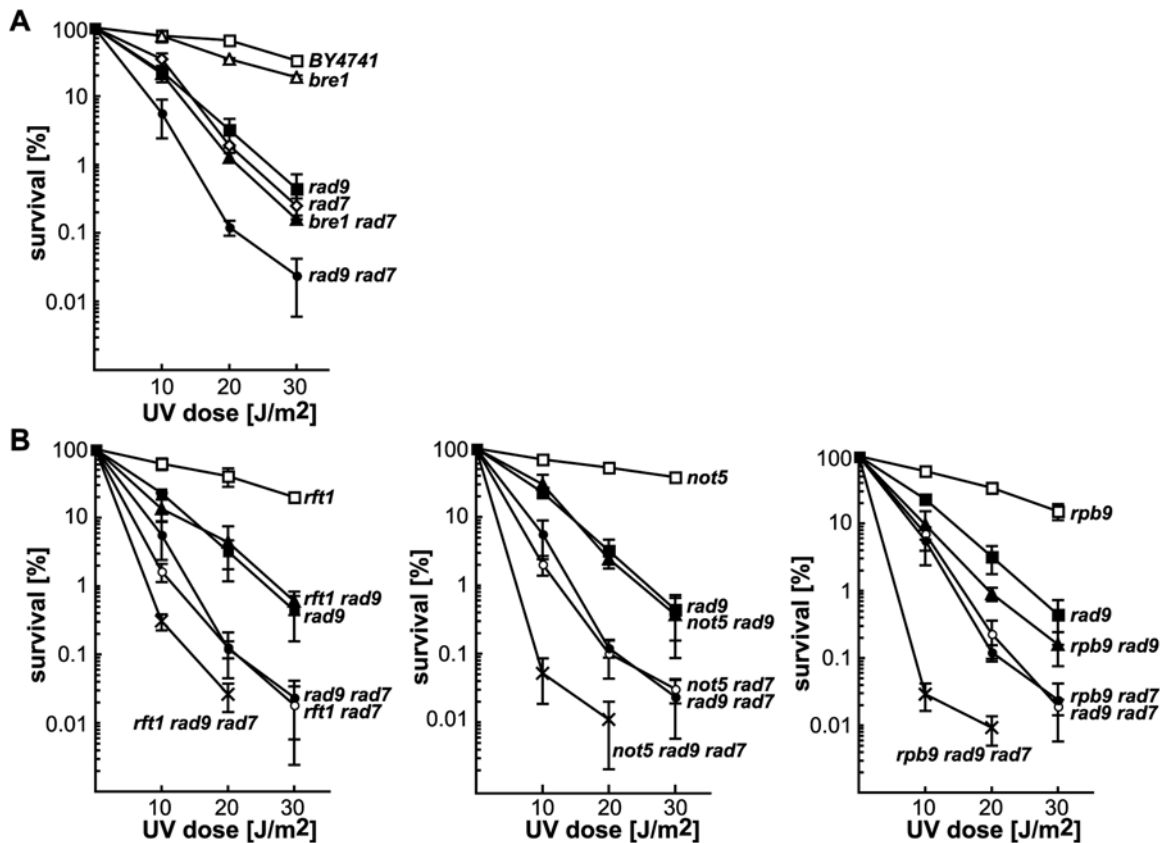


Figure 7. The increased UV sensitivity of PAF and Ccr4-Not mutants in the absence of global genome repair is not due to checkpoint activation failure. (A) UV sensitivity curves of strains carrying single and double combinations of the *rad9* or *bre1*, and *rad7* mutations. (B) UV sensitivity curves of strains carrying single, double, and triple combinations of the *rft1*, *rad9*, and *rad7* mutations (left), the *not5*, *rad9*, and *rad7* mutations (middle), or the *rpb9*, *rad9*, and *rad7* mutations (right). Average values and standard deviations from at least 3 independent experiments are shown.

doi:10.1371/journal.pgen.1000364.g007

of GG-NER (Figure 6), *not5Δ* cells were more strongly affected in TS repair than *rft1Δ* cells. The repair deficiencies of these PAF and Ccr4-Not mutants were comparable to those of the TC-NER-deficient *tho2Δ* and *rad26Δ* strains. In the NTS, in contrast to the GG-NER-deficient *rad7Δ* strain, the repair levels of *rft1Δ* and *not5Δ* were similar to wild-type and *tho2Δ* cells, indicating that GG-NER is not significantly affected in *rft1Δ* and *not5Δ* cells.

A number of factors have been implicated in the repair of DNA lesions encountered by the RNAPII in eukaryotes, but our knowledge on the mechanisms of TC-NER is scarce. Since proteasome-mediated degradation of UV damage-stalled RNAPII complexes is believed to be alternatively required for DNA repair, we tested whether the effect of PAF and Ccr4-Not effect on TC-NER was dependent on RNAPII degradation. For this, we performed an epistatic analysis of the PAF mutant *rft1Δ* with both the *def1Δ* and the *rpb9Δ* mutants, which are deficient in RNAPII degradation in response to UV in yeast [16,19]. As can be seen in Figure 9, a synergistic enhancement of the UV sensitivity was observed in both cases, the *rft1Δ def1Δ* and the *rft1Δ rpb9Δ* mutants being more sensitive to UV than the corresponding single mutants. Similarly, the *rft1Δ def1Δ rad7Δ* and the *rft1Δ rpb9Δ rad7Δ* triple mutants were more sensitive to UV irradiation than the corresponding double mutants. These results suggest that the TC-NER phenotype of PAF mutants is not due to an alteration of the Def1- or Rpb9-mediated degradation of UV damage-stalled RNAPII.

Taken together, our results place the PAF and the Ccr4-Not5 complexes as new factors needed for efficient TC-NER.

Discussion

Genome-wide analyses of the genes conferring resistance to MPA and 4-NQO allowed us to identify new putative candidates of genes involved in transcription elongation and TC-NER. Deletion of some subunits of the SAGA and Ccr4-Not complexes as well as Bur2 show defects in transcription elongation in all the tested assays, while deletion of the Bre1 and Fun12 proteins as well as some subunits of the Mediator complex show defects in transcription elongation as measured by MPA sensitivity, GLAM-ratios and *in vitro* transcription assay, but not by RNAPII occupancy. Notably, we provide genetic and molecular evidence that PAF and Ccr4-Not are required for efficient TC-NER in yeast. Sensitivity analysis of viable deletion mutants showed that the 4-NQO sensitive mutants were enriched in DNA repair genes, while the MPA sensitive mutants were enriched in both DNA repair and transcription genes, in agreement with the known effect of MPA on transcription elongation and 4-NQO on DNA repair. Out of the 25 mutations conferring sensitivity to both compounds, 13 correspond to genes involved in RNAPII transcription and mRNP biogenesis (see Figure 1). Interestingly, the large majority (10) of these mutants shows either TC-NER defects or increased UV sensitivity in the absence of GG-NER (this study; [11,14]).

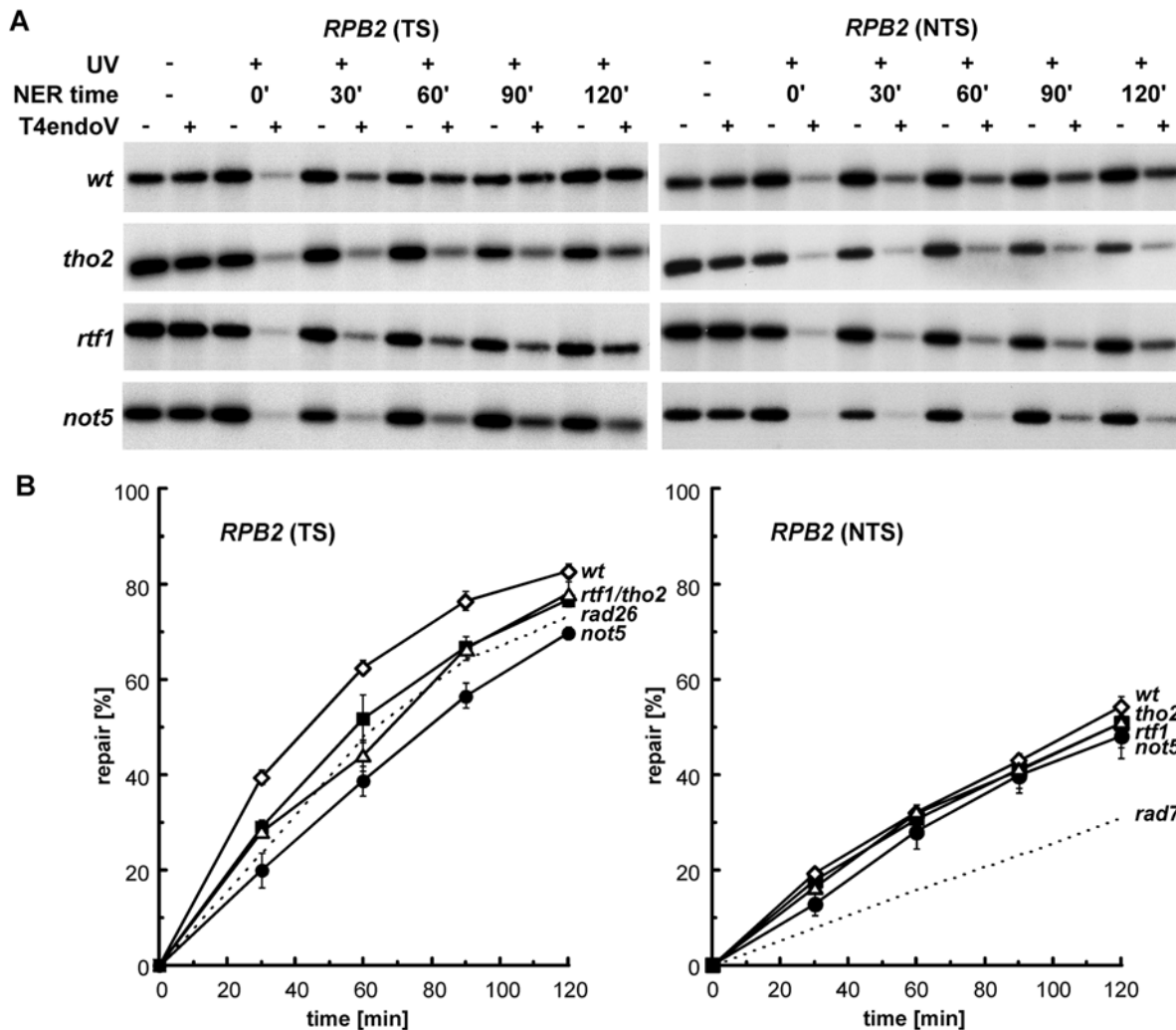


Figure 8. Transcription coupled repair is impaired in PAF and Ccr4-Not deficient cells. (A) Southern blot analysis showing repair of a 4.4 kb (*NsiI/PvuII*) *RPB2* fragment in *tho2*, *rtf1*, *not5*, and wt cells. Initial damage was on the average 0.31 ± 0.07 CPD/Kb in the transcribed strand (TS, left) and 0.26 ± 0.06 CPD/Kb in the non-transcribed strand (NTS, right). The remaining intact restriction fragment after treatment of damaged DNA with T4endoV (+UV, +T4endoV) corresponds to the fraction of undamaged DNA. Non-irradiated DNA (–UV) and DNA not treated with T4endoV (–T4endoV) were used as controls. (B) Graphical representation of the repair analysis. The CPD content was calculated using the Poisson expression, $-\ln(RF_a/RF_b)$, where RF_a and RF_b represent the intact restriction fragment signal intensities of the T4endoV- and mock-treated DNA, respectively. Repair curves were calculated as the fraction of CPDs removed vs. repair time. Average values derived from two independent experiments are plotted. Repair curves of *rad26* and *rad7* (data taken from [14]) are depicted for the TS and the NTS, respectively (dash lines). doi:10.1371/journal.pgen.1000364.g008

Previously Characterized Transcription-Initiation Factors with an Effect in Transcription Elongation

After identifying a number of mutants with impairment in the expression of long genes (see Figure 2), we showed that WCEs depleted of representative subunits of the SAGA, Mediator and Ccr4-Not complexes, as well as of the Bre1, Bur2, and Fun12 proteins, were impaired in transcription elongation (see Figure 3). In addition, RNAPII elongation defects were observed by ChIP analysis for mutants of the SAGA, Ccr4-Not, Bur2, and, in a different manner, Med15 (see Figure 4). Therefore, these factors seem to have a putative role in transcription elongation in addition to their previously reported roles in either transcription initiation or other gene-expression processes. Although further molecular and biochemical analyses are required to understand how these mutations affect transcription elongation, our knowledge of the function of these proteins, as discussed below, may provide insight into explaining some of these effects.

SAGA is a 1.8 MDa complex identified as a factor promoting transcription activation through histones H3 and H2B acetylation by its HAT domain [25,39]. One of SAGA's functions consists of the deubiquitylation of histone H2B by its Upb8/Sgf11 module [40]. Interestingly, Gcn5, which belongs to the HAT catalytic core, is recruited to actively transcribed genes in a RNAPII CTD-phosphorylation-dependent manner and promote transcription of a long ORF [41], indicating that SAGA's role is not confined to transcription initiation. Our *in vivo* gene expression analyses of different SAGA-subunit mutants are consistent with a putative defect in transcription elongation. Importantly, the *in vitro* transcription-elongation assay showed that *spt20A* extracts, in which the SAGA complex is disrupted, leads to significant elongation defects. Furthermore, RNAPII elongation defects were observed in *spt20A* cells by ChIP analysis of RNAPII. However, neither the *upb8* nor the *sgf11* mutants were significantly affected in our assays, suggesting that the H2B de-ubiquitylation module of

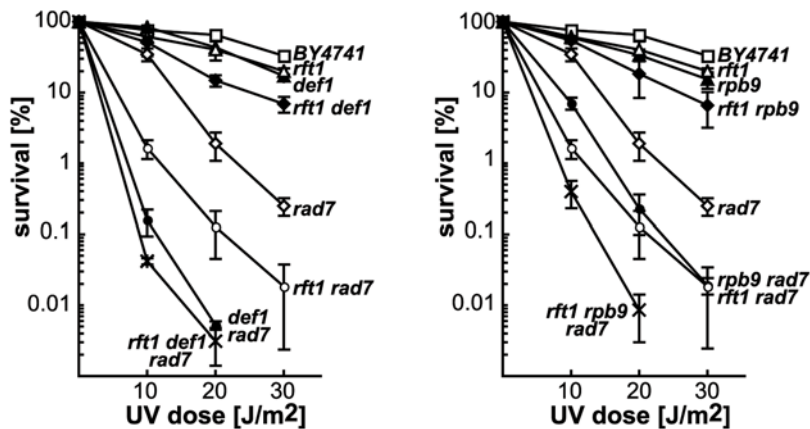


Figure 9. Synergistic increase of UV sensitivity phenotypes in *rft1 def1* and *rft1 rpb9* double mutants. UV sensitivity curves of strains carrying single, double, and triple combinations of the *rft1*, *def1*, and *rad7* mutations (left) or the *rft1*, *rpb9*, and *rad7* mutations (right). Average values and standard deviations from at least 3 independent experiments are shown. doi:10.1371/journal.pgen.1000364.g009

SAGA might be dispensable for transcription elongation. Our result portends that SAGA's effect in transcription elongation might not only rely on histone modifications, since the template used in the *in vitro* assay is devoid of histones, although the use of crude extracts does not exclude that some histone deposition occurs spontaneously on the template during the reaction.

Among the analyzed Mediator mutants, some were affected in expression of long genes while others were not. Notably, the affected mutants correspond to subunits of the tail (Med2 and Med15) or head (Med18, Med19, and Med20) domains [42]. The fact that the tested *med15Δ* mutant is impaired in transcription elongation *in vitro* and the observation that RNAPII accumulates toward the 3'-end of the analyzed gene in *med15Δ* cells supports the idea that Mediator influences transcription elongation in a different manner to other factors previously reported. A possible explanation might be that its effect on elongation arises from a stalling of RNAPIIs at the 3'-end of the gene. The putative involvement of Mediator in elongation is further substantiated by the recent findings that it binds to chromatin throughout the ORF of active genes [43]. Interestingly, while other Mediator null mutants showed no effect in our *in vivo* gene expression assay, deletion of the Srb11 subunit of the associated cyclin-dependent Ser/Thr protein kinase complex CDK8 or Med13, to which this domain is attached, appeared to increase the efficiency of expression, in agreement with the involvement of CDK8 in the negative regulation of gene expression [42,44].

Although transcription regulation by Ccr4-Not mostly occurs during the initiation stage, it seems likely that this complex control gene expression at several levels, including regulation of transcription initiation, mRNA deadenylation and degradation, and protein turnover [45–47]. Genetic interactions suggested that Ccr4-Not could also be involved in transcriptional elongation [27]. Our data support an involvement of Ccr4-Not in transcription elongation, as suggested by the deficiency of long gene expression conferred by most viable deletions (the exception is *not3*). Importantly, we show that *not5* cells are impaired in transcription elongation *in vitro* and show RNAPII elongation defects *in vivo*, as determined by ChIP analysis.

Ubiquitylation of histone H2B by Rad6-Bre1 is associated with active transcription [48] and is required for subsequent COMPASS-mediated methylation of histone H3 [49]. Both chromatin modifications are controlled by PAF and the Bur1-Bur2 cyclin-dependent protein kinase, which associate with the elongating

RNAPII [50,51]. Interestingly, H2B ubiquitylation has been recently shown to be required for efficient reassembly of nucleosomes during transcription elongation [52]. Mutants of the Rad6-Bre1 ubiquitylation complex show a significant reduction in the expression of long ORFs *in vivo* and deletion of *BRE1* leads to elongation defects *in vitro*, suggesting that this complex has a role in transcription elongation. However, no significant alterations of RNAPII occupancy on a transcribed gene were observed by ChIP. Similar findings were obtained in *bur2* mutants, although in this case ChIP analyses also showed an RNAPII distribution consistent with an *in vivo* transcription elongation defect, alluding that the Bur1-Bur2 complex might also be involved in transcription elongation. These findings are in agreement with the previous report that Bur1 and Bur2 are both recruited to transcription elongation complexes [26].

Finally, the Fun12 translation initiation factor also affects transcription elongation in all assays but RNAPII occupancy measurement, although we show that this is not a general feature of translation initiation factors. Further studies would be required to better understand the function of Fun12 and how this might influence transcription elongation. In this sense, it is worth noticing that mutants showing elongation deficiencies in the *in vitro* transcription elongation assay but not in RNAPII ChIP assays have been reported previously, as it is the case of PAF complex mutants [31,53]. It is likely that the interconnection of transcription with other nuclear processes like RNA processing and export may be responsible for a different behavior of particular mutations *in vitro* and *in vivo*. Further development of novel transcription elongation assays may be required to solve such cases. In any case, the putative implication of a number of known transcription-initiation factors and other factors in transcription elongation opens new perspectives about the function of these proteins in transcription that demand further studies.

Novel Role for the PAF and Ccr4-Not Complexes in TC-NER

Among all factors analyzed, a striking observation of this study is that two known transcription factors, PAF and Ccr4-Not, have a novel role in TC-NER. Although evidence for a direct involvement of these complexes in TC-NER, as any other previously reported, would require the development of a TC-NER *in vitro* assay, the fact that PAF and Ccr4-Not work during transcription elongation makes it plausible that both complexes

affect TC-NER directly. The PAF complex is present at promoters and coding regions of all active genes tested and has been involved in transcription initiation and elongation, as well as in the 3'-end formation of polyadenylated and nonpolyadenylated RNAPII transcripts [49,54–56]. It is required for association of the H2B monoubiquitylating enzyme Bre1-Rad6 with hyperphosphorylated RNAPII and therefore for H2B monoubiquitylation [48,57], as well as for Set1 and Set2 recruitment and therewith for correct H3-K4 and H3-K36 methylation [50]. PAF also functions in the regulation of histone acetylation [58]. An involvement of histone modifications in the repair of UV damages by NER was found only for monoubiquitylation at H3-K79 [59] and for H3 and H4 histone acetylation [60,61]. Interestingly, residues in both the N- and C-terminal tail of H2A have been recently found important for UV survival [62]. Since PAF's role in transcription elongation is not confined to the regulation of histone modifications [53,63], and that *bre1Δ* cells were not sensitive to UV irradiation in the absence of GG-NER (see Figure 7), it remains to be determined whether the TC-NER phenotype of PAF mutants relies on some alteration of histone modifications.

In addition to genetic interactions (synthetic lethality) between the PAF and Ccr4-Not complexes [64], a functional interplay was inferred from the observation that both PAF and Ccr4-Not mutants give rise to HU-sensitivity and a deregulation of *RNR* gene transcription [36,65,66]. In addition, both the PAF and the Ccr4-Not complexes have been previously linked to the DNA damage checkpoint pathway. The PAF complex is responsible for the recruitment of the Bre1-Rad6 ubiquitylation complex to transcribed genes [48] and H2B ubiquitylation by the Bre1-Rad6 complex has been shown to be necessary for the activation of the DNA damage checkpoint [34]. The Ccr4-Not complex has been shown to promote cell cycle transition from G1 to S phase after ionizing radiation [35] and its deadenylase subunits Ccr4 and Caf1 were shown to influence Crt1 abundance *via* mRNA poly(A) tail length regulation, which in turn regulates the expression of a number of DNA-damage inducible genes. Furthermore, Ccr4 and Caf1 show complex genetic interactions with a number of DNA damage checkpoint genes in response to HU and MMS [37]. More recently, Ccr4 was reported to modulate the timing of gene expression of G1-phase cyclins [67], which are key regulators of the G1-S checkpoint.

Thus, the TC-NER deficiencies of mutants of the PAF and Ccr4-Not complexes could rely on some failure in the activation of the DNA damage checkpoint response. UV survival analysis of *rad9Δ* cells revealed that a functional DNA damage checkpoint response is important for viability upon UV irradiation both in repair proficient and in GG-NER deficient cells (see Figure 7). Our epistatic analysis of UV survival in double and triple combinations of *rad9Δ* with the *rtf1Δ*, *not5Δ*, or *rpb9Δ* mutations indicate that removal of the Rpb9 TC-NER factor as well as Rtf1 and Not5 increase the sensitivity of *rad9Δ rad7Δ* double mutants, suggesting that the enhanced UV sensitivity of mutants of the PAF and Ccr4-Not complexes in the absence of GG-NER is not due to Rad9-dependent checkpoint activation failure. These findings are in agreement with the observation that PAF and Ccr4-Not mutants are impaired in the repair of UV lesions exclusively on the transcribed strand of an active gene (see Figure 8), while *rad9Δ* has been previously reported to alter the repair efficiency of both the transcribed and the non-transcribed strands [68].

Interestingly, despite Bre1-Rad6 being required for Rad9-dependent DNA damage checkpoint activation [34] and *rad9* cells being sensitive to UV independently of GG-NER, *bre1* mutants were not sensitive to UV, not even in the absence of GG-NER. Thus, the Rad9 protein has functions in DNA damage checkpoint that are not dependent on the Bre1-Rad6 complex.

Recently, subunits of the Ccr4-Not complex were shown to be required for tri-methylation of H3K4 and PAF recruitment in a Bur1/Bur2-independent manner [69]. Notably, Ccr4 and Caf1, the two major yeast deadenylases [70], did not share this phenotype, suggesting a functional distinction between the cytoplasmic deadenylase activity of the Ccr4-Caf1 module and the nuclear function of the Not proteins of the Ccr4-Not complex. However, *CCR4* shows similar genetic interactions (synthetic lethality) with *BUR1* and *BUR2* as well as 6-AU sensitivity as *NOT2* and *NOT4* mutants do [27,69]. Our analysis of UV survival in the absence of GG-NER in viable Ccr4-Not mutants indicates that *caf1* and *ccr4* share the TC-NER phenotype of *not* mutants (see Figure 6). Furthermore, deletion of *BUR2* did not lead to increased UV sensitivity in the absence of GG-NER (see Figure 5), suggesting that the TC-NER deficiencies of Ccr4-Not mutants are not a consequence of misrecruitment of the PAF complex.

Is There a Link between Transcription Elongation Efficiency and TC-NER?

The finding that both the PAF and Ccr4-Not complexes lead to impaired TC-NER could suggest that transcription might be altered in a similar way in these mutants, this alteration being the cause for the inefficient TC-NER. Strikingly, all factors known to be required for TC-NER are also somehow involved in transcription elongation. Although original studies suggested that *RAD26*, the *CSB* yeast homolog, might be a transcription-repair coupling factor by analogy to the bacterial TRCF, this idea has not been validated. Instead, several studies have opened the possibility that Rad26/CSB might have a role in transcription elongation in the absence of DNA damage [71,72]. Mutants of the Rpb9 and Rpb4 RNAPII subunits, which both have an effect on transcription elongation, confer TC-NER phenotypes [11,12]. Mutants of the THO/TREX and Thp1-Sac3 complexes, which show impairment in transcription elongation, also lead to TC-NER deficiencies [14].

In light of these observations, it is conceivable that proficient transcription elongation might be a pre-requisite for efficient TC-NER. However, transcription-elongation mutants like *spt4* do not show defects in TC-NER [73]. On the contrary, *spt4* suppresses the TC-NER defects of *rad26*, indicating that reduced RNAPII elongation can even act positively on TC-NER. Another example arising from our study is *bur2*, which shows poor expression of long genes *in vivo* and has a general role in transcription elongation [49] but no increase in UV sensitivity in the absence of GG-NER. Thus, it appears that the TC-NER phenotype is not directly linked to elongation efficiency. Furthermore, analysis of TC-NER in a TFIIE mutant in which transcription is significantly reduced demonstrated that TC-NER occurs even at low levels of RNAPII transcription [74].

Another possibility is that the signaling of damage-stalled RNAPII to the repair factors might occur via post-translational modification of the RNAPII, such as ubiquitylation or CTD phosphorylation; and that this signaling might be affected in mutants leading to TC-NER phenotypes. The assumption that CTD phosphorylation might be important for TC-NER is supported by the finding that *KLN28* mutants—the TFIIF subunit with CTD kinase activity—are affected in TC-NER [75]. Along this line, we have proposed the existence of feedback mechanism acting on the RNAPII holoenzyme in response to mRNP biogenesis and export deficiencies associated with THO/TREX and Thp1-Sac3 mutations [14]. As a result of this feedback mechanism, the elongating RNAPII would no longer be proficient for TC-NER. Noteworthy, both the PAF and Ccr4-Not complexes have functions in mRNA 3'-end processing [54–56,76,77], which

might lead to a feed-back mechanism on the elongating RNAPII as proposed for THO and Thp1-Sac3 mutants.

Interestingly, bacterial TRCF has the ability to promote elongation of backtracked polymerases, resulting in polymerase release in case elongation cannot take place, as is the case at sites of UV lesions [78]. By analogy, it is conceivable that PAF and Ccr4-Not, and perhaps THO and Thp1-Sac3 complexes, might also be capable of such anti-backtracking activity. Finally, RNAPII is subject to ubiquitylation and proteasome-mediated degradation in response to UV-generated DNA damage [4]. Degradation of damage-stalled RNAPII complexes is believed to be alternatively required for DNA repair and depends on the Def1 and the Rpb9 proteins in yeast [16,19]. Our epistatic analysis of the PAF mutant *rfi1* and the *def1* and *rpb9* mutants (see Figure 9) suggest that PAF is not acting in the degradation of stalled RNAPII upon UV irradiation. Further studies will be required to understand how PAF and Ccr4-Not controls TC-NER.

In conclusion, our study opens new perspectives to understand TC-NER by providing evidence for TC-NER being a process intimately linked to transcription elongation, a number of specific transcription factors having a dual role in transcription and TC-NER.

Materials and Methods

Strains and Plasmids

All strains used were purchased from Euroscarf and are isogenic to BY4741. The *rad7Δ::URA3* strains were obtained by direct replacement of the *RAD7* gene. The *rfi1Δ::KAN rad9Δ::KAN* and *rfi1Δ::KAN rpb9Δ::KAN* strains were obtained by genetic crosses. The *not5Δ::KAN rad9Δ::HYGR* strains were obtained by direct replacement of the *RAD9* gene. The *rpb9Δ::HIS3 rad9Δ::KAN* strains were obtained by direct replacement of the *RPB9* gene. The *def1Δ::HYGR* strains were obtained by replacement of the *DEF1* gene in *rfi1Δ::KAN rad7Δ::URA3* diploids and subsequent tetrad dissection. Plasmids pCYC1-402 [30] and pCM184-LAUR [32] were described previously.

Expression Profiling Experiments

Yeast cells were grown at 28°C in 10 ml YPD medium to an OD₆₆₀ of 0.6. The appropriate compounds were added to reach a final concentration of 75 ng/ml (4-NQO) or 50 μg/ml (MPA). Cell harvesting, purification of total RNA and transcriptional profiling were performed using DNA microarrays containing PCR-amplified fragments of *S. cerevisiae* ORFs as previously described [79]. For each condition assayed three independent experiments were performed and dye-swapping was carried out in each case. Data were combined and the mean calculated yielding 2374 genes significant for statistical analysis. Induction or repression was considered significant when the mean of the ratios was at least 2-fold above or below mock treated cells.

High-Throughput Screen for MPA and 4-NQO Sensitivity

The screenings of the complete collection of yeast haploid mutant strains were performed as described [80], using MPA (25 μg/ml), or 4-NQO (150 ng/ml).

In Vivo Gene Expression Analysis

An indirect measurement of Gene Length Accumulation of mRNA, GLAM ratios were determined by measuring acid phosphatase of plasmid gene expression constructs sharing the same “short” transcription unit (*GALIpr::PHO5*), but differing in the 3'UTR of the “long” one (*GALIpr::PHO5-lacZ* and *GALIpr::PHO5-LAC4*) as described [24].

In Vitro Transcription Elongation Assay

Yeast cells were grown in rich YEPD medium at 30°C to an OD₆₀₀ of 1 and WCEs were prepared as described [30]. Each *in vitro* transcription reaction was performed with 100 mg WCEs and 100 ng of purified Gal4-VP16, using as template the pCYC1-402 plasmid containing the two G-less cassette used to assay transcription elongation.

ChIP Assay

Yeast cells harboring pCM184-LAUR were grown in synthetic complete medium (SC) medium at 30°C to an OD₆₀₀ of 0.5. Samples were taken and ChIP assay were performed as described previously [81]. Primer sequences are available upon request.

UV Survival Curves and Drop Assays

UV survival curves were performed as described [14]. UV irradiation was performed using germicidal lamps (Philips TUV 15 W) and a UVX radiometer (UVP) for the curves shown in Figure 6, and in a BS03 UV irradiation chamber and UV-Mat dosimeter (Dr. Gröbel UV-Elektronik GmbH) for the curves shown in Figures 7 and 9. For the drop assays, yeast cells were grown in YPD-rich medium to an OD₆₀₀ of 0.7. Serial dilutions (100-, 500-, 1000-, 5000-, and 10000-fold) were dropped on YPAD plates, irradiated with 15 J/m² UV light, and incubated in the dark at 30°C for 3 days.

Gene- and Strand-Specific Repair Assays

Irradiation and repair at the *RPB2* gene, mapping of CPDs, and analysis and quantification of membranes were carried out as described [14].

Supporting Information

Figure S1 Correlation between PHO5-lacZ/PHO5 and PHO5-LAC4/PHO5 gene expression ratios (Pearson coefficient of 0.75). Values plotted are those shown in Table S4.

Found at: doi:10.1371/journal.pgen.1000364.s001 (0.45 MB EPS)

Table S1 Analysis of genes whose expression is affected by 4-NQO and MPA. Expression of a total of 2374 genes was determined by microarray analysis after treating wild-type cells with either 75 ng/ml of 4-NQO or 50 μg/ml of MPA for 30 min each. The genes showing mRNA levels that were at least 2-fold above or below mock treated cells for each treatment are listed. The complete microarray data are available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/> under the access number GSE11561.

Found at: doi:10.1371/journal.pgen.1000364.s002 (0.06 MB PDF)

Table S2 Analysis of mutant strains leading to 4-NQO sensitivity. Growth was monitored after 48, 72, and 120 hours in 4-NQO-containing media (150 ng/ml) and the sensitive strains classified into three groups. Group A contains 189 strains whose sensitivity to 4-NQO is observed from early on (48 h) and is maintained over the course of the experiment (up to 120 h for group A1, and up to 72 h for group A2), group B contains 315 strains whose sensitivity was observed only at early time points (48 h), and group C contains 100 slow-growing strains which showed 4-NQO sensitivity only at later time points (from 72 h on and up to 120 h). The strains of group B were not considered as significantly inhibited by 4-NQO and excluded from further analyses. Values between 60% and 80% and above 80% inhibition are highlighted (orange and red, respectively).

Found at: doi:10.1371/journal.pgen.1000364.s003 (0.07 MB PDF)

Table S3 Genetic analysis of sensitivity to DNA-damaging agents. Thirty 4-NQO-sensitive strains of group A that encompassed mutations of the SAGA, PAF, CDKs, and Mediator complexes as well as proteins involved in RNAPII transcription, mRNA processing and degradation, chromatin remodeling, DNA-damage response, and translation initiation were analyzed for drug sensitivity. The indicated strains were spotted as 10-fold serial dilutions on complete minimal medium (SC) and minimal medium containing 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 4-nitroquinoline-N-oxide (4-NQO), 0.015% methyl methane sulfonate (MMS), or 0.1 nM menadione (Mnd). UV sensitivity (UV) was assessed following irradiation with 70 J/m². Plates were grown for 3 days at 30°C or 37°C and cell viability for each condition was scored as + for growth as wild-type, as +/- for moderate growth defects, and as - for severe growth defects. Most of the UV sensitive strains were also sensitive to 4-NQO, consistent with the fact that the bulky adduct produced by 4-NQO get repaired by NER (exceptions are *ctk2*, *spt5*, *bdfl*, *lsm1*, *npl6*, and *fls1*). However, 9 of the 4-NQO sensitive strains were not sensitive to UV (*spt20*, *bur2*, *med2*, *med16*, *med20*, *hpr1*, *spt4*, *rpb9*, and *swi6*), indicating that 4-NQO is more than a 'UV-mimetic' agent. Those strains appeared mainly sensitive to Mnd, reflecting their deficiencies in the presence of oxidative damage. Comparison of strain sensitivity to 4-NQO, MMS, Mnd, and heat stress did not

lead to significant clustering of cross-resistance, indicating that each drug leads to its own response, as observed previously for 15 DNA-damaging agents including MMS and 4-NQO [21,82].
Found at: doi:10.1371/journal.pgen.1000364.s004 (0.09 MB DOC)

Table S4 Analysis of mutant strains leading to MPA sensitivity. Growth was monitored after 72 hours in MPA-containing media (25 $\mu\text{g/ml}$). Strains showing at least 50% growth inhibition are listed together with their GLAM-ratios. Values above 60% inhibition and ratios below 0.5 are highlighted in red. n.d., not determined.
Found at: doi:10.1371/journal.pgen.1000364.s005 (0.03 MB PDF)

Acknowledgments

We would like to thank D. Haun for style supervision.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: HG JB LV ARG JA JLR SC AA. Performed the experiments: HG CT JB CGA MJQ LV MLGR ARG. Analyzed the data: HG AM JA JLR SC AA. Contributed reagents/materials/analysis tools: AM. Wrote the paper: HG SC AA.

References

- Saunders A, Core IJ, Lis JT (2006) Breaking barriers to transcription elongation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 557–567.
- Bentley DL (2005) Rules of engagement: co-transcriptional recruitment of pre-mRNA processing factors. *Curr Opin Cell Biol* 17: 251–256.
- Rosonina E, Kaneko S, Manley JL (2006) Terminating the transcript: breaking up is hard to do. *Genes Dev* 20: 1050–1056.
- Svejstrup JQ (2007) Contending with transcriptional arrest during RNAPII transcript elongation. *Trends Biochem Sci* 32: 165–171.
- Mellon I (2005) Transcription-coupled repair: a complex affair. *Mutat Res* 577: 155–161.
- Svejstrup JQ (2002) Mechanisms of transcription-coupled DNA repair. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 21–29.
- van Gool AJ, Verhage R, Swagemakers SM, van de Putte P, Brouwer J, et al. (1994) *RAD26*, the functional *S. cerevisiae* homolog of the Cockayne syndrome B gene *ERCC6*. *EMBO J* 13: 5361–5369.
- Venema J, Mullenders LH, Natarajan AT, van Zeeland AA, Mayne LV (1990) The genetic defect in Cockayne syndrome is associated with a defect in repair of UV-induced DNA damage in transcriptionally active DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 4707–4711.
- Laine JP, Egly JM (2006) Initiation of DNA repair mediated by a stalled RNA polymerase II. *EMBO J* 25: 387–397.
- Sarker AH, Tsutakawa SE, Kostek S, Ng C, Shin DS, et al. (2005) Recognition of RNA polymerase II and transcription bubbles by XPG, CSB, and TFIIH: insights for transcription-coupled repair and Cockayne Syndrome. *Mol Cell* 20: 187–198.
- Li S, Smerdon MJ (2002) Rpb4 and Rpb9 mediate subpathways of transcription-coupled DNA repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 21: 5921–5929.
- Li S, Ding B, Chen R, Ruggiero C, Chen X (2006) Evidence that the transcription elongation function of Rpb9 is involved in transcription-coupled DNA repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 26: 9430–9441.
- Luna R, Gaillard H, Gonzalez-Aguilera C, Aguilera A (2008) Biogenesis of mRNPs: integrating different processes in the eukaryotic nucleus. *Chromosoma* 117: 319–331.
- Gaillard H, Wellinger RE, Aguilera A (2007) A new connection of mRNP biogenesis and export with transcription-coupled repair. *Nucleic Acids Res* 35: 3893–3906.
- Ratner JN, Balasubramanian B, Corden J, Warren SL, Bregman DB (1998) Ultraviolet radiation-induced ubiquitination and proteasomal degradation of the large subunit of RNA polymerase II. Implications for transcription-coupled DNA repair. *J Biol Chem* 273: 5184–5189.
- Woudstra EC, Gilbert C, Fellows J, Jansen L, Brouwer J, et al. (2002) A Rad26-Def1 complex coordinates repair and RNA pol II proteolysis in response to DNA damage. *Nature* 415: 929–933.
- Reid J, Svejstrup JQ (2004) DNA damage-induced Def1-RNA polymerase II interaction and Def1 requirement for polymerase ubiquitylation in vitro. *J Biol Chem* 279: 29875–29878.
- Somesh BP, Reid J, Liu WF, Sogaard TM, Erdjument-Bromage H, et al. (2005) Multiple mechanisms confining RNA polymerase II ubiquitylation to polymerases undergoing transcriptional arrest. *Cell* 121: 913–923.
- Chen X, Ruggiero C, Li S (2007) Yeast Rpb9 plays an important role in ubiquitylation and degradation of Rpb1 in response to UV-induced DNA damage. *Mol Cell Biol* 27: 4617–4625.
- Thorpe GW, Fong CS, Alic N, Higgins VJ, Dawes IW (2004) Cells have distinct mechanisms to maintain protection against different reactive oxygen species: oxidative-stress-response genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 6564–6569.
- Lee W, St Onge RP, Proctor M, Flaherty P, Jordan MI, et al. (2005) Genome-wide requirements for resistance to functionally distinct DNA-damaging agents. *PLoS Genet* 1: e24. doi:10.1371/journal.pgen.0010024.
- Desmoucelles C, Pinson B, Saint-Marc C, Daignan-Fornier B (2002) Screening the yeast “disruptome” for mutants affecting resistance to the immunosuppressive drug, mycophenolic acid. *J Biol Chem* 277: 27036–27044.
- Chavez S, Garcia-Rubio M, Prado F, Aguilera A (2001) Hpr1 is preferentially required for transcription of either long or G+C-rich DNA sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 21: 7054–7064.
- Morillo-Huesca M, Vanti M, Chavez S (2006) A simple in vivo assay for measuring the efficiency of gene length-dependent processes in yeast mRNA biogenesis. *FEBS J* 273: 756–769.
- Baker SP, Grant PA (2007) The SAGA continues: expanding the cellular role of a transcriptional co-activator complex. *Oncogene* 26: 5329–5340.
- Keogh MC, Podolny V, Buratowski S (2003) Bur1 kinase is required for efficient transcription elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* 23: 7005–7018.
- Denis CL, Chiang YC, Cui Y, Chen J (2001) Genetic evidence supports a role for the yeast CCR4-NOT complex in transcriptional elongation. *Genetics* 158: 627–634.
- Weake VM, Workman JL (2008) Histone ubiquitination: triggering gene activity. *Mol Cell* 29: 653–663.
- Wood A, Shilatifard A (2006) Bur1/Bur2 and the Ctk complex in yeast: the split personality of mammalian P-TEFb. *Cell Cycle* 5: 1066–1068.
- Rondon AG, Garcia-Rubio M, Gonzalez-Barrera S, Aguilera A (2003) Molecular evidence for a positive role of Spt4 in transcription elongation. *EMBO J* 22: 612–620.
- Mason PB, Struhl K (2005) Distinction and relationship between elongation rate and processivity of RNA polymerase II in vivo. *Mol Cell* 17: 831–840.
- Jimeno S, Rondon AG, Luna R, Aguilera A (2002) The yeast THO complex and mRNA export factors link RNA metabolism with transcription and genome instability. *EMBO J* 21: 3526–3535.
- Prakash L (1989) The structure and function of *RAD6* and *RAD18* DNA repair genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome* 31: 597–600.
- Giannattasio M, Lazzaro F, Plevani P, Muzi-Falconi M (2005) The DNA damage checkpoint response requires histone H2B ubiquitination by Rad6-Bre1 and H3 methylation by Dot1. *J Biol Chem* 280: 9879–9886.
- Westmoreland TJ, Marks JR, Olson JA Jr, Thompson EM, Resnick MA, et al. (2004) Cell cycle progression in G1 and S phases is CCR4 dependent following ionizing radiation or replication stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 3: 430–446.
- Woolstencroft RN, Beilharz TH, Cook MA, Preiss T, Durocher D, et al. (2006) Ccr4 contributes to tolerance of replication stress through control of *CRT1* mRNA poly(A) tail length. *J Cell Sci* 119: 5178–5192.

37. Traven A, Hammet A, Tennis N, Denis CL, Heierhorst J (2005) Ccr4-not complex mRNA deadenylation activity contributes to DNA damage responses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 169: 65–75.
38. Paulovich AG, Armour CD, Hartwell LH (1998) The *Saccharomyces cerevisiae* *RAD9*, *RAD17*, *RAD24* and *MEC3* genes are required for tolerating irreparable, ultraviolet-induced DNA damage. *Genetics* 150: 75–93.
39. Timmers HT, Tora L (2005) SAGA unveiled. *Trends Biochem Sci* 30: 7–10.
40. Ingvarsdotir K, Krogan NJ, Emre NC, Wyce A, Thompson NJ, et al. (2005) H2B ubiquitin protease Ubp8 and Sgf11 constitute a discrete functional module within the *Saccharomyces cerevisiae* SAGA complex. *Mol Cell Biol* 25: 1162–1172.
41. Govind CK, Zhang F, Qiu H, Hofmeyer K, Hinnebusch AG (2007) Gcn5 promotes acetylation, eviction, and methylation of nucleosomes in transcribed coding regions. *Mol Cell* 25: 31–42.
42. Casamassimi A, Napoli C (2007) Mediator complexes and eukaryotic transcription regulation: an overview. *Biochimie* 89: 1439–1446.
43. Zhu X, Wren M, Sinha I, Rasmussen NN, Linder T, et al. (2006) Genome-wide occupancy profile of mediator and the Srb8-11 module reveals interactions with coding regions. *Mol Cell* 22: 169–178.
44. Wery M, Shematorova E, Van Driessche B, Vandenhautte J, Thuriaux P, et al. (2004) Members of the SAGA and Mediator complexes are partners of the transcription elongation factor TFIIS. *EMBO J* 23: 4232–4242.
45. Collart MA, Timmers HT (2004) The eukaryotic Ccr4-not complex: a regulatory platform integrating mRNA metabolism with cellular signaling pathways? *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 77: 289–322.
46. Denis CL, Chen J (2003) The CCR4-NOT complex plays diverse roles in mRNA metabolism. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 73: 221–250.
47. Panasenko O, Landrieux E, Feuermann M, Finka A, Paquet N, et al. (2006) The yeast Ccr4-Not complex controls ubiquitination of the nascent-associated polypeptide (NAC-EGD) complex. *J Biol Chem* 281: 31389–31398.
48. Xiao T, Kao CF, Krogan NJ, Sun ZW, Greenblatt JF, et al. (2005) Histone H2B ubiquitylation is associated with elongating RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* 25: 637–651.
49. Sims RJ III, Belotserkovskaya R, Reinberg D (2004) Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it. *Genes Dev* 18: 2437–2468.
50. Krogan NJ, Dover J, Wood A, Schneider J, Heidt J, et al. (2003) The Paf1 complex is required for histone H3 methylation by COMPASS and Dot1p: linking transcriptional elongation to histone methylation. *Mol Cell* 11: 721–729.
51. Wood A, Schneider J, Dover J, Johnston M, Shilatifard A (2005) The Bur1/Bur2 complex is required for histone H2B monoubiquitination by Rad6/Bre1 and histone methylation by COMPASS. *Mol Cell* 20: 589–599.
52. Fleming AB, Kao CF, Hillyer C, Pikaart M, Osley MA (2008) H2B ubiquitylation plays a role in nucleosome dynamics during transcription elongation. *Mol Cell* 31: 57–66.
53. Rondon AG, Gallardo M, Garcia-Rubio M, Aguilera A (2004) Molecular evidence indicating that the yeast PAF complex is required for transcription elongation. *EMBO Rep* 5: 47–53.
54. Penheiter KL, Washburn TM, Porter SE, Hoffman MG, Jaehning JA (2005) A posttranscriptional role for the yeast Paf1-RNA polymerase II complex is revealed by identification of primary targets. *Mol Cell* 20: 213–223.
55. Sheldon KE, Mauger DM, Arndt KM (2005) A Requirement for the *Saccharomyces cerevisiae* Paf1 complex in snoRNA 3' end formation. *Mol Cell* 20: 225–236.
56. Nordick K, Hoffman MG, Betz JL, Jaehning JA (2008) Direct interactions between the Paf1 complex and a cleavage and polyadenylation factor are revealed by dissociation of Paf1 from RNA polymerase II. *Eukaryot Cell* 7: 1158–1167.
57. Wood A, Schneider J, Dover J, Johnston M, Shilatifard A (2003) The Paf1 complex is essential for histone monoubiquitination by the Rad6-Bre1 complex, which signals for histone methylation by COMPASS and Dot1p. *J Biol Chem* 278: 34739–34742.
58. Chu Y, Simic R, Warner MH, Arndt KM, Prelich G (2007) Regulation of histone modification and cryptic transcription by the Bur1 and Paf1 complexes. *EMBO J* 26: 4646–4656.
59. Bostelman LJ, Keller AM, Albrecht AM, Arat A, Thompson JS (2007) Methylation of histone H3 lysine-79 by Dot1p plays multiple roles in the response to UV damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair* 6: 383–395.
60. Ferreira JA, Powell NG, Karabetsou N, Mellor J, Waters R (2006) Roles for Gcn5p and Ada2p in transcription and nucleotide excision repair at the *Saccharomyces cerevisiae* *MET16* gene. *Nucleic Acids Res* 34: 976–985.
61. Teng Y, Yu Y, Ferreira JA, Waters R (2005) Histone acetylation, chromatin remodelling, transcription and nucleotide excision repair in *S. cerevisiae*: studies with two model genes. *DNA Repair* 4: 870–883.
62. Moore JD, Yazgan O, Ataian Y, Krebs JE (2007) Diverse roles for histone H2A modifications in DNA damage response pathways in yeast. *Genetics* 176: 15–25.
63. Squazzo SL, Costa PJ, Lindstrom DL, Kumer KE, Simic R, et al. (2002) The Paf1 complex physically and functionally associates with transcription elongation factors in vivo. *EMBO J* 21: 1764–1774.
64. Chang M, French-Cornay D, Fan HY, Klein H, Denis CL, et al. (1999) A complex containing RNA polymerase II, Paf1p, Cdc73p, Hpr1p, and Ccr4p plays a role in protein kinase C signaling. *Mol Cell Biol* 19: 1056–1067.
65. Betz JL, Chang M, Washburn TM, Porter SE, Mueller CL, et al. (2002) Phenotypic analysis of Paf1/RNA polymerase II complex mutations reveals connections to cell cycle regulation, protein synthesis, and lipid and nucleic acid metabolism. *Mol Genet Genomics* 268: 272–285.
66. Mulder KW, Winkler GS, Timmers HT (2005) DNA damage and replication stress induced transcription of RNR genes is dependent on the Ccr4-Not complex. *Nucleic Acids Res* 33: 6384–6392.
67. Manukyan A, Zhang J, Thippeswamy U, Yang J, Zavala N, et al. (2008) Ccr4 alters cell size in yeast by modulating the timing of *CLN1* and *CLN2* expression. *Genetics* 179: 345–357.
68. Al-Moghrabi NM, Al-Sharif IS, Aboussekhra A (2001) The *Saccharomyces cerevisiae* *RAD9* cell cycle checkpoint gene is required for optimal repair of UV-induced pyrimidine dimers in both G(1) and G(2)/M phases of the cell cycle. *Nucleic Acids Res* 29: 2020–2025.
69. Mulder KW, Brenkman AB, Inagaki A, van den Broek NJ, Marc Timmers HT (2007) Regulation of histone H3K4 tri-methylation and PAF complex recruitment by the Ccr4-Not complex. *Nucleic Acids Res* 35: 2428–2439.
70. Tucker M, Valencia-Sanchez MA, Staples RR, Chen J, Denis CL, et al. (2001) The transcription factor associated Ccr4 and Caf1 proteins are components of the major cytoplasmic mRNA deadenylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 104: 377–386.
71. Lee SK, Yu SL, Prakash L, Prakash S (2001) Requirement for yeast *RAD26*, a homolog of the human *CSB* gene, in elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* 21: 8651–8656.
72. Selby CP, Sancar A (1997) Cockayne syndrome group B protein enhances elongation by RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 11205–11209.
73. Jansen LE, den Dulk H, Brouns RM, de Ruijter M, Brandsma JA, et al. (2000) Spt4 modulates Rad26 requirement in transcription-coupled nucleotide excision repair. *EMBO J* 19: 6498–6507.
74. Lommel L, Gregory SM, Becker KI, Sweder KS (2000) Transcription-coupled DNA repair in yeast transcription factor IIE (TFIIE) mutants. *Nucleic Acids Res* 28: 835–842.
75. Tijsterman M, Tasserion-de Jong JG, Verhage RA, Brouwer J (1998) Defective Kin28, a subunit of yeast TFIIE, impairs transcription-coupled but not global genome nucleotide excision repair. *Mutat Res* 409: 181–188.
76. Chen J, Chiang YC, Denis CL (2002) CCR4, a 3'-5' poly(A) RNA and ssDNA exonuclease, is the catalytic component of the cytoplasmic deadenylase. *EMBO J* 21: 1414–1426.
77. Ohn T, Chiang YC, Lee DJ, Yao G, Zhang C, et al. (2007) CAF1 plays an important role in mRNA deadenylation separate from its contact to CCR4. *Nucleic Acids Res* 35: 3002–3015.
78. Park JS, Marr MT, Roberts JW (2002) *E. coli* Transcription repair coupling factor (Mfd protein) rescues arrested complexes by promoting forward translocation. *Cell* 109: 757–767.
79. Viladevall L, Serrano R, Ruiz A, Domenech G, Giraldo J, et al. (2004) Characterization of the calcium-mediated response to alkaline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 279: 43614–43624.
80. Botet J, Rodriguez-Mateos M, Ballesta JP, Revuelta JL, Remacha M (2008) A chemical genomic screen in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a role for diphthamide of translation elongation factor 2 in inhibition of protein synthesis by sordarin. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 1623–1629.
81. Gonzalez-Aguilera C, Tous C, Gomez-Gonzalez B, Huertas P, Luna R, et al. (2008) The THP1-SAC3-SUS1-CDC31 complex works in transcription elongation-mRNA export preventing RNA-mediated genome instability. *Mol Biol Cell* 19: 4310–4318.
82. Chang M, Bellaoui M, Boone C, Brown GW (2002) A genome-wide screen for methyl methanesulfonate-sensitive mutants reveals genes required for S phase progression in the presence of DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 16934–16939.

Material Adicional

Supporting Information:

Figure S1. (<http://www.plosgenetics.org/article/fetchSingleRepresentation.action?uri=info:doi/10.1371/journal.pgen.1000364.s001>)

Correlation between *PHO5-lacZ/PHO5* and *PHO5-LAC4/PHO5* gene expression ratios (Pearson coefficient of 0.75). Values plotted are those shown in Table S4.

Table S1. (<http://www.plosgenetics.org/article/fetchSingleRepresentation.action?uri=info:doi/10.1371/journal.pgen.1000364.s002>)

Analysis of genes whose expression is affected by 4-NQO and MPA. Expression of a total of 2374 genes was determined by microarray analysis after treating wild-type cells with either 75 ng/ml of 4-NQO or 50 µg/ml of MPA for 30 min each. The genes showing mRNA levels that were at least 2-fold above or below mock treated cells for each treatment are listed. The complete microarray data are available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/> under the access number GSE11561.

Table S2. (<http://www.plosgenetics.org/article/fetchSingleRepresentation.action?uri=info:doi/10.1371/journal.pgen.1000364.s003>)

Analysis of mutant strains leading to 4-NQO sensitivity. Growth was monitored after 48, 72, and 120 hours in 4-NQO-containing media (150 ng/ml) and the sensitive strains classified into three groups. Group A contains 189 strains whose sensitivity to 4-NQO is observed from early on (48 h) and is maintained over the course of the experiment (up to 120 h for group A1, and up to 72 h for group A2), group B contains 315 strains whose sensitivity was observed only at early time points (48 h), and group C contains 100 slow-growing strains which showed 4-NQO sensitivity only at later time points (from 72 h on and up to 120 h). The strains of group B were not considered as significantly inhibited by 4-NQO and excluded from further analyses. Values between 60% and 80% and above 80% inhibition are highlighted (orange and red, respectively).

Table S3. (<http://www.plosgenetics.org/article/fetchSingleRepresentation.action?uri=info:doi/10.1371/journal.pgen.1000364.s004>)

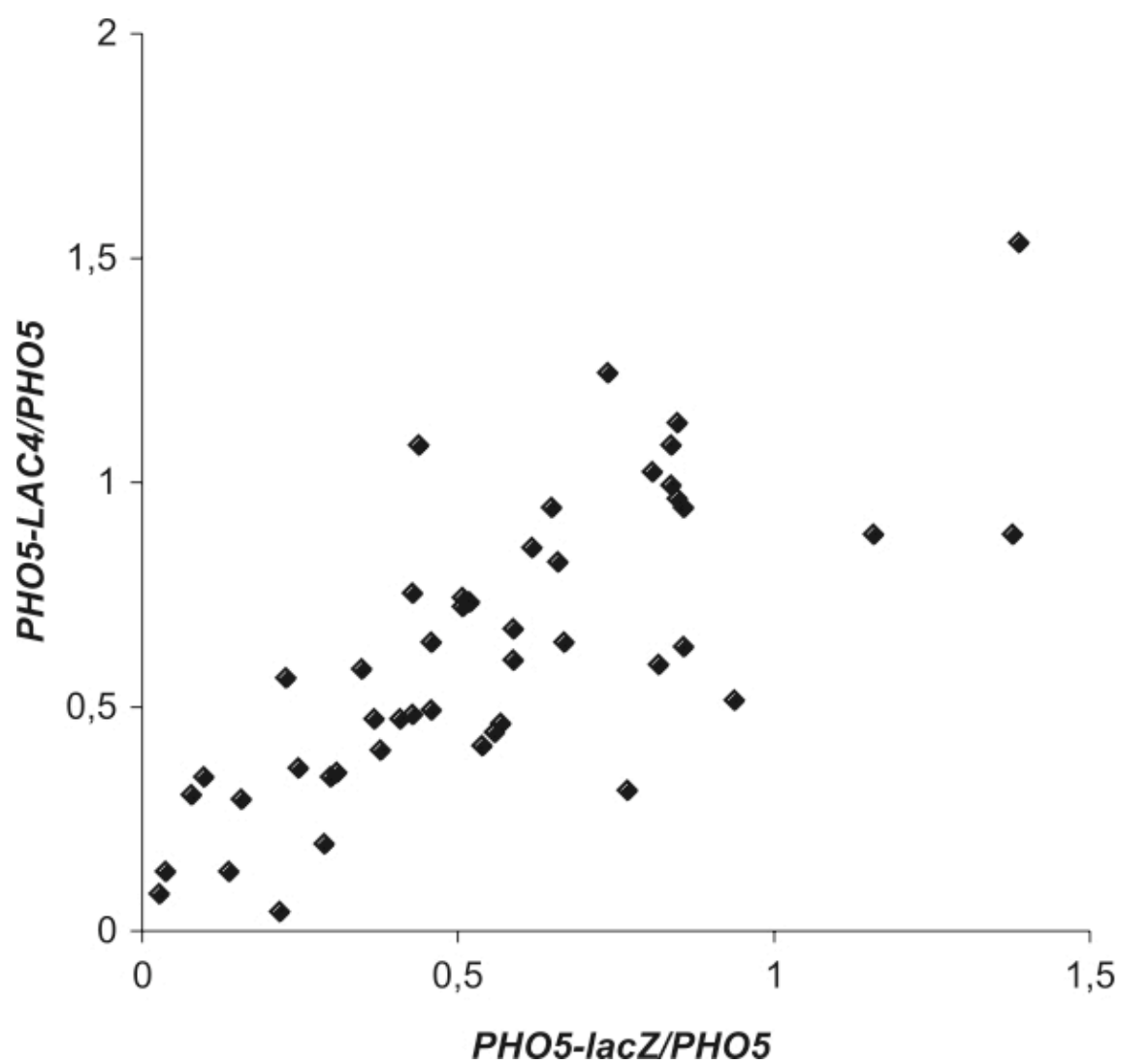
Genetic analysis of sensitivity to DNA-damaging agents. Thirty 4-NQO-sensitive strains of group A that encompassed mutations of the SAGA, PAF, CDKs, and Mediator complexes as well as proteins involved in RNAPII transcription, mRNA processing and degradation, chromatin remodeling, DNA-damage response, and translation initiation were analyzed for drug sensitivity. The indicated strains were spotted as 10-fold serial dilutions on complete minimal medium (SC) and minimal medium containing 0.1 µg/ml 4-nitroquinoline-N-oxide (4-NQO), 0,015% methyl methane sulfonate (MMS), or 0.1 nM menadione (Mnd). UV sensitivity (UV) was assessed following irradiation with 70 J/m². Plates were grown for 3 days at 30°C or 37°C and cell viability for each condition was scored as + for growth as wild-type, as +/- for moderate growth defects, and as - for severe growth defects. Most of the UV sensitive strains

were also sensitive to 4-NQO, consistent with the fact that the bulky adduct produced by 4-NQO get repaired by NER (exceptions are *ctk2*, *spt5*, *bdf1*, *lsm1*, *npl6*, and *fps1*). However, 9 of the 4-NQO sensitive strains were not sensitive to UV (*spt20*, *bur2*, *med2*, *med16*, *med20*, *hpr1*, *spt4*, *rpb9*, and *swi6*), indicating that 4-NQO is more than a 'UV-mimetic' agent. Those strains appeared mainly sensitive to Mnd, reflecting their deficiencies in the presence of oxidative damage. Comparison of strain sensitivity to 4-NQO, MMS, Mnd, and heat stress did not lead to significant clustering of cross-resistance, indicating that each drug leads to its own response, as observed previously for 15 DNA-damaging agents including MMS and 4-NQO [21],[82].

Table S4. (<http://www.plosgenetics.org/article/fetchSingleRepresentation.action?uri=info:doi/10.1371/journal.pgen.1000364.s005>)

Analysis of mutant strains leading to MPA sensitivity. Growth was monitored after 72 hours in MPA-containing media (25 µg/ml). Strains showing at least 50% growth inhibition are listed together with their GLAM-ratios. Values above 60% inhibition and ratios below 0.5 are highlighted in red. n.d., not determined.

Figure S1



Supplementary Table S1

MPA:			4-NQO:		
ORF	Name	fold expression change	ORF	Name	fold expression change
YML128C	MSC1	11,9	YJR073C	OPI3	11,7
YFL014W	HSP12	6,8	YLR178C	TFS1	6,4
YKL035W	UGP1	6,9	YLR109W	AHP1	5,3
YNL055C	POR1	7	YHR087W		4,5
YGR248W	SOL4	7	YFL014W	HSP12	4,2
YLR134W	PDC5	5,8	YCL040W	GLK1	4,1
YKR042W	UTH1	6,8	YMR250W	GAD1	4
YHR019C	DED81	7,5	YML028W	TSA1	3,9
YAR073W	IMD1	12,6	YML131W		3,9
YKL081W	TEF4	5,9	YBL064C	PRX1	3,7
YCL040W	GLK1	5	YMR105C	PGM2	3,6
YLL026W	HSP104	5,8	YDR154C		3,6
YGL008C	PMA1	5,4	YJR104C	SOD1	3,5
YMR096W	SNZ1	7,3	YLR158C	ASP3-3	3,5
YGL215W	CLG1	7,9	YLR438W	CAR2	3,4
YPR028W	YOP1	5,8	YOL053C-A		3,4
YLL028W	TPO1	3,8	YNL200C		3,4
YMR303C	ADH2	3,7	YER026C	CHO1	3,1
YLR432W	IMD3	8,3	YHL021C	FMP12	3,1
YPR149W	NCE102	4,5	YHR137W	ARO9	3,1
YHR216W	IMD2	8,3	YIR038C	GTT1	3,1
YGL245W		3,9	YDR155C	CPR1	3
YNL003C	PET8	3,6	YPR184W	GDB1	3
YMR046C		4,4	YJL151C	SNA3	3
YBR214W	SDS24	4,6	YJR074W	MOG1	2,9
YJR121W	ATP2	4	YMR090W		2,9
YHL015W	RPS20	9,7	YML117W-A		2,9
YAR010C		4,9	YMR251W-A	HOR7	2,9
YOL041C	NOP12	5	YHR033W		2,9
YLR356W		3,1	YGR209C	TRX2	2,9
YKL152C	GPM1	3,1	YDR360W		2,9
YAL005C	SSA1	5,5	YMR041C		2,9
YER081W	SER3	4,7	YBR126C	TPS1	2,8
YGL037C	PNC1	6,1	YNL208W		2,7
YBL045C	COR1	3,3	YNL274C		2,7
YNL160W	YGP1	3,9	YLR356W		2,6
YBR286W	APE3	4,7	YPL154C	PEP4	2,6
YML040W		3	YOL134C		2,6
YML045W		3,3	YLR160C	ASP3-4	2,5
YHR008C	SOD2	4	YBR173C	UMP1	2,5
YIR034C	LYS1	4	YBR052C		2,5
YDR033W	MRH1	5,2	YJL026W	RNR2	2,4
YMR105C	PGM2	3,8	YNL003C	PET8	2,4
YBR263W	SHM1	3,8	YJL217W		2,4
YBR011C	IPP1	3,9	YER150W	SPI1	2,4
YHR011W	DIA4	3	YAL012W	CYS3	2,4
YOR120W	GCY1	3,5	YOL147C	PEX11	2,4
YMR203W	TOM40	3,3	YMR276W	DSK2	2,4
YMR251W-A	HOR7	2,9	YLR259C	HSP60	2,4
YMR051C		3,7	YGL077C	HNM1	2,3
YJR026W		3,8	YOR020C	HSP10	2,3
YBR234C	ARC40	3,5	YOL110W	SHR5	2,3

Supplementary Table S1

YNL036W	NCE103	5,1	YMR096W	SNZ1	2,3
YIR038C	GTT1	3	YDR178W	SDH4	2,3
YGR279C	SCW4	3	YDR533C		2,3
YLL018C	DPS1	4	YHR113W		2,3
YMR173W	DDR48	3,5	YEL011W	GLC3	2,3
YMR116C	ASC1	3	YKL150W	MCR1	2,2
YKR066C	CCP1	3,6	YJL079C	PRY1	2,2
YNL134C		3,5	YOR382W	FIT2	2,2
YOR161C		3	YGL012W	ERG4	2,2
YKL019W	RAM2	3,5	YOR004W		2,2
YML070W	DAK1	2,8	YJR085C		2,2
YKL085W	MDH1	2,9	YCR061W		2,2
YGL123W	RPS2	3,9	YDR063W		2,2
YOR230W	WTM1	3,4	YEL060C	PRB1	2,2
YGR055W	MUP1	2,6	YBR287W		2,2
YLL045C	RPL8B	3,5	YAL039C	CYC3	2,2
YER178W	PDA1	4	YDR513W	TTR1	2,2
YML085C	TUB1	3,8	YCR044C	PER1	2,1
YJR139C	HOM6	3,5	YJR001W	AVT1	2,1
YBL099W	ATP1	3,5	YLR286C	CTS1	2,1
YOL129W	VPS68	2,5	YOR285W		2,1
YDL004W	ATP16	3,4	YBR214W	SDS24	2,1
YEL011W	GLC3	4	YDL014W	NOP1	2,1
YER062C	HOR2	3,8	YGL037C	PNC1	2,1
YBR074W		4,1	YIL112W	HOS4	2,1
YFR053C	HXK1	3,9	YDR134C		2,1
YML004C	GLO1	2,7	YPR183W	DPM1	2,1
YGR149W		2,8	YMR316W	DIA1	2,1
YER009W	NTF2	3,5	YDR095C		2,1
YGL185C		2,5	YLR202C		2,1
YGL026C	TRP5	2,8	YIL154C	IMP2'	2,1
YJL138C	TIF2	4,4	YMR120C	ADE17	2
YDR388W	RVS167	2,5	YMR071C	TVP18	2
YLR058C	SHM2	3,4	YLR043C	TRX1	2
YBR078W	ECM33	2,6	YCR067C	SED4	2
YJR028W		3,3	YLR391W-A		2
YDL046W	NPC2	2,5	YMR202W	ERG2	2
YJL026W	RNR2	3,9	YML078W	CPR3	2
YMR099C		3	YDR171W	HSP42	2
YDR368W	YPR1	2,8	YOL038W	PRE6	2
YER138C		5,6	YDR511W	ACN9	2
YML110C	COQ5	2,9	YOL079W		2
YNL274C		2,5	YOL165C	AAD15	2
YBR196C	PGI1	2,8	YLR155C	ASP3-1	2
YPL106C	SSE1	6	YPR053C		2
YPL135W	ISU1	3,3	YDR100W	TVP15	2
YBR162C	TOS1	3,5	YOR103C	OST2	2
YPR063C		2,8	YGL214W		0,5
YDR440W	DOT1	2,6	YGR102C		0,5
YLL044W		4,4	YPR023C	EAF3	0,5
YBR221C	PDB1	4,4	YCR087W		0,5
YGL011C	SCL1	3,3	YPL049C	DIG1	0,5
YDL204W	RTN2	2,4	YHR077C	NMD2	0,5
YML058W	SML1	2,3	YPL240C	HSP82	0,5
YNL071W	LAT1	3,7	YDR232W	HEM1	0,5
YHL021C		3,2	YOR359W	VTS1	0,5
YML012W	ERV25	3,2	YHR010W	RPL27A	0,5
YHR190W	ERG9	3	YMR233W		0,5

Supplementary Table S1

YDL066W	IDP1	2,9	YDL114W		0,5
YOR221C	MCT1	3,1	YBR034C	HMT1	0,5
YOL030W	GAS5	2,3	YOL059W	GPD2	0,5
YDR516C	EMI2	3,1	YKL148C	SDH1	0,5
YMR250W	GAD1	2,6	YBR189W	RPS9B	0,5
YHR092C	HXT4	2,3	YDR347W	MRP1	0,5
YPL262W	FUM1	2,7	YOL070C		0,5
YFR044C		2,5	YHR097C		0,5
YLL039C	UBI4	2,7	YER086W	ILV1	0,5
YML048W	GSF2	2,3	YMR278W		0,5
YHR017W	YSC83	2,3	YGR103W	NOP7	0,5
YLR354C	TAL1	2,3	YPL051W	ARL3	0,5
YGR204W	ADE3	2,9	YDR174W	HMO1	0,5
YEL027W	CUP5	2,8	YKL019W	RAM2	0,5
YDR099W	BMH2	3,5	YER036C		0,5
YDR483W	KRE2	2,8	YBR154C	RPB5	0,5
YHR071W	PCL5	2,8	YDR277C	MTH1	0,5
YGL202W	ARO8	3	YLR459W	CDC91	0,5
YOR065W	CYT1	2,5	YJR145C	RPS4A	0,5
YBL030C	PET9	2,8	YBR288C	APM3	0,5
YLL024C	SSA2	3,5	YGL123W	RPS2	0,5
YDR342C	HXT7	2,3	YJR007W	SUI2	0,5
YBR149W	ARA1	2,5	YBL072C	RPS8A	0,5
YMR316W	DIA1	2,5	YDR341C		0,5
YOR374W	ALD4	3,3	YHR160C	PEX18	0,5
YDR538W	PAD1	2,5	YDL161W	ENT1	0,5
YGR268C	HUA1	2,5	YGL148W	ARO2	0,5
YKR059W	TIF1	2,8	YDR033W	MRH1	0,5
YDR055W	PST1	2,1	YHR043C	DOG2	0,5
YBR139W		2,5	YLR256W	HAP1	0,5
YGL191W	COX13	2,3	YPL081W	RPS9A	0,5
YHR207C	SET5	3,3	YGR159C	NSR1	0,5
YBR056W		3	YMR083W	ADH3	0,5
YPR196W		2,7	YJL148W	RPA34	0,5
YBR035C	PDX3	2,4	YCL059C	KRR1	0,5
YLR150W	STM1	2,7	YDR245W	MNN10	0,5
YBR288C	APM3	2,9	YGR086C	PIL1	0,5
YOR153W	PDR5	2,2	YER165W	PAB1	0,5
YJR027W		5,3	YML026C	RPS18B	0,5
YOL053C-A		2,2	YOR078W	BUD21	0,5
YNR001C	CIT1	2,8	YNL016W	PUB1	0,5
YDL237W		2,5	YOL041C	NOP12	0,5
YFL039C	ACT1	2,2	YMR236W	TAF9	0,5
YER043C	SAH1	2,5	YER081W	SER3	0,5
YER102W	RPS8B	2,9	YLR201C	FMP53	0,5
YDR345C	HXT3	2,1	YLR300W	EXG1	0,5
YER090W	TRP2	3	YGR078C	PAC10	0,5
YKL100C		2	YLR196W	PWP1	0,5
YGR106C		2,4	YGR137W		0,5
YER160C		4,3	YNL030W	HHF2	0,5
YHR042W	NCP1	2,1	YOR047C	STD1	0,5
YDR343C	HXT6	2,2	YIL074C	SER33	0,5
YDL139C	SCM3	2,1	YHL003C	LAG1	0,5
YMR163C		0,5	YER056C-A	RPL34A	0,5
YPL254W	HF11	0,5	YHR042W	NCP1	0,5
YKL099C	UTP11	0,5	YKL211C	TRP3	0,5
YER019W	ISC1	0,4	YLR289W	GUF1	0,5
YDL121C		0,5	YMR058W	FET3	0,5

Supplementary Table S1

YER107C	GLE2	0,5	YLR332W	MID2	0,5
YOR392W		0,5	YDR518W	EUG1	0,5
YPL059W	GRX5	0,5	YLR339C		0,5
YLR297W		0,4	YKL185W	ASH1	0,5
YOR339C	UBC11	0,5	YHR020W		0,5
YOR041C		0,3	YER055C	HIS1	0,5
YPL095C		0,5	YFR031C-A	RPL2A	0,5
YDR424C	DYN2	0,4	YGR285C	ZUO1	0,5
YDR193W		0,4	YLR330W	CHS5	0,5
YJR074W	MOG1	0,5	YLR150W	STM1	0,5
YOR224C	RPB8	0,5	YLR143W		0,5
YKL222C		0,5	YPR080W	TEF1	0,5
YCR013C		0,4	YHR030C	SLT2	0,5
YPL192C	PRM3	0,5	YPR181C	SEC23	0,5
YKL002W	DID4	0,5	YDR046C	BAP3	0,5
YPR082C	DIB1	0,4	YPR010C	RPA135	0,5
YPR153W		0,4	YOR145C	PNO1	0,5
YDR511W	ACN9	0,4	YKL176C	LST4	0,5
YPR200C	ARR2	0,3	YGR034W	RPL26B	0,5
YPR123C		0,4	YGL181W	GTS1	0,5
YPR017C	DSS4	0,4	YOL148C	SPT20	0,5
YOL012C	HTZ1	0,5	YMR194W	RPL36A	0,5
YDR053W		0,3	YGR268C	HUA1	0,5
YER105C	NUP157	0,5	YHL001W	RPL14B	0,5
YDR357C		0,5	YDL133W		0,5
YPR100W	MRPL51	0,4	YBR011C	IPP1	0,5
YDR433W		0,5	YIL053W	RHR2	0,5
YOR200W		0,4	YIL078W	THS1	0,5
YPR168W	NUT2	0,5	YKL180W	RPL17A	0,5
YCL013W		0,4	YMR121C	RPL15B	0,5
YDL123W	SNA4	0,5	YOR051C		0,5
YHR165C	PRP8	0,5	YFL005W	SEC4	0,5
YOR382W	FIT2	0,4	YDR091C	RLI1	0,5
YOL165C	AAD15	0,4	YPL219W	PCL8	0,5
YCR046C	IMG1	0,5	YAL003W	EFB1	0,5
YDR100W	TVP15	0,5	YEL054C	RPL12A	0,5
YOL079W		0,4	YAL005C	SSA1	0,5
YER137C		0,5	YDR450W	RPS18A	0,5
YOR286W		0,5	YKR094C	RPL40B	0,5
YCRX12W		0,5	YBR121C	GRS1	0,5
YIL121W	QDR2	0,5	YDL191W	RPL35A	0,5
YNL329C	PEX6	0,4	YDR447C	RPS17B	0,5
YGL077C	HNM1	0,5	YOR168W	GLN4	0,5
YHR021C	RPS27B	0,5	YDR068W	DOS2	0,5
YOR103C	OST2	0,3	YNL062C	GCD10	0,5
YPR193C	HPA2	0,4	YBL068W	PRS4	0,5
YOR055W		0,4	YHR182C-A		0,5
YPL200W	CSM4	0,3	YMR108W	ILV2	0,5
YDR366C		0,3	YNL112W	DBP2	0,5
YPL163C	SVS1	0,5	YGL009C	LEU1	0,5
YNL170W		0,5	YER183C	FAU1	0,5
YBL002W	HTB2	0,5	YDR259C	YAP6	0,5
YHL025W	SNF6	0,5	YDR471W	RPL27B	0,5
YOR012W		0,4	YBR048W	RPS11B	0,5
YBL083C		0,5	YOR096W	RPS7A	0,5
YPL225W		0,5	YGR085C	RPL11B	0,4
YPR188C	MLC2	0,5	YGR082W	TOM20	0,4
YOR052C		0,4	YML024W	RPS17A	0,4

Supplementary Table S1

YGR184C	UBR1	0,5	YNL178W	RPS3	0,4
YPR064W		0,4	YGL147C	RPL9A	0,4
YOR226C	ISU2	0,5	YBR084C-A	RPL19A	0,4
YDR445C		0,5	YGL076C	RPL7A	0,4
YPL276W	FDH2	0,3	YOL109W	ZEO1	0,4
YBR296C	PHO89	0,4	YPL281C	ERR2	0,4
YPL238C		0,3	YLR029C	RPL15A	0,4
YEL077C		0,5	YDL075W	RPL31A	0,4
YDR344C		0,5	YLL018C	DPS1	0,4
YGL255W	ZRT1	0,4	YPL007C	TFC8	0,4
YDR442W		0,5	YML042W	CAT2	0,4
YPR130C		0,3	YDR075W	PPH3	0,4
YDR437W		0,4	YPL079W	RPL21B	0,4
YOR325W		0,5	YMR046C		0,4
YBR291C	CTP1	0,3	YJL200C		0,4
YPR050C		0,3	YOR063W	RPL3	0,4
YDR060W	MAK21	0,5	YKL081W	TEF4	0,4
YIR035C		0,4	YMR309C	NIP1	0,4
YOR263C		0,3	YIL133C	RPL16A	0,4
YOL108C	INO4	0,3	YLR448W	RPL6B	0,4
YOR218C		0,3	YOL120C	RPL18A	0,4
YDR012W	RPL4B	0,5	YPR102C	RPL11A	0,4
YDR544C		0,5	YNL067W	RPL9B	0,4
YOR183W	FYV12	0,3	YJR026W		0,4
YDR073W	SNF11	0,5	YNL050C		0,4
YLR186W	EMG1	0,3	YIL069C	RPS24B	0,4
YDR095C		0,4	YBR115C	LYS2	0,4
YJR024C		0,4	YJR045C	SSC1	0,4
YOR139C		0,3	YMR217W	GUA1	0,4
YDR462W	MRPL28	0,5	YLR175W	CBF5	0,4
YMR103C		0,5	YOR133W	EFT1	0,4
YJR113C	RSM7	0,4	YFL063W		0,4
YOR333C	SWF5	0,4	YDR025W	RPS11A	0,4
YDR063W		0,4	YNL042W	BOP3	0,4
YOR044W		0,3	YPL190C	NAB3	0,4
YLR198C		0,5	YML056C	IMD4	0,4
YDR156W	RPA14	0,4	YKR059W	TIF1	0,4
YNL300W		0,5	YNL069C	RPL16B	0,4
YOR222W	ODC2	0,4	YMR153W	NUP53	0,4
YDR526C		0,3	YDR367W		0,4
YOR257W	CDC31	0,5	YDL184C	RPL41A	0,4
YOR013W		0,3	YNL104C	LEU4	0,4
YPL111W	CAR1	0,5	YPL090C	RPS6A	0,4
YOR169C		0,3	YGR240C	PFK1	0,4
YMR308C	PSE1	0,4	YJL189W	RPL39	0,4
YOR252W		0,3	YBL027W	RPL19B	0,4
YDR224C	HTB1	0,5	YIL052C	RPL34B	0,4
YDL125C	HNT1	0,3	YNL096C	RPS7B	0,4
YGR085C	RPL11B	0,4	YML073C	RPL6A	0,4
YBL077W		0,4	YBR092C	PHO3	0,4
YFL007W	BLM3	0,3	YDR382W	RPP2B	0,4
YDR225W	HTA1	0,3	YBR191W	RPL21A	0,4
YMR241W	YHM2	0,3	YDL082W	RPL13A	0,4
YDL208W	NHP2	0,4	YDR318W	MCM21	0,4
YLR029C	RPL15A	0,3	YGR148C	RPL24B	0,4
YER053C		0,3	YGR118W	RPS23A	0,4
YOR063W	RPL3	0,3	YMR235C	RNA1	0,4
YHR030C	SLT2	0,4	YPR065W	ROX1	0,4

Supplementary Table S1

YPL249C	GYP5	0,3	YER102W	RPS8B	0,4
YMR121C	RPL15B	0,3	YLL048C	YBT1	0,4
YEL033W		0,3	YKL077W		0,4
YJL129C	TRK1	0,3	YMR051C		0,4
YBL003C	HTA2	0,3	YMR231W	PEP5	0,4
YDR093W	DNF2	0,2	YEL053W-A		0,4
YNL112W	DBP2	0,2	YJL034W	KAR2	0,4
YDL171C	GLT1	0,2	YMR242C	RPL20A	0,4
YBR031W	RPL4A	0,2	YPL160W	CDC60	0,4
YGR159C	NSR1	0,3	YAR010C		0,4
YNL178W	RPS3	0,1	YDR481C	PHO8	0,4
			YDL218W		0,4
			YOL097C	WRS1	0,4
			YLR197W	SIK1	0,4
			YPL116W	HOS3	0,4
			YDR234W	LYS4	0,4
			YGR119C	NUP57	0,4
			YHR219W		0,4
			YEL036C	ANP1	0,4
			YOR393W	ERR1	0,4
			YHR135C	YCK1	0,4
			YBR054W	YRO2	0,4
			YOR351C	MEK1	0,4
			YGR214W	RPS0A	0,4
			YNL251C	NRD1	0,4
			YML010W-A		0,4
			YDR417C		0,4
			YLR249W	YEF3	0,4
			YGL245W		0,4
			YPL009C		0,4
			YJR028W		0,4
			YDR505C	PSP1	0,4
			YOR312C	RPL20B	0,4
			YPL106C	SSE1	0,4
			YOR195W	SLK19	0,4
			YDR346C	SVF1	0,4
			YGR094W	VAS1	0,4
			YJR121W	ATP2	0,3
			YDL136W	RPL35B	0,3
			YGL206C	CHC1	0,3
			YBR181C	RPS6B	0,3
			YGL103W	RPL28	0,3
			YHR094C	HXT1	0,3
			YOR293W	RPS10A	0,3
			YDR023W	SES1	0,3
			YML045W		0,3
			YJR029W		0,3
			YML040W		0,3
			YLR075W	RPL10	0,3
			YDL052C	SLC1	0,3
			YLL044W		0,3
			YLR048W	RPS0B	0,3
			YMR142C	RPL13B	0,3
			YHL033C	RPL8A	0,3
			YDR385W	EFT2	0,3
			YDR035W	ARO3	0,3
			YPL131W	RPL5	0,3
			YPR033C	HTS1	0,3

Supplementary Table S1

YPR145W	ASN1	0,3
YNL223W	ATG4	0,3
YGL026C	TRP5	0,3
YLL045C	RPL8B	0,3
YNL190W		0,3
YPL198W	RPL7B	0,3
YER131W	RPS26B	0,3
YIL131C	FKH1	0,3
YJL138C	TIF2	0,3
YIL094C	LYS12	0,3
YNL031C	HHT2	0,3
YOR309C		0,3
YHL015W	RPS20	0,3
YOR335C	ALA1	0,3
YHR064C	SSZ1	0,3
YJR027W		0,3
YCR053W	THR4	0,2
YBR010W	HHT1	0,2
YBR009C	HHF1	0,2
YLR413W		0,2
YBL002W	HTB2	0,2
YML063W	RPS1B	0,2
YGR229C	SMI1	0,2
YNL209W	SSB2	0,2
YCL030C	HIS4	0,2
YER138C		0,2
YPR074C	TKL1	0,2
YGL008C	PMA1	0,2
YER160C		0,2
YBL003C	HTA2	0,2
YGR069W		0,2
YNL230C	ELA1	0,1
YGL055W	OLE1	0,1
YDR116C	MRPL1	0,1

Supplementary Table S2

Group A1:

ORF	Name	%INH 4NQO 48h	%INH 4NQO 72h	%INH 4NQO 120h
YLR032W	RAD5	90,59	90,74	93,53
YMR201C	RAD14	92,64	93,04	92,94
YNL073W	MSK1	88,78	92,83	92,75
YMR190C	SGS1	92,67	92,88	92,67
YHR051W	COX6	82,44	92,33	92,33
YNL081C	SWS2	86,55	92,44	92,33
YPL022W	RAD1	92,20	92,33	92,33
YLR295C	ATP14	91,87	92,37	92,27
YLR235C		92,23	92,25	92,25
YJL124C	LSM1	92,06	92,23	92,23
YPL024W	NCE4	92,12	92,05	92,16
YER050C	RSM18	89,78	90,79	92,13
YPL194W	DDC1	92,12	92,38	92,08
YMR151W	YIM2	92,02	92,08	92,08
YML096W		91,32	91,38	92,05
YOR231W	MKK1	92,08	92,05	92,05
YBR101C	FES1	91,74	91,80	91,99
YLR234W	TOP3	91,88	91,96	91,96
YDL005C	MED2	91,64	91,79	91,89
YLR038C	COX12	90,64	91,00	91,76
YEL037C	RAD23	91,81	91,36	91,75
YML129C	COX14	91,02	91,27	91,68
YPR124W	CTR1	86,74	91,58	91,67
YMR084W		84,18	90,99	91,62
YLR320W	MMS22	91,49	91,57	91,57
YML095C	RAD10	90,85	90,94	91,53
YMR097C	MTG1	90,67	90,89	91,53
YEL044W	IES6	91,05	90,83	91,52
YPL078C		90,83	91,51	91,51
YKR085C	MRPL20	88,47	92,12	91,50
YER095W	RAD51	89,92	89,96	91,50
YLR182W	SWI6	91,58	91,60	91,49
YOR065W	CYT1	81,40	91,47	91,47
YGL058W	RAD6	90,23	90,56	91,44
YBR114W	RAD16	91,05	91,26	91,44
YGL025C	PGD1	90,81	91,24	91,44
YOR201C	PET56	91,14	91,39	91,39
YFL036W	RPO41	87,65	90,47	91,38
YGL024W		90,33	90,99	91,38
YDL116W	NUP84	90,84	91,23	91,33
YOL051W	GAL11	91,06	91,27	91,27
YJL140W	RPB4	91,18	91,65	91,22
YML007W	YAP1	90,81	91,11	91,21
YNL139C	RLR1	91,21	91,07	91,17
YMR158W	MRPS8	89,84	89,99	91,16
YMR072W	ABF2	81,87	90,35	91,16
YLR226W	BUR2	90,40	91,02	91,13
YML011C		91,92	92,15	91,10

Supplementary Table S2

YJL075C		90,60	91,20	90,99
YPR047W	MSF1	84,38	90,98	90,98
YPR116W		84,06	90,77	90,97
YLR240W	VPS34	90,86	90,94	90,94
YLR399C	BDF1	90,68	90,78	90,90
YBR094W		90,68	90,88	90,88
YDR337W	MRPS28	87,16	90,78	90,87
YDR237W	MRPL7	90,37	90,85	90,85
YML032C	RAD52	90,66	90,95	90,84
YCR053W	THR4	90,33	90,94	90,84
YGL163C	RAD54	89,81	90,32	90,74
YDR264C	AKR1	90,50	90,62	90,72
YLR244C	MAP1	90,81	90,94	90,71
YGL070C	RPB9	80,22	90,52	90,63
YDR322W	MRPL35	88,61	90,60	90,60
YDL160C	DHH1	90,20	90,50	90,59
YKL054C	DEF1	90,53	90,69	90,58
YER103W	SSA4	90,12	90,53	90,53
YDR138W	HPR1	88,85	90,38	90,48
YBR037C	SCO1	90,11	90,48	90,48
YBR251W	MRPS5	82,42	90,36	90,46
YER162C	RAD4	90,11	90,34	90,43
YDL057W		89,73	90,32	90,42
YDR296W	MHR1	87,65	90,18	90,39
YPL132W	COX11	89,49	90,70	90,38
YDR004W	RAD57	89,92	90,26	90,35
YAL021C		90,13	90,21	90,31
YCR003W	MRPL32	88,70	90,19	90,29
YDL167C	NRP1	89,17	90,36	90,26
YOL148C	SPT20	88,44	90,62	90,23
YMR198W	CIK1	91,94	91,91	90,17
YDL067C	COX9	89,61	90,06	90,17
YGL167C	PMR1	90,23	90,59	90,14
YDR230W		89,50	90,04	90,14
YHR091C	MSR1	86,13	92,12	90,05
YCR066W	RAD18	90,72	90,69	90,04
YDR268W	MSW1	83,55	89,93	90,03
YDR283C	GCN2	89,27	89,81	89,91
YKL194C	MST1	84,68	90,32	89,89
YBL045C	COR1	84,18	90,08	89,88
YHR168W		82,41	88,92	89,87
YDL135C	RDI1	87,02	89,85	89,85
YIR021W	MRS1	89,40	89,73	89,84
YJL115W	ASF1	89,80	89,98	89,76
YDR028C	REG1	89,48	89,62	89,73
YER169W	RPH1	81,44	89,92	89,71
YGR258C	RAD2	89,41	90,09	89,61
YNL284C	MRPL10	88,78	89,99	89,59
YJR052W	RAD7	90,04	89,93	89,55
YOR033C	EXO1	85,04	89,39	89,52
YPL045W	VPS16	89,38	89,51	89,51
YDL101C	DUN1	89,19	89,60	89,49
YGR112W	SHY1	83,03	89,66	89,46

Supplementary Table S2

YBL093C	ROX3	88,67	89,38	89,38
YDR369C	XRS2	88,44	89,06	89,06
YGL038C	OCH1	86,62	88,39	89,03
YBR098W	MMS4	90,37	90,55	89,17
YNL250W	RAD50	90,74	90,88	88,93
YNL059C	ARP5	87,90	88,93	88,84
YCR046C	IMG1	85,83	88,90	88,69
YAL016W	TPD3	86,62	87,09	87,09
YOR330C	MIP1	86,00	86,72	86,23
YJL127C	SPT10	90,15	90,06	85,46
YDL069C	CBS1	89,84	90,24	84,31
YGR104C	SRB5	89,56	89,78	82,75
YGR062C	COX18	89,86	90,43	78,09
YDR011W	SNQ2	90,63	90,75	72,16
YIL139C	REV7	91,19	91,20	71,95

Group A2:

ORF	Name	%INH 4NQO 48h	%INH 4NQO 72h	%INH 4NQO 120h
YGL175C	SAE2	92,16	93,12	9,02
YNL236W	SIN4	92,05	91,86	2,22
YBR099C		90,77	91,73	1,12
YOL076W	MDM20	91,39	91,69	-11,31
YPL008W	CHL1	92,50	91,68	4,88
YNL064C	YDJ1	92,00	91,53	17,59
YFR010W	UBP6	91,89	91,42	3,21
YDR217C	RAD9	89,87	91,28	18,96
YDR405W	MRP20	90,69	91,19	-0,20
YIR002C	MPH1	91,13	91,02	24,97
YJL092W	HPR5	91,30	90,98	17,01
YJR043C	POL32	91,61	90,70	4,11
YGR063C	SPT4	90,60	90,62	-1,40
YKL212W	SAC1	91,28	90,61	2,27
YDR386W	MUS81	89,48	90,58	1,59
YLR218C		91,57	90,50	14,62
YDL059C	RAD59	89,94	90,49	-7,43
YPR120C	CLB5	91,38	90,38	3,95
YPL046C	ELC1	92,55	90,34	6,26
YNL147W	LSM7	90,06	90,30	-7,13
YKL113C	RAD27	90,63	90,29	1,18
YPR131C	NAT3	91,29	90,10	-1,06
YOR346W	REV1	91,98	89,92	25,77
YDL077C	VAM6	90,33	89,91	6,52
YOR036W	PEP12	91,44	89,62	1,45
YLR418C	CDC73	90,32	89,61	18,99
YPR141C	KAR3	91,30	89,46	7,29
YHR041C	SRB2	90,68	89,40	-0,41
YLR055C	SPT8	91,46	89,34	53,71
YEL051W	VMA8	91,32	89,21	0,92
YBR133C	HSL7	91,73	89,12	-3,33
YDL115C		90,50	88,96	0,20

Supplementary Table S2

YOR141C	ARP8	92,10	88,94	6,08
YNL199C	GCR2	89,95	88,82	2,37
YBR097W	VPS15	88,87	88,51	62,30
YDR076W	RAD55	89,43	88,35	-4,34
YOR331C		90,25	88,24	3,30
YOL072W	THP1	91,16	87,73	66,56
YLL043W	FPS1	91,99	87,49	-2,56
YLR006C	SSK1	91,36	86,86	-5,56
YPL172C	COX10	91,34	86,76	6,38
YKL139W	CTK1	91,09	86,73	-0,69
YLR376C		91,72	86,48	18,99
YMR091C	NPL6	89,51	86,02	10,07
YPR164W	MMS1	91,48	85,71	-3,11
YPL268W	PLC1	90,84	85,65	5,72
YPL055C	LGE1	91,35	85,58	-1,74
YLR382C	NAM2	90,91	85,25	6,78
YPL013C	MRPS16	91,72	84,80	27,67
YCL007C	CWH36	89,35	84,31	-6,64
YLL002W	RTT109	90,75	83,66	-2,53
YBL058W	SHP1	88,28	83,25	0,76
YLR358C		90,34	83,23	7,39
YPL234C	TFP3	91,43	83,03	3,02
YGL168W	HUR1	89,85	82,96	0,59
YJL189W	RPL39	90,69	82,66	-3,40
YML010W-A	SPT5	90,97	82,15	-0,74
YJR139C	HOM6	90,63	82,10	1,64
YBR081C	SPT7	89,46	81,72	-1,96
YJR018W		90,52	81,53	16,36
YJL184W	GON7	89,76	81,30	-2,16
YOR080W	DIA2	90,64	80,92	6,52
YPL129W	TAF14	90,39	80,77	-7,65
YMR231W	PEP5	88,47	80,23	68,99
YER110C	KAP123	87,87	79,98	0,33
YPR100W	MRPL51	88,61	77,60	-1,59
YMR064W	AEP1	85,58	76,68	-0,41
YJL006C	CTK2	86,17	75,31	8,09
YOL095C	HMI1	84,68	74,58	36,93
YBR112C	CYC8	82,45	73,90	-3,81
YML112W	CTK3	82,20	73,89	-3,38
YEL024W	RIP1	82,28	73,08	-12,56
YLR233C	EST1	82,29	72,39	-6,40

Group B:

ORF	Name	%INH	%INH	%INH
		4NQO 48h	4NQO 72h	4NQO 120h
YOR368W	RAD17	92,39	54,28	-2,06
YOR332W	VMA4	91,98	10,76	-0,43
YMR031W-A		91,74	44,08	-1,92
YOL012C	HTZ1	91,48	43,00	-4,15
YMR073C		91,36	6,23	-12,07
YLR268W	SEC22	91,32	3,43	0,00

Supplementary Table S2

YNL235C		91,25	0,40	-1,01
YOL004W	SIN3	91,23	2,54	-0,20
YMR224C	MRE11	91,20	-8,49	-8,90
YPR119W	CLB2	91,20	0,00	-3,30
YBR159W		91,17	-1,44	-5,17
YER016W	BIM1	91,15	15,35	2,70
YEL059W		91,10	9,72	3,40
YOL081W	IRA2	91,10	19,58	9,74
YNL107W	YAF9	91,10	25,37	-0,88
YJL047C	RTT101	91,09	12,93	8,94
YKR082W	NUP133	91,08	64,80	-0,39
YNL171C		91,07	14,71	0,10
YGR064W		91,05	7,04	4,17
YJR059W	PTK2	90,99	9,75	3,59
YMR202W	ERG2	90,98	28,11	-1,32
YOR026W	BUB3	90,80	0,91	-3,15
YHR060W	VMA22	90,78	23,02	5,24
YKR072C	SIS2	90,78	1,25	-2,40
YJR090C	GRR1	90,77	67,47	-2,23
YNL133C	FYV6	90,70	56,96	3,87
YPL173W	MRPL40	90,68	1,62	-5,17
YGL087C	MMS2	90,58	21,90	1,55
YHL006C	SHU1	90,54	6,09	5,00
YLR261C	VPS63	90,54	-6,99	-8,12
YML001W	YPT7	90,49	9,92	9,53
YLR052W	IES3	90,46	24,90	-3,77
YIR026C	YVH1	90,45	47,66	-0,20
YMR083W	ADH3	90,41	0,65	-3,27
YMR307W	GAS1	90,36	1,98	-3,26
YGR020C	VMA7	90,32	2,62	-2,30
YNL198C		90,30	5,21	-1,10
YKL119C	VPH2	90,26	60,67	-0,49
YOR039W	CKB2	90,26	37,93	-1,76
YER173W	RAD24	90,26	4,37	-1,14
YBR093C	PHO5	90,25	10,75	7,47
YLL041C	SDH2	90,22	-0,30	-1,80
YDR378C	LSM6	90,20	1,43	0,86
YNL248C	RPA49	90,18	0,49	-4,85
YKL006W	RPL14A	90,16	28,04	-5,92
YMR034C		90,13	1,35	-4,06
YGL246C	RAI1	90,10	49,73	5,13
YNL298W	CLA4	90,05	0,42	-1,48
YIL128W	MET18	90,03	49,46	4,87
YLR318W	EST2	90,02	-10,16	-14,29
YGL244W	RTF1	90,02	23,96	3,42
YFR001W	LOC1	90,02	3,41	1,95
YPL051W	ARL3	90,01	-1,29	-2,87
YHR025W	THR1	90,00	46,19	-2,77
YJL176C	SWI3	90,00	54,51	4,40
YBR244W	GPX2	89,91	-1,34	-11,28
YDR162C	NBP2	89,89	5,64	4,55
YOR007C	SGT2	89,88	-1,76	-10,55
YBR231C		89,87	4,24	2,50

Supplementary Table S2

YDR207C	UME6	89,87	13,06	5,82
YOR306C	MCH5	89,86	13,37	-2,84
YPR159W	KRE6	89,82	3,41	-0,47
YGL012W	ERG4	89,79	-17,25	-7,38
YLR372W	SUR4	89,79	0,35	-3,86
YDL185W	TFP1	89,79	-4,89	-4,08
YNL307C	MCK1	89,74	-0,82	-8,56
YOR221C	MCT1	89,73	17,81	-2,30
YBR127C	VMA2	89,72	-0,65	-5,29
YKR028W	SAP190	89,71	3,33	-1,27
YDR174W	HMO1	89,70	38,40	-8,02
YPL167C	REV3	89,68	-2,31	-3,56
YDR173C	ARG82	89,67	14,73	4,41
YKL048C	ELM1	89,62	14,57	8,32
YMR125W	STO1	89,62	18,96	-1,80
YPR036W	VMA13	89,57	-0,99	-6,26
YOR018W	ROD1	89,56	-4,84	-6,26
YDL074C	BRE1	89,54	37,83	-19,27
YDR159W	SAC3	89,49	65,28	12,44
YDR092W	UBC13	89,49	16,17	7,33
YLR319C	BUD6	89,44	1,25	-2,11
YOR035C	SHE4	89,43	1,81	-1,71
YDR432W	NPL3	89,43	56,09	4,67
YOL006C	TOP1	89,43	-3,64	-2,73
YHR154W	RTT107	89,42	3,80	2,63
YPR163C	TIF3	89,42	1,42	-11,44
YIL116W	HIS5	89,39	0,48	-2,58
YHR021C	RPS27B	89,38	8,43	3,31
YHR191C	CTF8	89,38	11,23	4,03
YMR272C	SCS7	89,34	6,29	5,55
YGL088W		89,27	-0,46	-2,40
YKL121W		89,23	-3,16	-4,24
YBR103W	SIF2	89,21	3,83	-2,20
YNL229C	URE2	89,21	33,72	-1,92
YBR145W	ADH5	89,16	3,30	-3,11
YML102C-A		89,16	0,19	-2,41
YMR216C	SKY1	89,15	2,57	-0,57
YGR252W	GCN5	89,13	-0,63	-12,70
YGL151W	NUT1	89,13	-12,21	-17,58
YCR077C	PAT1	89,12	9,76	4,74
YGR105W	VMA21	89,03	-5,72	-6,46
YDR254W	CHL4	89,02	11,01	8,94
YBR268W	MRPL37	88,98	-41,17	-9,68
YOR295W	UAF30	88,94	2,59	-1,69
YEL027W	CUP5	88,93	0,61	-1,32
YER014C-A	BUD25	88,92	-0,52	-3,41
YDR364C	CDC40	88,90	52,95	4,47
YOR017W	PET127	88,83	-5,71	-12,14
YCL060C	KRR1	88,83	7,12	4,51
YDL172C		88,76	5,28	2,25
YJL064W		88,75	7,08	4,46
YLR373C	VID22	88,72	13,64	-12,14
YAR002W	NUP60	88,70	-4,18	-5,38

Supplementary Table S2

YAL047C		88,69	-4,42	-8,39
YCL016C	DCC1	88,66	12,09	10,82
YDL081C	RPP1A	88,64	4,99	-0,49
YDL117W	CYK3	88,61	10,31	11,01
YOR014W	RTS1	88,61	-1,68	-3,85
YLR398C	SKI2	88,60	-1,34	-6,30
YOR345C		88,59	-3,07	-3,59
YMR038C	LYS7	88,55	1,33	-2,57
YDL075W	RPL31A	88,52	2,15	1,23
YGL124C	MON1	88,52	-0,48	-0,68
YPR139C	VPS66	88,52	16,67	5,21
YDR290W		88,46	-8,43	-8,22
YIL040W		88,37	14,84	12,01
YPR194C	OPT2	88,35	4,70	1,60
YBR116C		88,33	8,16	-1,96
YOR078W	BUD21	88,32	0,21	-5,31
YML111W	BUL2	88,28	2,31	0,48
YKL118W		88,27	-9,76	-11,95
YDL006W	PTC1	88,19	55,73	0,60
YGR240C	PFK1	88,18	10,25	0,47
YLR056W	ERG3	88,09	5,08	-1,37
YML102W	CAC2	88,09	1,93	-0,39
YML097C	VPS9	88,01	9,62	-1,51
YLR039C	RIC1	88,00	-3,94	-6,29
YDR017C	KCS1	87,99	10,86	2,56
YDR158W	HOM2	87,95	6,65	0,81
YDR195W	REF2	87,92	19,50	4,10
YLR357W	RSC2	87,91	-0,21	-7,29
YOL017W	ESC8	87,90	0,29	-5,00
YLR322W	VPS65	87,87	42,28	-2,28
YMR022W	QRI8	87,86	-2,55	-4,02
YOR025W	HST3	87,80	-1,76	-15,81
YKR024C	DBP7	87,79	40,16	-8,30
YGR208W	SER2	87,78	5,41	4,38
YDL013W	HEX3	87,77	10,15	5,79
YLR447C	VMA6	87,64	-4,91	-4,35
YJR118C	ILM1	87,64	2,70	-6,58
YBL080C	PET112	87,54	8,66	6,76
YDL232W	OST4	87,51	44,35	2,11
YGL212W	VAM7	87,42	-1,64	3,08
YLR062C	BUD28	87,37	0,41	-1,32
YLR015W	BRE2	87,37	7,20	2,65
YJR073C	OPI3	87,24	6,51	3,25
YPR135W	CTF4	87,19	-7,49	-9,23
YMR032W	HOF1	87,17	-1,18	-4,31
YLR192C	HCR1	87,14	2,36	-0,66
YBR191W	RPL21A	87,08	1,25	-3,85
YEL013W	VAC8	87,02	9,20	0,49
YDR216W	ADR1	86,98	0,95	-1,90
YPR057W	BRR1	86,92	-3,89	-7,08
YBR266C		86,80	2,75	0,37
YMR304W	UBP15	86,76	-1,55	-3,30
YBR128C	ATG14	86,75	3,59	-1,26

Supplementary Table S2

YNL220W	ADE12	86,73	38,22	21,27
YCR002C	CDC10	86,67	3,40	1,65
YGL020C	MDM39	86,61	7,01	1,38
YOR223W		86,59	-3,59	-6,08
YLR412W		86,58	-5,39	-10,10
YGL218W		86,55	2,84	-7,93
YDL100C	ARR4	86,50	4,31	2,49
YDL047W	SIT4	86,46	-2,01	-2,54
YGL007W		86,44	3,27	0,53
YDR245W	MNN10	86,43	-0,89	-2,57
YFR019W	FAB1	86,35	-2,45	-2,36
YLR025W	SNF7	86,32	-1,01	2,81
YLR102C	APC9	86,30	2,27	-1,38
YKL126W	YPK1	86,28	-1,51	-2,83
YIL132C	CSM2	86,28	9,02	4,64
YBR267W		86,24	3,53	2,36
YMR116C	ASC1	86,19	4,57	-1,89
YGL136C	MRM2	86,15	-7,61	-6,90
YML008C	ERG6	86,13	-7,53	-7,85
YPR045C		86,11	7,49	-0,64
YJL036W	SNX4	86,09	2,66	1,19
YJL052W	TDH1	85,91	3,89	1,07
YML063W	RPS1B	85,85	-2,95	-7,73
YLR396C	VPS33	85,85	-90,93	-91,11
YDR392W	SPT3	85,84	3,11	-1,35
YCR028C	FEN2	85,76	25,79	8,49
YBR131W	CCZ1	85,74	-58,44	-64,69
YEL042W	GDA1	85,74	0,69	1,09
YOR290C	SNF2	85,74	-0,30	-3,32
YGL042C		85,67	0,89	0,40
YDR027C	VPS54	85,67	-4,01	-7,01
YMR166C		85,57	-0,19	-3,37
YOR038C	HIR2	85,56	-0,32	-5,57
YJR116W		85,56	-3,13	-23,66
YMR167W	MLH1	85,50	4,17	-0,28
YOR040W	GLO4	85,49	-1,58	-3,89
YMR143W	RPS16A	85,47	2,33	-2,04
YKL080W	VMA5	85,40	1,02	20,15
YLR061W	RPL22A	85,35	3,09	-3,09
YIL148W	RPL40A	85,34	5,68	6,65
YOR032C	HMS1	85,27	-2,77	-7,63
YKL101W	HSL1	85,24	-1,23	-2,37
YOR027W	STI1	85,20	-4,53	-7,61
YCL005W		85,08	1,04	-0,21
YGL066W	SGF73	85,06	4,29	-0,59
YPR063C		85,05	-0,51	-4,56
YDR377W	ATP17	84,99	-1,85	-3,29
YLR247C		84,94	-1,65	-3,68
YPR101W	SNT309	84,93	-0,38	-6,14
YPL002C	SNF8	84,85	3,24	5,47
YOL061W	PRS5	84,81	0,10	-2,49
YJL080C	SCP160	84,72	13,47	11,46
YOR069W	VPS5	84,67	-0,89	-2,79

Supplementary Table S2

YPR046W	MCM16	84,63	-7,42	-9,45
YGL104C	VPS73	84,60	0,10	-1,76
YPL023C	MET12	84,59	2,80	-1,06
YDL149W	ATG9	84,55	4,39	1,62
YMR078C	CTF18	84,55	0,99	-0,70
YMR035W	IMP2	84,54	-2,43	-5,56
YLR087C	CSF1	84,52	-2,97	-5,10
YIL124W	AYR1	84,43	-0,49	1,08
YOL030W	GAS5	84,34	-2,77	-4,75
YLR403W	SFP1	84,19	40,02	-6,65
YJR140C	HIR3	84,15	-3,74	-8,38
YPR044C		84,07	-7,55	-13,60
YDR226W	ADK1	83,97	6,09	3,16
YMR179W	SPT21	83,85	-3,53	-6,55
YER061C	CEM1	83,83	3,58	2,08
YIL018W	RPL2B	83,73	1,46	1,73
YGL214W		83,58	-1,59	-4,16
YPR076W		83,56	2,54	0,10
YHR064C	SSZ1	83,51	1,28	-3,94
YMR185W		83,45	1,25	-0,42
YLR013W	GAT3	83,44	-2,67	-5,04
YDR363W	ESC2	83,44	3,92	2,65
YJR105W	ADO1	83,37	-2,67	-4,33
YDR255C	RMD5	83,37	9,00	6,35
YDR469W	SDC1	83,33	-4,76	-6,11
YDL173W		83,32	3,65	1,42
YLR338W		83,23	-9,02	-6,37
YPL226W	NEW1	83,13	0,20	-0,30
YCR071C	IMG2	82,97	2,68	-2,99
YGR036C	CAX4	82,94	0,25	-1,11
YEL052W	AFG1	82,89	0,60	-0,40
YHR010W	RPL27A	82,89	5,16	4,06
YLR011W	LOT6	82,83	-1,02	-3,68
YBR026C	ETR1	82,82	1,69	7,38
YPR012W		82,80	-6,00	-9,44
YJR128W		82,78	1,85	-0,97
YMR142C	RPL13B	82,76	6,69	-1,78
YDR523C	SPS1	82,62	-2,65	-24,88
YLR271W		82,49	-3,59	-5,19
YMR145C	NDE1	82,48	-0,68	-3,30
YOR042W	CUE5	82,43	-5,18	-8,56
YDL041W		82,43	-4,88	-7,32
YGR197C	SNG1	82,34	3,96	2,41
YLR085C	ARP6	82,28	-0,10	-2,98
YER122C	GLO3	82,24	0,10	-2,80
YOR312C	RPL20B	82,21	4,77	1,75
YLR402W		82,19	2,57	-3,53
YMR048W	CSM3	82,16	3,96	-0,19
YJR033C	RAV1	82,15	-5,34	-6,47
YLL045C	RPL8B	82,09	0,00	-4,38
YNL215W	IES2	82,08	-1,08	-4,03
YLR255C		82,02	1,68	-1,58
YPL035C		81,83	-0,20	-2,23

Supplementary Table S2

YPL025C		81,82	3,98	0,80
YGR285C	ZUO1	81,72	9,16	2,23
YKL081W	TEF4	81,67	-1,98	-0,89
YOR076C	SKI7	81,66	2,11	-1,51
YOR297C	TIM18	81,65	-1,50	-4,09
YIL134W	FLX1	81,55	3,03	2,25
YER052C	HOM3	81,51	1,71	1,18
YIL146C	ECM37	81,50	1,26	3,97
YDR448W	ADA2	81,36	7,45	1,78
YGR004W		81,32	0,30	-2,17
YAL035W		81,29	24,27	15,56
YDR049W		81,28	-8,36	-10,50
YLR111W		81,23	1,00	0,20
YLR239C	LIP2	81,07	1,02	-3,65
YDR461W	MFA1	81,01	31,82	-11,56
YNL246W	VPS75	80,90	-7,01	-11,59
YJR074W	MOG1	80,89	3,98	-2,85
YLR337C	VRP1	80,89	-2,96	-0,30
YHR039C-B	VMA10	80,88	-1,40	-1,90
YIL157C		80,87	0,67	6,03
YOL029C		80,86	-2,63	-4,95
YPR040W	TIP41	80,84	2,98	-2,18
YNL323W	LEM3	80,77	-10,94	-8,79
YHL011C	PRS3	80,76	1,29	0,83
YKR073C		80,74	-0,76	-4,85
YDR140W		80,65	3,15	0,76
YLL032C		80,62	1,07	-2,93
YBL027W	RPL19B	80,58	4,87	1,89
YJR035W	RAD26	80,49	-0,88	-3,52
YAL013W		80,44	4,69	0,77
YLR262C	YPT6	80,43	-5,40	-6,70
YPL269W	KAR9	80,20	-2,40	-1,00
YDR257C	RMS1	80,20	8,67	7,05
YLR079W	SIC1	80,10	-1,66	-2,39
YOR073W		80,10	-4,05	-7,60
YHR178W	STB5	80,00	1,59	1,22
YGR272C		80,00	1,42	-1,14

Group C:

ORF	Name	%INH 4NQO 48h	%INH 4NQO 72h	%INH 4NQO 120h
YGL240W	DOC1	34,04	90,27	93,58
YJL096W	MRPL49	39,44	92,89	92,47
YDL202W	MRPL11	77,17	92,25	92,17
YGL129C	RSM23	22,88	91,49	91,99
YNL160W	YGP1	14,29	92,08	91,98
YML088W		53,37	91,99	91,89
YNL184C		22,77	91,72	91,72
YLR260W	LCB5	55,59	87,88	91,71
YGL107C	RMD9	10,68	90,52	91,67
YGL220W		33,58	90,92	91,63

Supplementary Table S2

YGR215W	RSM27	66,12	91,89	91,59
YLL009C	COX17	6,98	91,75	91,55
YMR184W		78,27	91,43	91,54
YMR267W	PPA2	23,08	91,53	91,53
YLR204W	QRI5	45,21	91,53	91,53
YHR038W	RRF1	73,35	91,72	91,52
YMR089C	YTA12	72,31	91,00	91,51
YGR076C	MRPL25	70,98	91,17	91,49
YMR282C	AEP2	52,69	91,38	91,48
YMR287C	MSU1	38,10	91,38	91,48
YML061C	PIF1	42,03	91,58	91,47
YMR286W	MRPL33	4,76	91,42	91,42
YHL038C	CBP2	50,27	90,93	91,42
YLR067C	PET309	43,88	91,31	91,42
YPR166C	MRP2	13,40	91,41	91,41
YJL209W	CBP1	25,22	91,39	91,39
YPL059W	GRX5	17,02	91,34	91,34
YGR171C	MSM1	9,78	91,34	91,34
YOL033W	MSE1	79,86	91,30	91,30
YGR150C		75,86	91,37	91,27
YBL044W		22,79	91,51	91,25
YPL029W	SUV3	46,67	91,21	91,21
YMR293C		20,20	91,01	91,13
YLR369W	SSQ1	15,31	91,17	91,06
YLR069C	MEF1	38,21	91,28	91,06
YHR147C	MRPL6	35,51	91,06	91,06
YMR024W	MRPL3	70,37	90,92	90,92
YLR139C	SLS1	45,86	91,00	90,89
YGL135W	RPL1B	32,82	89,51	90,83
YDR529C	QCR7	57,28	91,00	90,70
YMR071C	TVP18	58,41	89,64	90,68
YOR305W		62,84	90,78	90,67
YKR006C	MRPL13	47,06	90,78	90,67
YDL049C	KNH1	75,59	90,56	90,67
YKL155C	RSM22	37,93	90,49	90,49
YJL063C	MRPL8	8,25	90,67	90,46
YCR004C	YCP4	71,30	90,32	90,42
YPR099C		37,23	90,49	90,38
YBR163W	DEM1	15,57	90,24	90,33
YLL018C-A	COX19	18,10	90,53	90,33
YOL096C	COQ3	73,86	89,63	90,30
YBL100C		68,91	90,20	90,30
YDR078C	SHU2	68,63	89,94	90,23
YNL213C		58,37	90,44	90,23
YDR079W	PET100	42,37	90,08	90,18
YGR255C	COQ6	46,24	90,37	90,17
YLR312W-A	MRPL15	57,37	90,28	90,17
YKL138C	MRPL31	73,71	90,52	90,10
YDR298C	ATP5	71,08	89,88	90,10
YDR507C	GIN4	41,03	90,46	90,01
YGR180C	RNR4	27,78	90,13	89,87
YDR175C	RSM24	77,62	89,73	89,83
YGR220C	MRPL9	21,43	89,20	89,75

Supplementary Table S2

YDL063C		50,50	89,59	89,70
YHR011W	DIA4	58,45	90,67	89,59
YGR006W	PRP18	60,53	90,30	89,53
YMR066W	SOV1	48,04	88,83	89,47
YGR257C	MTM1	74,70	89,73	89,43
YKL169C		66,30	89,28	89,40
YPL148C	PPT2	6,74	89,45	89,33
YGR222W	PET54	11,61	89,06	89,29
YEL029C	BUD16	55,00	89,13	89,24
YAL048C		78,90	89,34	89,22
YNL252C	MRPL17	74,32	91,19	89,22
YER070W	RNR1	70,66	88,69	89,08
YDR518W	EUG1	38,67	90,98	88,96
YJL003W	COX16	8,65	89,55	88,90
YBR122C	MRPL36	77,76	88,91	88,81
YGR219W		15,13	88,23	88,81
YDR295C		72,86	88,77	88,77
YJR113C	RSM7	75,00	88,99	88,72
YDR042C		41,04	88,93	88,71
YDR197W	CBS2	76,08	88,51	88,51
YPR072W	NOT5	54,70	89,90	88,42
YDL062W		23,02	88,16	88,40
YDR065W		75,06	88,34	88,34
YDR114C		52,89	88,12	88,34
YKL016C	ATP7	57,62	88,29	88,29
YDL146W		11,40	88,08	88,20
YBL002W	HTB2	7,48	88,14	88,14
YJR004C	SAG1	73,14	90,26	87,73
YDL198C	YHM1	39,09	87,35	86,79
YDL181W	INH1	24,03	85,92	86,07
YJR144W	MGM101	25,83	85,69	85,85
YLR114C		1,19	85,93	85,76
YDR115W		73,43	83,20	83,52
YBL012C		28,57	83,36	83,36
YOR211C	MGM1	3,41	83,53	83,14
YBL090W	MRP21	12,80	83,18	81,64
YPR067W	ISA2	13,68	80,43	79,95

Supplementary Table S3

Genetic analysis of sensitivity to DNA-damaging agents

	strains	SC	4NQO	UV	MMS	Mnd	37°C
	<i>WT</i>	+	+	+	+	+	+
SAGA	<i>spt8</i>	+	+	+	+	+/-	+
	<i>spt20</i>	+/-	-	+/-	-	+/-	-
PAF	<i>cdc73</i>	+	+/-	+/-	-	+/-	+/-
CDKs	<i>ctk1</i>	+	+	+	+	+/-	+
	<i>ctk2</i>	+	+	+/-	+	-	+
	<i>ctk3</i>	+	+/-	+/-	+	+/-	+
	<i>bur2</i>	+/-	-	+/-	-	-	-
Mediator	<i>med2</i>	+/-	-	+/-	-	-	-
	<i>med3</i>	+/-	+/-	+/-	-	-	-
	<i>med16</i>	+	+/-	+	+/-	-	-
	<i>med20</i>	+	-	+	+	-	+/-
RNAPII transcription	<i>rpb9</i>	+/-	-	+/-	-	+/-	-
	<i>spt4</i>	+	+/-	+	+/-	+	+
	<i>spt5</i>	+	+	+/-	+/-	+	+
	<i>swi6</i>	+	+/-	+	-	+/-	+
	<i>bdf1</i>	+	+	+/-	+	+	+
	<i>elc1</i>	+	+	+	+	-	+
	<i>taf14</i>	+	+	+	-	+/-	-
mRNA biogenesis and export	<i>tho2</i>	+	-	+/-	+/-	-	+
	<i>hpr1</i>	+	+/-	+	+/-	-	+
	<i>thp1</i>	+	+/-	+/-	+	-	+
mRNA degradation	<i>lsm1</i>	+	+	+/-	+/-	+/-	+
	<i>lsm7</i>	+	+/-	+/-	+	-	+
Chromatin remodeling	<i>ies6</i>	+	-	+/-	-	+/-	-
	<i>npl6</i>	+	+	+/-	+	+	-
damage response	<i>rad4</i>	+	-	-	-	+	+/-
	<i>def1</i>	+	-	+/-	-	+/-	+/-
	<i>yap1</i>	+	+	+	+	+/-	+
others	<i>fps1</i>	+	+	+/-	+/-	+/-	-
	<i>gcn2</i>	+/-	+/-	+/-	-	+/-	-

Supplementary Table S4

ORF	Name	%INH MIC	Screen Daignan- Fornier B.	GLAM ratio PHO5- lacZ/PHO5	GLAM ratio PHO5- LAC4/PHO5
YIR016W		95,83	No	0.52	0.73
YCR053W	THR4	89,09	No	n.d.	n.d.
YHL031C	GOS1	88,95	No	n.d.	n.d.
YGR018C		88,80	No	1.16	0.88
YBR081C	SPT7	88,57	Yes	0.59	0.67
YBR101C	FES1	88,54	No	0.51	0.72
YML008C	ERG6	88,12	Yes	n.d.	n.d.
YOR184W	SER1	88,11	Yes	n.d.	n.d.
YER051W	JHD1	88,00	No	0.85	1.13
YER083C	RMD7	87,85	No	0.85	0.96
YOL148C	SPT20	87,79	Yes	0.16	0.29
YDR483W	KRE2	87,65	No	n.d.	n.d.
YJL140W	RPB4	86,99	Yes	0.03	0.08
YHR025W	THR1	86,74	Yes	n.d.	n.d.
YGL244W	RTF1	86,69	Yes	0.30	0.34
YBL058W	SHP1	86,34	Yes	0.57	0.46
YGL070C	RPB9	86,12	Yes	0.46	0.49
YMR272C	SCS7	86,05	No	0.86	0.94
YLR055C	SPT8	85,83	Yes	0.86	0.63
YGL042C		85,77	Yes	0.66	0.82
YER052C	HOM3	85,48	No	n.d.	n.d.
YGR208W	SER2	85,29	Yes	n.d.	n.d.
YNL229C	URE2	84,21	No	0.94	0.51
YML112W	CTK3	84,13	Yes	1.38	0.88
YDR392W	SPT3	83,55	Yes	0.41	0.47
YDL074C	BRE1	83,10	Yes	0.37	0.47
YKL212W	SAC1	82,99	Yes	n.d.	n.d.
YLR226W	BUR2	81,97	No	0.08	0.30
YDR158W	HOM2	81,86	Yes	n.d.	n.d.
YGL012W	ERG4	81,69	Yes	n.d.	n.d.
YBR097W	VPS15	81,62	Yes	n.d.	n.d.
YOL051W	MED15	81,51	No	0.38	0.40
YJR139C	HOM6	81,46	Yes	n.d.	n.d.
YMR202W	ERG2	81,32	No	n.d.	n.d.
YGL043W	DST1	81,28	Yes	0.62	0.85
YIR014W		81,26	No	0.81	1.02
YBR200W	BEM1	81,13	Yes	n.d.	n.d.
YAL035W	FUN12	80,88	Yes	0.43	0.75
YDR207C	UME6	80,11	No	0.84	0.99
YPR072W	NOT5	78,23	No	0.25	0.36
YGL038C	OCH1	78,06	Yes	n.d.	n.d.
YCR081W	MED12	77,00	No	0.59	0.60
YLR337C	VRP1	76,37	Yes	0.67	0.64
YPL230W		76,15	No	0.43	0.48
YPL055C	LGE1	74,43	No	0.54	0.41
YMR304W	UBP15	73,65	No	0.44	1.08
YER014C-A	BUD25	73,23	No	n.d.	n.d.
YNL139C	THO2	73,14	No	0.04	0.13
YOL086C	ADH1	72,96	No	n.d.	n.d.
YLR148W	PEP3	72,03	Yes	n.d.	n.d.

Supplementary Table S4

YGR063C	SPT4	71,33	No	0.14	0.13
YDL005C	MED2	69,67	No	0.31	0.35
YPL045W	VPS16	68,87	No	n.d.	n.d.
YBR069C	TAT1	68,72	Yes	n.d.	n.d.
YER014W	HEM14	68,64	No	n.d.	n.d.
YLR418C	CDC73	68,08	No	0.23	0.56
YAL016W	TPD3	67,99	No	0.35	0.58
YGL058W	RAD6	67,00	Yes	0.56	0.44
YGR204W	ADE3	66,19	No	n.d.	n.d.
YHL025W	SNF6	66,16	Yes	0.82	0.59
YLR338W	OPI9	65,60	Yes	n.d.	n.d.
YER086W	ILV1	65,07	Yes	n.d.	n.d.
YJL175W		63,58	Yes	0.74	1.24
YLR056W	ERG3	61,95	Yes	n.d.	n.d.
YDR320C	SWA2	61,93	No	n.d.	n.d.
YDL100C	ARR4	61,56	Yes	n.d.	n.d.
YMR231W	PEP5	61,34	Yes	n.d.	n.d.
YOR036W	PEP12	59,45	Yes	n.d.	n.d.
YCL007C	CWH36	58,01	No	n.d.	n.d.
YAL021C	CCR4	57,71	No	0.46	0.64
YLR318W	EST2	57,14	No	0.22	0.04
YGL223C	COG1	56,96	No	n.d.	n.d.
YGR038W	ORM1	55,91	No	0.65	0.94
YLR239C	LIP2	54,93	No	0.77	0.31
YKL139W	CTK1	53,85	Yes	1.39	1.53
YML095C	RAD10	53,71	No	0.85	1.08
YJR018W		53,63	Yes	0.10	0.34
YKR001C	VPS1	52,84	No	n.d.	n.d.
YBR021W	FUR4	51,79	No	n.d.	n.d.
YPR160W	GPH1	51,06	No	n.d.	n.d.
YDR323C	PEP7	51,00	Yes	n.d.	n.d.
YAL002W	VPS8	50,83	No	n.d.	n.d.
YPL084W	BRO1	50,58	No	0.51	0.74
YCL008C	STP22	50,20	No	n.d.	n.d.

Conclusiones

Conclusiones

- 1) El escrutinio de la colección completa de mutantes haploides no esenciales y diploides heterocigotos para genes esenciales de *S. cerevisiae* frente al antifolato sulfanilamida ha permitido identificar los procesos celulares involucrados en la respuesta celular a este análogo estructural del PABA. Los principales procesos celulares afectados conciernen al metabolismo del carbono, de aminoácidos, del DNA y de lípidos; así como al transporte de vesículas y al mantenimiento de la homeostasis celular.
- 2) El análisis de los fenotipos de los “disruptantes” es una aproximación muy eficaz para la caracterización funcional de proteínas de función desconocida. Así, en el escrutinio químico-genómico con sulfanilamida, se identificó un ORF no caracterizado (*YMR289w*) que es necesario para la biosíntesis de PABA. La caracterización detallada de este ORF ha revelado que codifica la enzima 4-amino-4-deoxicorismato liasa, responsable del último paso en la biosíntesis de PABA. Este gen, al que hemos designado *ABZ2*, complementa la auxotrofia para PABA del mutante *pabC* de *E. coli*, su homólogo funcional en procariotas. La proteína codificada, Abz2p se localiza en el citoplasma en forma de monómeros y de homodímeros siendo la dimerización necesaria para su actividad catalítica.
- 3) El escrutinio de la colección completa de mutantes haploides no esenciales frente al antifúngico sordarina ha permitido identificar los procesos celulares involucrados en la respuesta celular a este inhibidor selectivo de la síntesis proteica. De esta forma, se han identificado 9 ORFs cuya delección induce sensibilidad a sordarina y que es su mayoría codifican proteínas mitocondriales y cuyos mutantes son incapaces de crecer en una fuente de carbono no fermentable. También se han identificado 104 mutantes resistentes a sordarina que están implicados en una variedad de procesos celulares entre los que destacan la síntesis, modificación y catabolismo de proteínas.
- 4) La delección de los genes de la ruta de síntesis de diftamida confiere resistencia a sordarina y a toxina diftérica, y una mayor resistencia a la inhibición de la síntesis proteica inducida por la sordarina *in vitro*. Los extractos proteicos de los mutantes *dphΔ* presentan una menor afinidad de unión con la sordarina que los de tipo silvestre.

- 5)** Con excepción del mutante que carece de *DPH3*, que muestra defectos de crecimiento en todas las condiciones empleadas, el bloqueo en la ruta de síntesis de diftamida no compromete el crecimiento de la levadura en condiciones de crecimiento “óptimas”. Sin embargo, la ausencia de diftamidación de eEF2 induce sensibilidad a aminoglicósidos (higromicina B, paromomicina, neomicina, geneticina) y a cafeína.
- 6)** La diftamidación del factor eEF2 previene el cambio de fase ribosómica programada (PRF) en dirección 5' (-1) sugiriendo que el extremo del dominio IV de eEF2, y en particular el residuo de diftamida, es importante para que se produzcan determinados cambios de conformación en el ribosoma en elongación, que favorezcan que durante dicho proceso tengan lugar las interacciones adecuadas entre el ribosoma, el eEF2, los RNAts, y el RNAm, para que la translocación ocurra de forma óptima.
- 7)** La sordarina inhibe el cambio de fase ribosómica programada PRF +1 y el PRF -1, sugiriendo que la unión de la sordarina al complejo eEF2•ribosoma restringe determinados movimientos de los dominios de eEF2, necesarios para que se produzcan los cambios conformacionales en el RNAt del sitio P que conducen a PRF -1.
- 8)** Mediante el escrutinio de genes resistentes a MPA y 4-NQO se han identificado nuevos factores implicados en la elongación de la transcripción y en la reparación de DNA acoplada al proceso de transcripción (TC-NER). El estudio ha revelado nuevas funciones en este proceso de genes previamente implicados en la transcripción, como son los complejos PAF y Ccr4-Not, evidenciando la relación funcional existente entre la reparación de DNA y la elongación de la transcripción.



Bibliografía

Bibliografía

Bibliografía


A

- A, A. E., Brazhnikov, E., Garber, M., Zheltonosova, J., Chirgadze, Y., al-Karadaghi, S., Svensson, L. A., and Liljas, A. (1994). Three-dimensional structure of the ribosomal translocase: elongation factor G from *Thermus thermophilus*. *Embo J* *13*, 3669-3677.
- A haplotype map of the human genome. (2005). *Nature* *437*, 1299-1320.
- Agrawal, R. K., Heagle, A. B., Penczek, P., Grassucci, R. A., and Frank, J. (1999). EF-G-dependent GTP hydrolysis induces translocation accompanied by large conformational changes in the 70S ribosome. *Nat Struct Biol* *6*, 643-647.
- Agrawal, R. K., Penczek, P., Grassucci, R. A., and Frank, J. (1998). Visualization of elongation factor G on the *Escherichia coli* 70S ribosome: the mechanism of translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 6134-6138.
- Aguilera, A., and Gomez-Gonzalez, B. (2008). Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nat Rev Genet* *9*, 204-217.
- Al-Shahrour, F., Diaz-Uriarte, R., and Dopazo, J. (2004). FatiGO: a web tool for finding significant associations of Gene Ontology terms with groups of genes. *Bioinformatics* *20*, 578-580.
- Al-Shahrour, F., Minguéz, P., Vaquerizas, J. M., Conde, L., and Dopazo, J. (2005). BABELOMICS: a suite of web tools for functional annotation and analysis of groups of genes in high-throughput experiments. *Nucleic Acids Res* *33*, W460-464.
- Alamgir, M., Eroukova, V., Jessulat, M., Xu, J., and Golshani, A. (2008). Chemical-genetic profile analysis in yeast suggests that a previously uncharacterized open reading frame, YBR261C, affects protein synthesis. *BMC Genomics* *9*, 583.
- Allen, J., Davey, H. M., Broadhurst, D., Heald, J. K., Rowland, J. J., Oliver, S. G., and Kell, D. B. (2003). High-throughput classification of yeast mutants for functional genomics using metabolic footprinting. *Nat Biotechnol* *21*, 692-696.
- Aloy, P., Bottcher, B., Ceulemans, H., Leutwein, C., Mellwig, C., Fischer, S., Gavin, A. C., Bork, P., Superti-Furga, G., Serrano, L., and Russell, R. B. (2004). Structure-based assembly of protein complexes in yeast. *Science* *303*, 2026-2029.
- Altmann, K., and Westermann, B. (2005). Role of essential genes in mitochondrial morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* *16*, 5410-5417.
- Alto, N. M., Shao, F., Lazar, C. S., Brost, R. L., Chua, G., Mattoo, S., McMahon, S. A., Ghosh, P., Hughes, T. R., Boone, C., and Dixon, J. E. (2006). Identification of a bacterial type III effector family with G protein mimicry functions. *Cell* *124*, 133-145.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* *25*, 3389-3402.
- Aouida, M., Page, N., Leduc, A., Peter, M., and Ramotar, D. (2004). A genome-wide screen in *Saccharomyces cerevisiae* reveals altered transport as a mechanism of resistance to the anticancer drug bleomycin. *Cancer Res* *64*, 1102-1109.
- Appling, D. R. (1991). Compartmentation of folate-mediated one-carbon metabolism in eukaryotes. *Faseb J* *5*, 2645-2651.
- Apweiler, R., Attwood, T. K., Bairoch, A., Bateman, A., Birney, E., Biswas, M., Bucher, P., Cerutti, L., Corpet, F., Croning, M. D., *et al.* (2000). InterPro--an integrated documentation resource for protein families, domains and functional sites. *Bioinformatics* *16*, 1145-1150.
- Apweiler, R., Bairoch, A., Wu, C. H., Barker, W. C., Boeckmann, B., Ferro, S., Gasteiger, E., Huang, H., Lopez, R., Magrane, M., *et al.* (2004). UniProt: the Universal Protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res* *32*, D115-119.
- Archambault, V., Ikui, A. E., Drapkin, B. J., and Cross, F. R. (2005). Disruption of mechanisms that prevent rereplication triggers a DNA damage response. *Mol Cell Biol* *25*, 6707-6721.

- Arevalo-Rodriguez, M., Pan, X., Boeke, J. D., and Heitman, J. (2004). FKBP12 controls aspartate pathway flux in *Saccharomyces cerevisiae* to prevent toxic intermediate accumulation. *Eukaryot Cell* 3, 1287-1296.
- Arnoldo, A., Curak, J., Kittanakom, S., Chevelev, I., Lee, V. T., Sahebol-Amri, M., Kosciak, B., Ljuma, L., Roy, P. J., Bedalov, A., *et al.* (2008). Identification of small molecule inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S using a yeast phenotypic screen. *PLoS Genet* 4, e1000005.
- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T., *et al.* (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 25, 25-29.
- Audhya, A., Loewith, R., Parsons, A. B., Gao, L., Tabuchi, M., Zhou, H., Boone, C., Hall, M. N., and Emr, S. D. (2004). Genome-wide lethality screen identifies new PI4,5P2 effectors that regulate the actin cytoskeleton. *Embo J* 23, 3747-3757.
- B**
- Bader, G. D., Donaldson, I., Wolting, C., Ouellette, B. F., Pawson, T., and Hogue, C. W. (2001). BIND--The Biomolecular Interaction Network Database. *Nucleic Acids Res* 29, 242-245.
- Bader, G. D., and Hogue, C. W. (2002). Analyzing yeast protein-protein interaction data obtained from different sources. *Nat Biotechnol* 20, 991-997.
- Bader, J. S., Chaudhuri, A., Rothberg, J. M., and Chant, J. (2004). Gaining confidence in high-throughput protein interaction networks. *Nat Biotechnol* 22, 78-85.
- Baetz, K., McHardy, L., Gable, K., Tarling, T., Reberlioux, D., Bryan, J., Andersen, R. J., Dunn, T., Hieter, P., and Roberge, M. (2004). Yeast genome-wide drug-induced haploinsufficiency screen to determine drug mode of action. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4525-4530.
- Bailey, T. L., and Elkan, C. (1994). Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* 2, 28-36.
- Bailleul, B., Daubersies, P., Galiegue-Zouitina, S., and Loucheux-Lefebvre, M. H. (1989). Molecular basis of 4-nitroquinoline 1-oxide carcinogenesis. *Jpn J Cancer Res* 80, 691-697.
- Baines, I. C., and Colas, P. (2006). Peptide aptamers as guides for small-molecule drug discovery. *Drug Discov Today* 11, 334-341.
- Bairoch, A. (1991). PROSITE: a dictionary of sites and patterns in proteins. *Nucleic Acids Res* 19 *Suppl*, 2241-2245.
- Baker, K., Sengupta, D., Salazar-Jimenez, G., and Cornish, V. W. (2003). An optimized dexamethasone-methotrexate yeast 3-hybrid system for high-throughput screening of small molecule-protein interactions. *Anal Biochem* 315, 134-137.
- Ball, C. A., Jin, H., Sherlock, G., Weng, S., Matese, J. C., Andrada, R., Binkley, G., Dolinski, K., Dwight, S. S., Harris, M. A., *et al.* (2001). *Saccharomyces* Genome Database provides tools to survey gene expression and functional analysis data. *Nucleic Acids Res* 29, 80-81.
- Bandyopadhyay, S., Sharan, R., and Ideker, T. (2006). Systematic identification of functional orthologs based on protein network comparison. *Genome Res* 16, 428-435.
- Bar, C., Zabel, R., Liu, S., Stark, M. J., and Schaffrath, R. (2008). A versatile partner of eukaryotic protein complexes that is involved in multiple biological processes: Kti11/Dph3. *Mol Microbiol* 69, 1221-1233.
- Barbet, N. C., Schneider, U., Helliwell, S. B., Stansfield, I., Tuite, M. F., and Hall, M. N. (1996). TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast. *Mol Biol Cell* 7, 25-42.
- Barwell, K. J., Boysen, J. H., Xu, W., and Mitchell, A. P. (2005). Relationship of DFG16 to the Rim101p pH response pathway in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 4, 890-899.
- Basilio, A., Justice, M., Harris, G., Bills, G., Collado, J., de la Cruz, M., Diez, M. T., Hernandez, P., Liberator, P., Nielsen kahn, J., *et al.* (2006). The discovery of moriniafungin, a novel sordarin derivative produced by *Morinia pestalozzioides*. *Bioorg Med Chem* 14, 560-566.
- Bassett, D. E., Jr., Boguski, M. S., Spencer, F., Reeves, R., Kim, S., Weaver, T., and Hieter, P. (1997). Genome cross-referencing and XREFdb: implications for the identification and analysis of genes mutated in human disease. *Nat Genet* 15, 339-344.

- Batagelj, V., and Mrvar, A. (1998). Pajek-Program for large network analysis. *Connections* 21, 47-57.
- Becker, F., Murthi, K., Smith, C., Come, J., Costa-Roldan, N., Kaufmann, C., Hanke, U., Degenhart, C., Baumann, S., Wallner, W., *et al.* (2004). A three-hybrid approach to scanning the proteome for targets of small molecule kinase inhibitors. *Chem Biol* 11, 211-223.
- Beggs, J. D. (1978). Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid. *Nature* 275, 104-109.
- Begley, T. J., Rosenbach, A. S., Ideker, T., and Samson, L. D. (2002). Damage recovery pathways in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by genomic phenotyping and interactome mapping. *Mol Cancer Res* 1, 103-112.
- Begley, T. J., Rosenbach, A. S., Ideker, T., and Samson, L. D. (2004). Hot spots for modulating toxicity identified by genomic phenotyping and localization mapping. *Mol Cell* 16, 117-125.
- Bellaoui, M., Chang, M., Ou, J., Xu, H., Boone, C., and Brown, G. W. (2003). Elg1 forms an alternative RFC complex important for DNA replication and genome integrity. *Embo J* 22, 4304-4313.
- Ben-Aroya, S., Coombes, C., Kwok, T., O'Donnell, K. A., Boeke, J. D., and Hieter, P. (2008). Toward a comprehensive temperature-sensitive mutant repository of the essential genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* 30, 248-258.
- Bennett, C. B., Lewis, L. K., Karthikeyan, G., Lobachev, K. S., Jin, Y. H., Sterling, J. F., Snipe, J. R., and Resnick, M. A. (2001). Genes required for ionizing radiation resistance in yeast. *Nat Genet* 29, 426-434.
- Bentley, R. (2000). Mycophenolic Acid: a one hundred year odyssey from antibiotic to immunosuppressant. *Chem Rev* 100, 3801-3826.
- Bergmann, S., Ihmels, J., and Barkai, N. (2004). Similarities and differences in genome-wide expression data of six organisms. *PLoS Biol* 2, E9.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., and Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* 28, 235-242.
- Bernstein, B. E., Liu, C. L., Humphrey, E. L., Perlstein, E. O., and Schreiber, S. L. (2004). Global nucleosome occupancy in yeast. *Genome Biol* 5, R62.
- Bharucha, N., and Kumar, A. (2007). Yeast genomics and drug target identification. *Comb Chem High Throughput Screen* 10, 618-634.
- Biran, I., and Walt, D. R. (2002). Optical imaging fiber-based single live cell arrays: a high-density cell assay platform. *Anal Chem* 74, 3046-3054.
- Birrell, G. W., Brown, J. A., Wu, H. I., Giaever, G., Chu, A. M., Davis, R. W., and Brown, J. M. (2002). Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to DNA-damaging agents does not identify the genes that protect against these agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8778-8783.
- Birrell, G. W., Giaever, G., Chu, A. M., Davis, R. W., and Brown, J. M. (2001). A genome-wide screen in *Saccharomyces cerevisiae* for genes affecting UV radiation sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12608-12613.
- Bjornsti, M. A. (2002). Cancer therapeutics in yeast. *Cancer Cell* 2, 267-273.
- Blackburn, A. S., and Avery, S. V. (2003). Genome-wide screening of *Saccharomyces cerevisiae* to identify genes required for antibiotic insusceptibility of eukaryotes. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 676-681.
- Blake, D., Luke, B., Kanellis, P., Jorgensen, P., Goh, T., Penfold, S., Breikreutz, B. J., Durocher, D., Peter, M., and Tyers, M. (2006). The F-box protein Dia2 overcomes replication impedence to promote genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 174, 1709-1727.
- Blake, J. A., Richardson, J. E., Bult, C. J., Kadin, J. A., and Eppig, J. T. (2002). The Mouse Genome Database (MGD): the model organism database for the laboratory mouse. *Nucleic Acids Res* 30, 113-115.
- Blakley, R. L., and Benkovic, S. J. (1984). *Chemistry and biochemistry of folates* (New York: Wiley).
- Boden, M., and Bailey, T. L. (2008). Associating transcription factor-binding site motifs with target GO terms and target genes. *Nucleic Acids Res* 36, 4108-4117.
- Bonangelino, C. J., Chavez, E. M., and Bonifacino, J. S. (2002). Genomic screen for vacuolar protein sorting genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 13, 2486-2501.

- Boone, C., Bussey, H., and Andrews, B. J. (2007). Exploring genetic interactions and networks with yeast. *Nat Rev Genet* 8, 437-449.
- Boorsma, A., Foat, B. C., Vis, D., Klis, F., and Bussemaker, H. J. (2005). T-profiler: scoring the activity of predefined groups of genes using gene expression data. *Nucleic Acids Res* 33, W592-595.
- Borovinskaya, M. A., Pai, R. D., Zhang, W., Schuwirth, B. S., Holton, J. M., Hirokawa, G., Kaji, H., Kaji, A., and Cate, J. H. (2007). Structural basis for aminoglycoside inhibition of bacterial ribosome recycling. *Nat Struct Mol Biol* 14, 727-732.
- Borovinskaya, M. A., Shoji, S., Fredrick, K., and Cate, J. H. (2008). Structural basis for hygromycin B inhibition of protein biosynthesis. *Rna* 14, 1590-1599.
- Botet, J., Mateos, L., Revuelta, J. L., and Santos, M. A. (2007). A chemogenomic screening of sulfanilamide-hypersensitive *Saccharomyces cerevisiae* mutants uncovers ABZ2, the gene encoding a fungal aminodeoxychorismate lyase. *Eukaryot Cell* 6, 2102-2111.
- Botet, J., Rodriguez-Mateos, M., Ballesta, J. P., Revuelta, J. L., and Remacha, M. (2008). A chemical genomic screen in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a role for diphthamidation of translation elongation factor 2 in inhibition of protein synthesis by sordarin. *Antimicrob Agents Chemother* 52, 1623-1629.
- Brachmann, C. B., Davies, A., Cost, G. J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., and Boeke, J. D. (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* 14, 115-132.
- Brazma, A., Hingamp, P., Quackenbush, J., Sherlock, G., Spellman, P., Stoeckert, C., Aach, J., Ansorge, W., Ball, C. A., Causton, H. C., *et al.* (2001). Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat Genet* 29, 365-371.
- Bredel, M., and Jacoby, E. (2004). Chemogenomics: an emerging strategy for rapid target and drug discovery. *Nat Rev Genet* 5, 262-275.
- Breitkreutz, B. J., Stark, C., and Tyers, M. (2003a). Osprey: a network visualization system. *Genome Biol* 4, R22.
- Breitkreutz, B. J., Stark, C., and Tyers, M. (2003b). The GRID: the General Repository for Interaction Datasets. *Genome Biol* 4, R23.
- Breslow, D. K., Cameron, D. M., Collins, S. R., Schuldiner, M., Stewart-Ornstein, J., Newman, H. W., Braun, S., Madhani, H. D., Krogan, N. J., and Weissman, J. S. (2008). A comprehensive strategy enabling high-resolution functional analysis of the yeast genome. *Nat Methods* 5, 711-718.
- Broach, J. R., Pringle, J. R., and Jones, E. W. (1991). *The Molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces* (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Brodersen, D. E., Clemons, W. M., Jr., Carter, A. P., Morgan-Warren, R. J., Wimberly, B. T., and Ramakrishnan, V. (2000). The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit. *Cell* 103, 1143-1154.
- Brown, G. M. (1962). The biosynthesis of folic acid. II. Inhibition by sulfonamides. *J Biol Chem* 237, 536-540.
- Brown, J. A., Sherlock, G., Myers, C. L., Burrows, N. M., Deng, C., Wu, H. I., McCann, K. E., Troyanskaya, O. G., and Brown, J. M. (2006). Global analysis of gene function in yeast by quantitative phenotypic profiling. *Mol Syst Biol* 2, 2006 0001.
- Buck, M. J., and Lieb, J. D. (2004). CHIP-chip: considerations for the design, analysis, and application of genome-wide chromatin immunoprecipitation experiments. *Genomics* 83, 349-360.
- Budd, M. E., Tong, A. H., Polaczek, P., Peng, X., Boone, C., and Campbell, J. L. (2005). A network of multi-tasking proteins at the DNA replication fork preserves genome stability. *PLoS Genet* 1, e61.
- Bundock, P., van Attikum, H., den Dulk-Ras, A., and Hooykaas, P. J. (2002). Insertional mutagenesis in yeasts using T-DNA from *Agrobacterium tumefaciens*. *Yeast* 19, 529-536.
- Butcher, R. A., Bhullar, B. S., Perlstein, E. O., Marsischky, G., LaBaer, J., and Schreiber, S. L. (2006). Microarray-based method for monitoring yeast overexpression strains reveals small-molecule targets in TOR pathway. *Nat Chem Biol* 2, 103-109.
- Butcher, R. A., and Schreiber, S. L. (2003). A small molecule suppressor of FK506 that targets the mitochondria and modulates ionic balance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Chem Biol* 10, 521-531.

- Butcher, R. A., and Schreiber, S. L. (2004). Identification of Ald6p as the target of a class of small-molecule suppressors of FK506 and their use in network dissection. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 7868-7873.
- Butland, G., Babu, M., Diaz-Mejia, J. J., Bohdana, F., Phanse, S., Gold, B., Yang, W., Li, J., Gagarinova, A. G., Pogoutse, O., *et al.* (2008). eSGA: E. coli synthetic genetic array analysis. *Nat Methods*.
- Capa, L., Mendoza, A., Lavandera, J. L., Gomez de las Heras, F., and Garcia-Bustos, J. F. (1998). Translation elongation factor 2 is part of the target for a new family of antifungals. *Antimicrob Agents Chemother* *42*, 2694-2699.
- 
- Castrillo, J. I., Hayes, A., Mohammed, S., Gaskell, S. J., and Oliver, S. G. (2003). An optimized protocol for metabolome analysis in yeast using direct infusion electrospray mass spectrometry. *Phytochemistry* *62*, 929-937.
- Castrillo, J. I., Zeef, L. A., Hoyle, D. C., Zhang, N., Hayes, A., Gardner, D. C., Cornell, M. J., Petty, J., Hakes, L., Wardleworth, L., *et al.* (2007). Growth control of the eukaryote cell: a systems biology study in yeast. *J Biol* *6*, 4.
- Chan, T. F., Carvalho, J., Riles, L., and Zheng, X. F. (2000). A chemical genomics approach toward understanding the global functions of the target of rapamycin protein (TOR). *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 13227-13232.
- Chang, M., Bellaoui, M., Boone, C., and Brown, G. W. (2002). A genome-wide screen for methyl methanesulfonate-sensitive mutants reveals genes required for S phase progression in the presence of DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 16934-16939.
- Chang, M., Bellaoui, M., Zhang, C., Desai, R., Morozov, P., Delgado-Cruzata, L., Rothstein, R., Freyer, G. A., Boone, C., and Brown, G. W. (2005). RMI1/NCE4, a suppressor of genome instability, encodes a member of the RecQ helicase/Topo III complex. *Embo J* *24*, 2024-2033.
- Chen, C. M., and Behringer, R. R. (2004). *Ovca1* regulates cell proliferation, embryonic development, and tumorigenesis. *Genes Dev* *18*, 320-332.
- Chen, C. M., and Behringer, R. R. (2005). *OVCA1*: tumor suppressor gene. *Curr Opin Genet Dev* *15*, 49-54.
- Chen, H., and Sharp, B. M. (2004). Content-rich biological network constructed by mining PubMed abstracts. *BMC Bioinformatics* *5*, 147.
- Chen, J. Y., and Bodley, J. W. (1988). Biosynthesis of diphthamide in *Saccharomyces cerevisiae*. Partial purification and characterization of a specific S-adenosylmethionine:elongation factor 2 methyltransferase. *J Biol Chem* *263*, 11692-11696.
- Chen, J. Y., Bodley, J. W., and Livingston, D. M. (1985). Diphtheria toxin-resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* *5*, 3357-3360.
- Cherry, J. M., Adler, C., Ball, C., Chervitz, S. A., Dwight, S. S., Hester, E. T., Jia, Y., Juvik, G., Roe, T., Schroeder, M., *et al.* (1998). SGD: *Saccharomyces Genome Database*. *Nucleic Acids Res* *26*, 73-79.
- Cherry, J. M., Ball, C., Weng, S., Juvik, G., Schmidt, R., Adler, C., Dunn, B., Dwight, S., Riles, L., Mortimer, R. K., and Botstein, D. (1997). Genetic and physical maps of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* *387*, 67-73.
- Cipollina, C., van den Brink, J., Daran-Lapujade, P., Pronk, J. T., Porro, D., and de Winde, J. H. (2008). *Saccharomyces cerevisiae* SFP1: at the crossroads of central metabolism and ribosome biogenesis. *Microbiology* *154*, 1686-1699.
- Cliften, P., Sudarsanam, P., Desikan, A., Fulton, L., Fulton, B., Majors, J., Waterston, R., Cohen, B. A., and Johnston, M. (2003). Finding functional features in *Saccharomyces* genomes by phylogenetic footprinting. *Science* *301*, 71-76.
- Collins, S. R., Kemmeren, P., Zhao, X. C., Greenblatt, J. F., Spencer, F., Holstege, F. C., Weissman, J. S., and Krogan, N. J. (2007a). Toward a comprehensive atlas of the physical interactome of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Proteomics* *6*, 439-450.
- Collins, S. R., Miller, K. M., Maas, N. L., Roguev, A., Fillingham, J., Chu, C. S., Schuldiner, M., Gebbia, M., Recht, J., Shales, M., *et al.* (2007b). Functional dissection of protein complexes involved in yeast chromosome biology using a genetic interaction map. *Nature* *446*, 806-810.

- Cooper, A. A., Gitler, A. D., Cashikar, A., Haynes, C. M., Hill, K. J., Bhullar, B., Liu, K., Xu, K., Strathearn, K. E., Liu, F., *et al.* (2006). Alpha-synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. *Science* *313*, 324-328.
- Corbacho, I., Olivero, I., and Hernandez, L. M. (2005). A genome-wide screen for *Saccharomyces cerevisiae* nonessential genes involved in mannosyl phosphate transfer to mannoprotein-linked oligosaccharides. *Fungal Genet Biol* *42*, 773-790.
- Cui, Y., Dinman, J. D., Kinzy, T. G., and Peltz, S. W. (1998). The Mof2/Sui1 protein is a general monitor of translational accuracy. *Mol Cell Biol* *18*, 1506-1516.
- Czworkowski, J., Wang, J., Steitz, T. A., and Moore, P. B. (1994). The crystal structure of elongation factor G complexed with GDP, at 2.7 Å resolution. *Embo J* *13*, 3661-3668.
- D**
- D'Elia, R., Allen, P. L., Johanson, K., Nickerson, C. A., and Hammond, T. G. (2005). Homozygous diploid deletion strains of *Saccharomyces cerevisiae* that determine lag phase and dehydration tolerance. *Appl Microbiol Biotechnol* *67*, 816-826.
- Date, S. V., and Marcotte, E. M. (2003). Discovery of uncharacterized cellular systems by genome-wide analysis of functional linkages. *Nat Biotechnol* *21*, 1055-1062.
- Davierwala, A. P., Haynes, J., Li, Z., Brost, R. L., Robinson, M. D., Yu, L., Mnaimneh, S., Ding, H., Zhu, H., Chen, Y., *et al.* (2005). The synthetic genetic interaction spectrum of essential genes. *Nat Genet* *37*, 1147-1152.
- de Crecy-Lagard, V., El Yacoubi, B., de la Garza, R. D., Noiriél, A., and Hanson, A. D. (2007). Comparative genomics of bacterial and plant folate synthesis and salvage: predictions and validations. *BMC Genomics* *8*, 245.
- de la Fuente, A., Brazhnik, P., and Mendes, P. (2002). Linking the genes: inferring quantitative gene networks from microarray data. *Trends Genet* *18*, 395-398.
- Delsuc, F., Brinkmann, H., and Philippe, H. (2005). Phylogenomics and the reconstruction of the tree of life. *Nat Rev Genet* *6*, 361-375.
- Demeshkina, N., Hirokawa, G., Kaji, A., and Kaji, H. (2007). Novel activity of eukaryotic translocase, eEF2: dissociation of the 80S ribosome into subunits with ATP but not with GTP. *Nucleic Acids Res* *35*, 4597-4607.
- Deng, M., Tu, Z., Sun, F., and Chen, T. (2004). Mapping Gene Ontology to proteins based on protein-protein interaction data. *Bioinformatics* *20*, 895-902.
- Dephoure, N., Howson, R. W., Blethrow, J. D., Shokat, K. M., and O'Shea, E. K. (2005). Combining chemical genetics and proteomics to identify protein kinase substrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 17940-17945.
- DeRisi, J. L., Iyer, V. R., and Brown, P. O. (1997). Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* *278*, 680-686.
- Desmoucelles, C., Pinson, B., Saint-Marc, C., and Daignan-Fornier, B. (2002). Screening the yeast "disruptome" for mutants affecting resistance to the immunosuppressive drug, mycophenolic acid. *J Biol Chem* *277*, 27036-27044.
- Deutschbauer, A. M., Williams, R. M., Chu, A. M., and Davis, R. W. (2002). Parallel phenotypic analysis of sporulation and postgermination growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 15530-15535.
- Dilda, P. J., Don, A. S., Tanabe, K. M., Higgins, V. J., Allen, J. D., Dawes, I. W., and Hogg, P. J. (2005). Mechanism of selectivity of an angiogenesis inhibitor from screening a genome-wide set of *Saccharomyces cerevisiae* deletion strains. *J Natl Cancer Inst* *97*, 1539-1547.
- Dolinski, K., and Botstein, D. (2005). Changing perspectives in yeast research nearly a decade after the genome sequence. *Genome Res* *15*, 1611-1619.
- Dominguez, J. M., Gomez-Lorenzo, M. G., and Martin, J. J. (1999). Sordarin inhibits fungal protein synthesis by blocking translocation differently to fusidic acid. *J Biol Chem* *274*, 22423-22427.

- Dominguez, J. M., Kelly, V. A., Kinsman, O. S., Marriott, M. S., Gomez de las Heras, F., and Martin, J. J. (1998). Sordarins: A new class of antifungals with selective inhibition of the protein synthesis elongation cycle in yeasts. *Antimicrob Agents Chemother* *42*, 2274-2278.
- Dominguez, J. M., and Martin, J. J. (1998). Identification of elongation factor 2 as the essential protein targeted by sordarins in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* *42*, 2279-2283.
- Dominguez, J. M., and Martin, J. J. (2001). Identification of a putative sordarin binding site in *Candida albicans* elongation factor 2 by photoaffinity labeling. *J Biol Chem* *276*, 31402-31407.
- Doms, A., and Schroeder, M. (2005). GoPubMed: exploring PubMed with the Gene Ontology. *Nucleic Acids Res* *33*, W783-786.
- Doostzadeh, J., Davis, R. W., Giaever, G. N., Nislow, C., and Langston, J. W. (2007). Chemical genomic profiling for identifying intracellular targets of toxicants producing Parkinson's disease. *Toxicol Sci* *95*, 182-187.
- Dorer, R. K., Zhong, S., Tallarico, J. A., Wong, W. H., Mitchison, T. J., and Murray, A. W. (2005). A small-molecule inhibitor of Mps1 blocks the spindle-checkpoint response to a lack of tension on mitotic chromosomes. *Curr Biol* *15*, 1070-1076.
- Douglas, S. M., Montelione, G. T., and Gerstein, M. (2005). PubNet: a flexible system for visualizing literature derived networks. *Genome Biol* *6*, R80.
- Downey, M., Houlsworth, R., Maringele, L., Rollie, A., Brehme, M., Galicia, S., Guillard, S., Partington, M., Zubko, M. K., Krogan, N. J., *et al.* (2006). A genome-wide screen identifies the evolutionarily conserved KEOPS complex as a telomere regulator. *Cell* *124*, 1155-1168.
- Drawid, A., Jansen, R., and Gerstein, M. (2000). Genome-wide analysis relating expression level with protein subcellular localization. *Trends Genet* *16*, 426-430.
- Drees, B. L., Thorsson, V., Carter, G. W., Rives, A. W., Raymond, M. Z., Avila-Campillo, I., Shannon, P., and Galitski, T. (2005). Derivation of genetic interaction networks from quantitative phenotype data. *Genome Biol* *6*, R38.
- Du, Y., Walker, L., Novick, P., and Ferro-Novick, S. (2006). Ptc1p regulates cortical ER inheritance via Slf2p. *Embo J* *25*, 4413-4422.
- Dudley, A. M., Janse, D. M., Tanay, A., Shamir, R., and Church, G. M. (2005). A global view of pleiotropy and phenotypically derived gene function in yeast. *Mol Syst Biol* *1*, 2005 0001.
- Dulude, D., Berchiche, Y. A., Gendron, K., Brakier-Gingras, L., and Heveker, N. (2006). Decreasing the frameshift efficiency translates into an equivalent reduction of the replication of the human immunodeficiency virus type 1. *Virology* *345*, 127-136.
- Dunn, W. B., Bailey, N. J., and Johnson, H. E. (2005). Measuring the metabolome: current analytical technologies. *Analyst* *130*, 606-625.
- Dwight, S. S., Harris, M. A., Dolinski, K., Ball, C. A., Binkley, G., Christie, K. R., Fisk, D. G., Issel-Tarver, L., Schroeder, M., Sherlock, G., *et al.* (2002). *Saccharomyces Genome Database (SGD)* provides secondary gene annotation using the Gene Ontology (GO). *Nucleic Acids Res* *30*, 69-72.
- E
- Edgar, R., Domrachev, M., and Lash, A. E. (2002). Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res* *30*, 207-210.
- Eisen, M. B., Spellman, P. T., Brown, P. O., and Botstein, D. (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 14863-14868.
- Enright, A. J., and Ouzounis, C. A. (2001). BioLayout--an automatic graph layout algorithm for similarity visualization. *Bioinformatics* *17*, 853-854.
- Enyenihi, A. H., and Saunders, W. S. (2003). Large-scale functional genomic analysis of sporulation and meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *163*, 47-54.
- Ericson, E., Gebbia, M., Heisler, L. E., Wildenhain, J., Tyers, M., Giaever, G., and Nislow, C. (2008). Off-target effects of psychoactive drugs revealed by genome-wide assays in yeast. *PLoS Genet* *4*, e1000151.
- Escobar-Henriques, M., Balguerie, A., Monribot, C., Boucherie, H., and Daignan-Fornier, B. (2001). Proteome analysis and morphological studies reveal multiple effects of the immunosuppressive drug

- mycophenolic acid specifically resulting from guanylic nucleotide depletion. *J Biol Chem* 276, 46237-46242.
- Estrada, P., Kim, J., Coleman, J., Walker, L., Dunn, B., Takizawa, P., Novick, P., and Ferro-Novick, S. (2003). Myo4p and She3p are required for cortical ER inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 163, 1255-1266.
- Eugui, E. M., Almquist, S. J., Muller, C. D., and Allison, A. C. (1991). Lymphocyte-selective cytostatic and immunosuppressive effects of mycophenolic acid in vitro: role of deoxyguanosine nucleotide depletion. *Scand J Immunol* 33, 161-173.
- Exinger, F., and Lacroute, F. (1992). 6-Azauracil inhibition of GTP biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 22, 9-11.
- F**
- Fairn, G. D., Macdonald, K., and McMaster, C. R. (2007). A chemogenomic screen in *Saccharomyces cerevisiae* uncovers a primary role for the mitochondria in farnesol toxicity and its regulation by the Pkc1 pathway. *J Biol Chem* 282, 4868-4874.
- Famili, I., Forster, J., Nielsen, J., and Palsson, B. O. (2003). *Saccharomyces cerevisiae* phenotypes can be predicted by using constraint-based analysis of a genome-scale reconstructed metabolic network. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 13134-13139.
- Fang, Y., Brass, A., Hoyle, D. C., Hayes, A., Bashein, A., Oliver, S. G., Waddington, D., and Rattray, M. (2003). A model-based analysis of microarray experimental error and normalisation. *Nucleic Acids Res* 31, e96.
- Farewell, A., and Neidhardt, F. C. (1998). Effect of temperature on in vivo protein synthetic capacity in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 180, 4704-4710.
- Fendrick, J. L., Iglewski, W. J., Moehring, J. M., and Moehring, T. J. (1992). Characterization of the endogenous ADP-ribosylation of wild-type and mutant elongation factor 2 in eukaryotic cells. *Eur J Biochem* 205, 25-31.
- Ferguson, L. R., and Philpott, M. (2008). Nutrition and mutagenesis. *Annu Rev Nutr* 28, 313-329.
- Ficarro, S. B., McClelland, M. L., Stukenberg, P. T., Burke, D. J., Ross, M. M., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., and White, F. M. (2002). Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol* 20, 301-305.
- Fichtner, L., Jablonowski, D., Schierhorn, A., Kitamoto, H. K., Stark, M. J., and Schaffrath, R. (2003). Elongator's toxin-target (TOT) function is nuclear localization sequence dependent and suppressed by post-translational modification. *Mol Microbiol* 49, 1297-1307.
- Fichtner, L., and Schaffrath, R. (2002). KTI11 and KTI13, *Saccharomyces cerevisiae* genes controlling sensitivity to G1 arrest induced by *Kluyveromyces lactis* zymocin. *Mol Microbiol* 44, 865-875.
- Firoozan, M., Grant, C. M., Duarte, J. A., and Tuite, M. F. (1991). Quantitation of readthrough of termination codons in yeast using a novel gene fusion assay. *Yeast* 7, 173-183.
- Fleming, J., Outeiro, T. F., Slack, M., Lindquist, S. L., and Bulawa, C. E. (2008). Detection of compounds that rescue Rab1-synuclein toxicity. *Methods Enzymol* 439, 339-351.
- Fleming, J. A., Lightcap, E. S., Sadis, S., Thoroddsen, V., Bulawa, C. E., and Blackman, R. K. (2002). Complementary whole-genome technologies reveal the cellular response to proteasome inhibition by PS-341. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 1461-1466.
- Foley, B. T., Moehring, J. M., and Moehring, T. J. (1995). Mutations in the elongation factor 2 gene which confer resistance to diphtheria toxin and *Pseudomonas* exotoxin A. Genetic and biochemical analyses. *J Biol Chem* 270, 23218-23225.
- Forst, C. V., and Schulten, K. (2001). Phylogenetic analysis of metabolic pathways. *J Mol Evol* 52, 471-489.
- Foury, F. (1997). Human genetic diseases: a cross-talk between man and yeast. *Gene* 195, 1-10.
- Frank, J., Gao, H., Sengupta, J., Gao, N., and Taylor, D. J. (2007). The process of mRNA-tRNA translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 19671-19678.
- Fraser, C. S., and Hershey, J. W. (2005). Movement in ribosome translocation. *J Biol* 4, 8.

Fujita, K., Matsuyama, A., Kobayashi, Y., and Iwahashi, H. (2006). The genome-wide screening of yeast deletion mutants to identify the genes required for tolerance to ethanol and other alcohols. *FEMS Yeast Res* 6, 744-750.

G

Gaillard, H., Tous, C., Botet, J., Gonzalez-Aguilera, C., Quintero, M. J., Viladevall, L., Garcia-Rubio, M. L., Rodriguez-Gil, A., Marin, A., Arino, J., *et al.* (2009). Genome-wide analysis of factors affecting transcription elongation and DNA repair: a new role for PAF and Ccr4-not in transcription-coupled repair. *PLoS Genet* 5, e1000364.

Galiègue-Zouitina, S., Bailleul, B., Ginot, Y. M., Perly, B., Vigny, P., and Loucheux-Lefebvre, M. H. (1986). N2-guanyl and N6-adenyl arylation of chicken erythrocyte DNA by the ultimate carcinogen of 4-nitroquinoline 1-oxide. *Cancer Res* 46, 1858-1863.

Game, J. C., Birrell, G. W., Brown, J. A., Shibata, T., Baccari, C., Chu, A. M., Williamson, M. S., and Brown, J. M. (2003). Use of a genome-wide approach to identify new genes that control resistance of *Saccharomyces cerevisiae* to ionizing radiation. *Radiat Res* 160, 14-24.

Gangjee, A., Jain, H. D., and Kurup, S. (2007). Recent advances in classical and non-classical antifolates as antitumor and antiopportunistic infection agents: part I. *Anticancer Agents Med Chem* 7, 524-542.

Gangjee, A., Jain, H. D., and Kurup, S. (2008). Recent advances in classical and non-classical antifolates as antitumor and antiopportunistic infection agents: Part II. *Anticancer Agents Med Chem* 8, 205-231.

Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., Botstein, D., and Brown, P. O. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell* 11, 4241-4257.

Gatbonton, T., Imbesi, M., Nelson, M., Akey, J. M., Ruderfer, D. M., Kruglyak, L., Simon, J. A., and Bedalov, A. (2006). Telomere length as a quantitative trait: genome-wide survey and genetic mapping of telomere length-control genes in yeast. *PLoS Genet* 2, e35.

Gavin, A. C., Aloy, P., Grandi, P., Krause, R., Boesche, M., Marzioch, M., Rau, C., Jensen, L. J., Bastuck, S., Dumpelfeld, B., *et al.* (2006). Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature*.

Gavin, A. C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J. M., Michon, A. M., Cruciat, C. M., *et al.* (2002). Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* 415, 141-147.

Gavin, A. C., and Superti-Furga, G. (2003). Protein complexes and proteome organization from yeast to man. *Curr Opin Chem Biol* 7, 21-27.

Ge, H., Liu, Z., Church, G. M., and Vidal, M. (2001). Correlation between transcriptome and interactome mapping data from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Genet* 29, 482-486.

Gentleman, R. C., Carey, V. J., Bates, D. M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J., *et al.* (2004). Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 5, R80.

Ghaemmaghami, S., Huh, W. K., Bower, K., Howson, R. W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E. K., and Weissman, J. S. (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* 425, 737-741.

Giaever, G., Chu, A. M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Veronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K., Andre, B., *et al.* (2002). Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* 418, 387-391.

Giaever, G., Flaherty, P., Kumm, J., Proctor, M., Nislow, C., Jaramillo, D. F., Chu, A. M., Jordan, M. I., Arkin, A. P., and Davis, R. W. (2004). Chemogenomic profiling: identifying the functional interactions of small molecules in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 793-798.

Giaever, G., Shoemaker, D. D., Jones, T. W., Liang, H., Winzeler, E. A., Astromoff, A., and Davis, R. W. (1999). Genomic profiling of drug sensitivities via induced haploinsufficiency. *Nat Genet* 21, 278-283.

Giorgini, F., Guidetti, P., Nguyen, Q., Bennett, S. C., and Muchowski, P. J. (2005). A genomic screen in yeast implicates kynurenine 3-monooxygenase as a therapeutic target for Huntington disease. *Nat Genet* 37, 526-531.

- Goetz, T., and von der Lieth, C. W. (2005). PubFinder: a tool for improving retrieval rate of relevant PubMed abstracts. *Nucleic Acids Res* **33**, W774-778.
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., *et al.* (1996). Life with 6000 genes. *Science* **274**, 546, 563-547.
- Golub, T. R., Slonim, D. K., Tamayo, P., Huard, C., Gaasenbeek, M., Mesirov, J. P., Coller, H., Loh, M. L., Downing, J. R., Caligiuri, M. A., *et al.* (1999). Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* **286**, 531-537.
- Gomez-Lorenzo, M. G., and Garcia-Bustos, J. F. (1998). Ribosomal P-protein stalk function is targeted by sordarin antifungals. *J Biol Chem* **273**, 25041-25044.
- Gorsich, S. W., Dien, B. S., Nichols, N. N., Slininger, P. J., Liu, Z. L., and Skory, C. D. (2006). Tolerance to furfural-induced stress is associated with pentose phosphate pathway genes ZWF1, GND1, RPE1, and TKL1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* **71**, 339-349.
- Gresham, D., Ruderfer, D. M., Pratt, S. C., Schacherer, J., Dunham, M. J., Botstein, D., and Kruglyak, L. (2006). Genome-wide detection of polymorphisms at nucleotide resolution with a single DNA microarray. *Science* **311**, 1932-1936.
- Griffith, J. L., Coleman, L. E., Raymond, A. S., Goodson, S. G., Pittard, W. S., Tsui, C., and Devine, S. E. (2003). Functional genomics reveals relationships between the retrovirus-like Ty1 element and its host *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **164**, 867-879.
- Gruhler, A., Olsen, J. V., Mohammed, S., Mortensen, P., Faergeman, N. J., Mann, M., and Jensen, O. N. (2005). Quantitative phosphoproteomics applied to the yeast pheromone signaling pathway. *Mol Cell Proteomics* **4**, 310-327.
- Guarente, L. (1993). Synthetic enhancement in gene interaction: a genetic tool come of age. *Trends Genet* **9**, 362-366.
- Guldener, U., Munsterkotter, M., Kastenmuller, G., Strack, N., van Helden, J., Lemer, C., Richelles, J., Wodak, S. J., Garcia-Martinez, J., Perez-Ortin, J. E., *et al.* (2005). CYGD: the Comprehensive Yeast Genome Database. *Nucleic Acids Res* **33**, D364-368.
- Guldener, U., Munsterkotter, M., Oesterheld, M., Pagel, P., Ruepp, A., Mewes, H. W., and Stumpflen, V. (2006). MPact: the MIPS protein interaction resource on yeast. *Nucleic Acids Res* **34**, D436-441.
- Gupta, P. K., Liu, S., Batavia, M. P., and Leppla, S. H. (2008). The diphthamide modification on elongation factor-2 renders mammalian cells resistant to ricin. *Cell Microbiol* **10**, 1687-1694.
- Gupta, S. S., Ton, V. K., Beaudry, V., Rulli, S., Cunningham, K., and Rao, R. (2003). Antifungal activity of amiodarone is mediated by disruption of calcium homeostasis. *J Biol Chem* **278**, 28831-28839.
- Gygi, S. P., Rist, B., Gerber, S. A., Turecek, F., Gelb, M. H., and Aebersold, R. (1999). Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol* **17**, 994-999.
- H
- Hall, D. A., Zhu, H., Zhu, X., Royce, T., Gerstein, M., and Snyder, M. (2004). Regulation of gene expression by a metabolic enzyme. *Science* **306**, 482-484.
- Hall, M. N., and Linder, P. (1993). *The Early days of yeast genetics* (Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Hampsey, M. (1997). A review of phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**, 1099-1133.
- Hanawalt, P. C., and Spivak, G. (2008). Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 958-970.
- Hancock, L. C., Behta, R. P., and Lopes, J. M. (2006). Genomic analysis of the Opi- phenotype. *Genetics* **173**, 621-634.
- Hanway, D., Chin, J. K., Xia, G., Oshiro, G., Winzeler, E. A., and Romesberg, F. E. (2002). Previously uncharacterized genes in the UV- and MMS-induced DNA damage response in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 10605-10610.
- Harbison, C. T., Gordon, D. B., Lee, T. I., Rinaldi, N. J., Macisaac, K. D., Danford, T. W., Hannett, N. M., Tagne, J. B., Reynolds, D. B., Yoo, J., *et al.* (2004). Transcriptional regulatory code of a eukaryotic genome. *Nature* **431**, 99-104.

- Harger, J. W., and Dinman, J. D. (2003). An in vivo dual-luciferase assay system for studying translational recoding in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Rna* 9, 1019-1024.
- Harger, J. W., Meskauskas, A., and Dinman, J. D. (2002). An "integrated model" of programmed ribosomal frameshifting. *Trends Biochem Sci* 27, 448-454.
- Harger, J. W., Meskauskas, A., Nielsen, J., Justice, M. C., and Dinman, J. D. (2001). Ty1 retrotransposition and programmed +1 ribosomal frameshifting require the integrity of the protein synthetic translocation step. *Virology* 286, 216-224.
- Hartman, J. L. t., Garvik, B., and Hartwell, L. (2001). Principles for the buffering of genetic variation. *Science* 291, 1001-1004.
- Hartman, J. L. t., and Tippery, N. P. (2004). Systematic quantification of gene interactions by phenotypic array analysis. *Genome Biol* 5, R49.
- Haugen, A. C., Kelley, R., Collins, J. B., Tucker, C. J., Deng, C., Afshari, C. A., Brown, J. M., Ideker, T., and Van Houten, B. (2004). Integrating phenotypic and expression profiles to map arsenic-response networks. *Genome Biol* 5, R95.
- Hauser, D., and Sigg, H. P. (1971). [Isolation and decomposition of sordarin]. *Helv Chim Acta* 54, 1178-1190.
- Heitman, J., Movva, N. R., and Hall, M. N. (1991). Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* 253, 905-909.
- Hellauer, K., Lesage, G., Sdicu, A. M., and Turcotte, B. (2005). Large-scale analysis of genes that alter sensitivity to the anticancer drug tirapazamine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Pharmacol* 68, 1365-1375.
- Herrero, J., Al-Shahrour, F., Diaz-Uriarte, R., Mateos, A., Vaquerizas, J. M., Santoyo, J., and Dopazo, J. (2003). GEPAS: A web-based resource for microarray gene expression data analysis. *Nucleic Acids Res* 31, 3461-3467.
- Herreros, E., Martinez, C. M., Almela, M. J., Marriott, M. S., De Las Heras, F. G., and Gargallo-Viola, D. (1998). Sordarins: in vitro activities of new antifungal derivatives against pathogenic yeasts, *Pneumocystis carinii*, and filamentous fungi. *Antimicrob Agents Chemother* 42, 2863-2869.
- Herrgard, M. J., Lee, B. S., Portnoy, V., and Palsson, B. O. (2006). Integrated analysis of regulatory and metabolic networks reveals novel regulatory mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Res*.
- Hillenmeyer, M. E., Fung, E., Wildenhain, J., Pierce, S. E., Hoon, S., Lee, W., Proctor, M., St Onge, R. P., Tyers, M., Koller, D., *et al.* (2008). The chemical genomic portrait of yeast: uncovering a phenotype for all genes. *Science* 320, 362-365.
- Hinnen, A., Hicks, J. B., and Fink, G. R. (1978). Transformation of yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 1929-1933.
- Hirschman, J. E., Balakrishnan, R., Christie, K. R., Costanzo, M. C., Dwight, S. S., Engel, S. R., Fisk, D. G., Hong, E. L., Livstone, M. S., Nash, R., *et al.* (2006). Genome Snapshot: a new resource at the *Saccharomyces* Genome Database (SGD) presenting an overview of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nucleic Acids Res* 34, D442-445.
- Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A., Bader, G. D., Moore, L., Adams, S. L., Millar, A., Taylor, P., Bennett, K., Boutilier, K., *et al.* (2002). Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* 415, 180-183.
- Hodges, P. E., Payne, W. E., and Garrels, J. I. (1998). The Yeast Protein Database (YPD): a curated proteome database for *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 26, 68-72.
- Hoeijmakers, J. H. (1993). Nucleotide excision repair. II: From yeast to mammals. *Trends Genet* 9, 211-217.
- Hoffmann, R., and Valencia, A. (2005). Implementing the iHOP concept for navigation of biomedical literature. *Bioinformatics* 21 Suppl 2, ii252-258.
- Hoon, S., Smith, A. M., Wallace, I. M., Suresh, S., Miranda, M., Fung, E., Proctor, M., Shokat, K. M., Zhang, C., Davis, R. W., *et al.* (2008a). An integrated platform of genomic assays reveals small-molecule bioactivities. *Nat Chem Biol* 4, 498-506.
- Hoon, S., St Onge, R. P., Giaever, G., and Nislow, C. (2008b). Yeast chemical genomics and drug discovery: an update. *Trends Pharmacol Sci*.

- Horak, C. E., and Snyder, M. (2002). Global analysis of gene expression in yeast. *Funct Integr Genomics* 2, 171-180.
- Huang, B., Johansson, M. J., and Bystrom, A. S. (2005a). An early step in wobble uridine tRNA modification requires the Elongator complex. *Rna* 11, 424-436.
- Huang, J., and Schreiber, S. L. (1997). A yeast genetic system for selecting small molecule inhibitors of protein-protein interactions in nanodroplets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13396-13401.
- Huang, J., Zhu, H., Haggarty, S. J., Spring, D. R., Hwang, H., Jin, F., Snyder, M., and Schreiber, S. L. (2004). Finding new components of the target of rapamycin (TOR) signaling network through chemical genetics and proteome chips. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 16594-16599.
- Huang, M. E., Rio, A. G., Nicolas, A., and Kolodner, R. D. (2003). A genomewide screen in *Saccharomyces cerevisiae* for genes that suppress the accumulation of mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 11529-11534.
- Huang, R. Y., Eddy, M., Vujcic, M., and Kowalski, D. (2005). Genome-wide screen identifies genes whose inactivation confer resistance to cisplatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cancer Res* 65, 5890-5897.
- Hughes, T. R. (2002). Yeast and drug discovery. *Funct Integr Genomics* 2, 199-211.
- Hughes, T. R., Marton, M. J., Jones, A. R., Roberts, C. J., Stoughton, R., Armour, C. D., Bennett, H. A., Coffey, E., Dai, H., He, Y. D., *et al.* (2000a). Functional discovery via a compendium of expression profiles. *Cell* 102, 109-126.
- Hughes, T. R., Roberts, C. J., Dai, H., Jones, A. R., Meyer, M. R., Slade, D., Burchard, J., Dow, S., Ward, T. R., Kidd, M. J., *et al.* (2000b). Widespread aneuploidy revealed by DNA microarray expression profiling. *Nat Genet* 25, 333-337.
- Huh, W. K., Falvo, J. V., Gerke, L. C., Carroll, A. S., Howson, R. W., Weissman, J. S., and O'Shea, E. K. (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 425, 686-691.
- Hurto, R. L., Tong, A. H., Boone, C., and Hopper, A. K. (2007). Inorganic phosphate deprivation causes tRNA nuclear accumulation via retrograde transport in *S. cerevisiae*. *Genetics*.
- Ideker, T., Galitski, T., and Hood, L. (2001). A new approach to decoding life: systems biology. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2, 343-372.
- Iglewski, W. J., Lee, H., and Muller, P. (1984). ADP-ribosyltransferase from beef liver which ADP-ribosylates elongation factor-2. *FEBS Lett* 173, 113-118.
- Ihmels, J., Friedlander, G., Bergmann, S., Sarig, O., Ziv, Y., and Barkai, N. (2002). Revealing modular organization in the yeast transcriptional network. *Nat Genet* 31, 370-377.
- Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M., and Sakaki, Y. (2001). A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4569-4574.
- J
- Jeong, H., Herskowitz, I., Kroetz, D. L., and Rine, J. (2007). Function-altering SNPs in the human multidrug transporter gene ABCB1 identified using a *Saccharomyces*-based assay. *PLoS Genet* 3, e39.
- Jin, Y. H., Dunlap, P. E., McBride, S. J., Al-Refai, H., Bushel, P. R., and Freedman, J. H. (2008). Global transcriptome and deletome profiles of yeast exposed to transition metals. *PLoS Genet* 4, e1000053.
- Jorgensen, P., Nelson, B., Robinson, M. D., Chen, Y., Andrews, B., Tyers, M., and Boone, C. (2002a). High-resolution genetic mapping with ordered arrays of *Saccharomyces cerevisiae* deletion mutants. *Genetics* 162, 1091-1099.
- Jorgensen, P., Nishikawa, J. L., Breitkreutz, B. J., and Tyers, M. (2002). Systematic identification of pathways that couple cell growth and division in yeast. *Science* 297, 395-400.
- Jorgensen, R., Merrill, A. R., Yates, S. P., Marquez, V. E., Schwan, A. L., Boesen, T., and Andersen, G. R. (2005). Exotoxin A-eEF2 complex structure indicates ADP ribosylation by ribosome mimicry. *Nature* 436, 979-984.

- Jorgensen, R., Ortiz, P. A., Carr-Schmid, A., Nissen, P., Kinzy, T. G., and Andersen, G. R. (2003). Two crystal structures demonstrate large conformational changes in the eukaryotic ribosomal translocase. *Nat Struct Biol* 10, 379-385.
- Jorgensen, R., Purdy, A. E., Fieldhouse, R. J., Kimber, M. S., Bartlett, D. H., and Merrill, A. R. (2008). Cholix toxin, a novel ADP-ribosylating factor from *Vibrio cholerae*. *J Biol Chem* 283, 10671-10678.
- Joyce, A. R., and Palsson, B. O. (2006). The model organism as a system: integrating 'omics' data sets. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 198-210.
- Justice, M. C., Hsu, M. J., Tse, B., Ku, T., Balkovec, J., Schmatz, D., and Nielsen, J. (1998). Elongation factor 2 as a novel target for selective inhibition of fungal protein synthesis. *J Biol Chem* 273, 3148-3151.
- Justice, M. C., Ku, T., Hsu, M. J., Carniol, K., Schmatz, D., and Nielsen, J. (1999). Mutations in ribosomal protein L10e confer resistance to the fungal-specific eukaryotic elongation factor 2 inhibitor sordarin. *J Biol Chem* 274, 4869-4875.
- K**
- Kakimoto, M., Kobayashi, A., Fukuda, R., Ono, Y., Ohta, A., and Yoshimura, E. (2005). Genome-wide screening of aluminum tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biometals* 18, 467-474.
- Kalhor, H. R., and Clarke, S. (2003). Novel methyltransferase for modified uridine residues at the wobble position of tRNA. *Mol Cell Biol* 23, 9283-9292.
- Kanehisa, M., and Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* 28, 27-30.
- Kanemaki, M., Sanchez-Diaz, A., Gambus, A., and Labib, K. (2003). Functional proteomic identification of DNA replication proteins by induced proteolysis in vivo. *Nature* 423, 720-724.
- Kang, C. M., and Jiang, Y. W. (2005). Genome-wide survey of non-essential genes required for slowed DNA synthesis-induced filamentous growth in yeast. *Yeast* 22, 79-90.
- Kapp, L. D., and Lorsch, J. R. (2004). The molecular mechanics of eukaryotic translation. *Annu Rev Biochem* 73, 657-704.
- Kapushesky, M., Kemmeren, P., Culhane, A. C., Durinck, S., Ihmels, J., Korner, C., Kull, M., Torrente, A., Sarkans, U., Vilo, J., and Brazma, A. (2004). Expression Profiler: next generation--an online platform for analysis of microarray data. *Nucleic Acids Res* 32, W465-470.
- Kasahara, K., Ohtsuki, K., Ki, S., Aoyama, K., Takahashi, H., Kobayashi, T., Shirahige, K., and Kokubo, T. (2007). Assembly of regulatory factors on rRNA and ribosomal protein genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 27, 6686-6705.
- Kaziro, Y. (1978). The role of guanosine 5'-triphosphate in polypeptide chain elongation. *Biochim Biophys Acta* 505, 95-127.
- Kelley, B. P., Yuan, B., Lewitter, F., Sharan, R., Stockwell, B. R., and Ideker, T. (2004). PathBLAST: a tool for alignment of protein interaction networks. *Nucleic Acids Res* 32, W83-88.
- Kelley, R., and Ideker, T. (2005). Systematic interpretation of genetic interactions using protein networks. *Nat Biotechnol* 23, 561-566.
- Kellis, M., Patterson, N., Endrizzi, M., Birren, B., and Lander, E. S. (2003). Sequencing and comparison of yeast species to identify genes and regulatory elements. *Nature* 423, 241-254.
- Kiechle, M., Manivasakam, P., Eckardt-Schupp, F., Schiestl, R. H., and Friedl, A. A. (2002). Promoter-trapping in *Saccharomyces cerevisiae* by radiation-assisted fragment insertion. *Nucleic Acids Res* 30, e136.
- Kimata, Y., and Kohno, K. (1994). Elongation factor 2 mutants deficient in diphthamide formation show temperature-sensitive cell growth. *J Biol Chem* 269, 13497-13501.
- King, O. D., Foulger, R. E., Dwight, S. S., White, J. V., and Roth, F. P. (2003). Predicting gene function from patterns of annotation. *Genome Res* 13, 896-904.
- Kinsman, O. S., Chalk, P. A., Jackson, H. C., Middleton, R. F., Shuttleworth, A., Rudd, B. A., Jones, C. A., Noble, H. M., Wildman, H. G., Dawson, M. J., *et al.* (1998). Isolation and characterisation of an antifungal antibiotic (GR135402) with protein synthesis inhibition. *J Antibiot (Tokyo)* 51, 41-49.

- Kitagawa, T., Hashizume, Y., Murakane, T., Koga, E., Nomura, Y., Kakihara, Y., Fujieda, A., Uchida, M., Takahashi, H., Hoshida, H., and Akada, R. (2007a). Screening of drugs that suppress Ste11 MAPKKK activation in yeast identified a c-Abl tyrosine kinase inhibitor. *Biosci Biotechnol Biochem* **71**, 772-782.
- Kitagawa, T., Hoshida, H., and Akada, R. (2007b). Genome-wide analysis of cellular response to bacterial genotoxin CdtB in yeast. *Infect Immun* **75**, 1393-1402.
- Knight, Z. A., Schilling, B., Row, R. H., Kenski, D. M., Gibson, B. W., and Shokat, K. M. (2003). Phosphospecific proteolysis for mapping sites of protein phosphorylation. *Nat Biotechnol* **21**, 1047-1054.
- Komili, S., Farny, N. G., Roth, F. P., and Silver, P. A. (2007). Functional specificity among ribosomal proteins regulates gene expression. *Cell* **131**, 557-571.
- Kramer, R. W., Slagowski, N. L., Eze, N. A., Giddings, K. S., Morrison, M. F., Siggers, K. A., Starnbach, M. N., and Lesser, C. F. (2007). Yeast functional genomic screens lead to identification of a role for a bacterial effector in innate immunity regulation. *PLoS Pathog* **3**, e21.
- Krieger, C. J., Zhang, P., Mueller, L. A., Wang, A., Paley, S., Arnaud, M., Pick, J., Rhee, S. Y., and Karp, P. D. (2004). MetaCyc: a multiorganism database of metabolic pathways and enzymes. *Nucleic Acids Res* **32**, D438-442.
- Krishnan, V., Dirick, L., Lim, H. H., Lim, T. S., Si-Hoe, S. L., Cheng, C. S., Yap, K. L., Ting, A., Schwob, E., and Surana, U. (2007). A novel cell cycle inhibitor stalls replication forks and activates S phase checkpoint. *Cell Cycle* **6**, 1621-1630.
- Krogan, N. J., Cagney, G., Yu, H., Zhong, G., Guo, X., Ignatchenko, A., Li, J., Pu, S., Datta, N., Tikuisis, A. P., *et al.* (2006). Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*.
- Krogan, N. J., Keogh, M. C., Datta, N., Sawa, C., Ryan, O. W., Ding, H., Haw, R. A., Pootoolal, J., Tong, A., Canadien, V., *et al.* (2003). A Snf2 family ATPase complex required for recruitment of the histone H2A variant Htz1. *Mol Cell* **12**, 1565-1576.
- Kumar, A., Agarwal, S., Heyman, J. A., Matson, S., Heidtman, M., Piccirillo, S., Umansky, L., Drawid, A., Jansen, R., Liu, Y., *et al.* (2002). Subcellular localization of the yeast proteome. *Genes Dev* **16**, 707-719.
- Kumar, A., Cheung, K. H., Ross-Macdonald, P., Coelho, P. S., Miller, P., and Snyder, M. (2000). TRIPLES: a database of gene function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **28**, 81-84.
- Kuranda, K., Leberre, V., Sokol, S., Palamarczyk, G., and Francois, J. (2006). Investigating the caffeine effects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* brings new insights into the connection between TOR, PKC and Ras/cAMP signalling pathways. *Mol Microbiol* **61**, 1147-1166.
- Kushner, D. B., Lindenbach, B. D., Grdzlishvili, V. Z., Noueiry, A. O., Paul, S. M., and Ahlquist, P. (2003). Systematic, genome-wide identification of host genes affecting replication of a positive-strand RNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 15764-15769.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., *et al.* (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-921.
- Larabee, R. N., Shibata, Y., Mersman, D. P., Collins, S. R., Kemmeren, P., Roguev, A., Weissman, J. S., Briggs, S. D., Krogan, N. J., and Strahl, B. D. (2007). CCR4/NOT complex associates with the proteasome and regulates histone methylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 5836-5841.
- Lashkari, D. A., DeRisi, J. L., McCusker, J. H., Namath, A. F., Gentile, C., Hwang, S. Y., Brown, P. O., and Davis, R. W. (1997). Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13057-13062.
- Laurberg, M., Kristensen, O., Martemyanov, K., Gudkov, A. T., Nagaev, I., Hughes, D., and Liljas, A. (2000). Structure of a mutant EF-G reveals domain III and possibly the fusidic acid binding site. *J Mol Biol* **303**, 593-603.
- Lee, H., and Iglewski, W. J. (1984). Cellular ADP-ribosyltransferase with the same mechanism of action as diphtheria toxin and *Pseudomonas* toxin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 2703-2707.
- Lee, I., Date, S. V., Adai, A. T., and Marcotte, E. M. (2004). A probabilistic functional network of yeast genes. *Science* **306**, 1555-1558.

- Lee, M. S., and Spencer, F. A. (2004). Bipolar orientation of chromosomes in *Saccharomyces cerevisiae* is monitored by Mad1 and Mad2, but not by Mad3. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 10655-10660.
- Lee, M. W., Kim, B. J., Choi, H. K., Ryu, M. J., Kim, S. B., Kang, K. M., Cho, E. J., Youn, H. D., Huh, W. K., and Kim, S. T. (2007). Global protein expression profiling of budding yeast in response to DNA damage. *Yeast* *24*, 145-154.
- Lee, T. I., Rinaldi, N. J., Robert, F., Odom, D. T., Bar-Joseph, Z., Gerber, G. K., Hannett, N. M., Harbison, C. T., Thompson, C. M., Simon, I., *et al.* (2002). Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* *298*, 799-804.
- Lee, W., St Onge, R. P., Proctor, M., Flaherty, P., Jordan, M. I., Arkin, A. P., Davis, R. W., Nislow, C., and Giaever, G. (2005). Genome-wide requirements for resistance to functionally distinct DNA-damaging agents. *PLoS Genet* *1*, e24.
- Leger, M., Dulude, D., Steinberg, S. V., and Brakier-Gingras, L. (2007). The three transfer RNAs occupying the A, P and E sites on the ribosome are involved in viral programmed -1 ribosomal frameshift. *Nucleic Acids Res* *35*, 5581-5592.
- Lempiainen, H., Uotila, A., Urban, J., Dohnal, I., Ammerer, G., Loewith, R., and Shore, D. (2009). Sfp1 interaction with TORC1 and Mrs6 reveals feedback regulation on TOR signaling. *Mol Cell* *33*, 704-716.
- Lesage, G., Sdicu, A. M., Menard, P., Shapiro, J., Hussein, S., and Bussey, H. (2004). Analysis of beta-1,3-glucan assembly in *Saccharomyces cerevisiae* using a synthetic interaction network and altered sensitivity to caspofungin. *Genetics* *167*, 35-49.
- Lesuisse, E., Knight, S. A., Courel, M., Santos, R., Camadro, J. M., and Dancis, A. (2005). Genome-wide screen for genes with effects on distinct iron uptake activities in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *169*, 107-122.
- Li, C., and Wong, W. H. (2001). Model-based analysis of oligonucleotide arrays: expression index computation and outlier detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 31-36.
- Li, R., and Murray, A. W. (1991). Feedback control of mitosis in budding yeast. *Cell* *66*, 519-531.
- Li, W., Mo, W., Shen, D., Sun, L., Wang, J., Lu, S., Gitschier, J. M., and Zhou, B. (2005). Yeast model uncovers dual roles of mitochondria in action of artemisinin. *PLoS Genet* *1*, e36.
- Liao, C., Hu, B., Arno, M. J., and Panaretou, B. (2007). Genomic screening in vivo reveals the role played by vacuolar H⁺ ATPase and cytosolic acidification in sensitivity to DNA-damaging agents such as cisplatin. *Mol Pharmacol* *71*, 416-425.
- Licitra, E. J., and Liu, J. O. (1996). A three-hybrid system for detecting small ligand-protein receptor interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 12817-12821.
- Liu, S., Milne, G. T., Kuremsky, J. G., Fink, G. R., and Leppla, S. H. (2004). Identification of the proteins required for biosynthesis of diphthamide, the target of bacterial ADP-ribosylating toxins on translation elongation factor 2. *Mol Cell Biol* *24*, 9487-9497.
- Liu, S., Wiggins, J. F., Sreenath, T., Kulkarni, A. B., Ward, J. M., and Leppla, S. H. (2006). Dph3, a small protein required for diphthamide biosynthesis, is essential in mouse development. *Mol Cell Biol* *26*, 3835-3841.
- Liu, X., Noll, D. M., Lieb, J. D., and Clarke, N. D. (2005). DIP-chip: rapid and accurate determination of DNA-binding specificity. *Genome Res* *15*, 421-427.
- Loeillet, S., Palancade, B., Cartron, M., Thierry, A., Richard, G. F., Dujon, B., Doye, V., and Nicolas, A. (2005). Genetic network interactions among replication, repair and nuclear pore deficiencies in yeast. *DNA Repair (Amst)* *4*, 459-468.
- Longtine, M. S., McKenzie, A., 3rd, Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., and Pringle, J. R. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* *14*, 953-961.
- Lu, Z., and Hunter, L. (2005). Go molecular function terms are predictive of subcellular localization. *Pac Symp Biocomput*, 151-161.
- Luesch, H. (2006). Towards high-throughput characterization of small molecule mechanisms of action. *Mol Biosyst* *2*, 609-620.
- Luesch, H., Wu, T. Y., Ren, P., Gray, N. S., Schultz, P. G., and Supek, F. (2005). A genome-wide overexpression screen in yeast for small-molecule target identification. *Chem Biol* *12*, 55-63.

Lum, P. Y., Armour, C. D., Stepaniants, S. B., Cavet, G., Wolf, M. K., Butler, J. S., Hinshaw, J. C., Garnier, P., Prestwich, G. D., Leonardson, A., *et al.* (2004). Discovering modes of action for therapeutic compounds using a genome-wide screen of yeast heterozygotes. *Cell* **116**, 121-137.

M

MacBeath, G., and Schreiber, S. L. (2000). Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science* **289**, 1760-1763.

Malo, N., Hanley, J. A., Cerquozzi, S., Pelletier, J., and Nadon, R. (2006). Statistical practice in high-throughput screening data analysis. *Nat Biotechnol* **24**, 167-175.

Malpertuy, A., Tekaia, F., Casaregola, S., Aigle, M., Artiguenave, F., Blandin, G., Bolotin-Fukuhara, M., Bon, E., Brottier, P., de Montigny, J., *et al.* (2000). Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 19. Ascomycetes-specific genes. *FEBS Lett* **487**, 113-121.

Marc, P., Devaux, F., and Jacq, C. (2001). yMGV: a database for visualization and data mining of published genome-wide yeast expression data. *Nucleic Acids Res* **29**, E63-63.

Marcotte, E. M., Pellegrini, M., Ng, H. L., Rice, D. W., Yeates, T. O., and Eisenberg, D. (1999). Detecting protein function and protein-protein interactions from genome sequences. *Science* **285**, 751-753.

Margulies, M., Egholm, M., Altman, W. E., Attiya, S., Bader, J. S., Bemben, L. A., Berka, J., Braverman, M. S., Chen, Y. J., Chen, Z., *et al.* (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* **437**, 376-380.

Markovich, S., Yekutieli, A., Shalit, I., Shadkhan, Y., and Osherov, N. (2004). Genomic approach to identification of mutations affecting caspofungin susceptibility in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 3871-3876.

Marston, A. L., Tham, W. H., Shah, H., and Amon, A. (2004). A genome-wide screen identifies genes required for centromeric cohesion. *Science* **303**, 1367-1370.

Martin, D., Brun, C., Remy, E., Mouren, P., Thieffry, D., and Jacq, B. (2004). GOToolBox: functional analysis of gene datasets based on Gene Ontology. *Genome Biol* **5**, R101.

Marton, M. J., DeRisi, J. L., Bennett, H. A., Iyer, V. R., Meyer, M. R., Roberts, C. J., Stoughton, R., Burchard, J., Slade, D., Dai, H., *et al.* (1998). Drug target validation and identification of secondary drug target effects using DNA microarrays. *Nat Med* **4**, 1293-1301.

Mason, P. B., and Struhl, K. (2005). Distinction and relationship between elongation rate and processivity of RNA polymerase II in vivo. *Mol Cell* **17**, 831-840.

Mata, J., Marguerat, S., and Bahler, J. (2005). Post-transcriptional control of gene expression: a genome-wide perspective. *Trends Biochem Sci* **30**, 506-514.

Mattheakis, L. C., Shen, W. H., and Collier, R. J. (1992). DPH5, a methyltransferase gene required for diphthamide biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **12**, 4026-4037.

Mattheakis, L. C., Sor, F., and Collier, R. J. (1993). Diphthamide synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: structure of the DPH2 gene. *Gene* **132**, 149-154.

McAleer, W. J., Buynak, E. B., Maigetter, R. Z., Wampler, D. E., Miller, W. J., and Hilleman, M. R. (1984). Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature* **307**, 178-180.

Meaday, V., Baetz, K., Guzzo, J., Yuen, K., Kwok, T., Sheikh, B., Ding, H., Ueta, R., Hoac, T., Cheng, B., *et al.* (2005). Systematic yeast synthetic lethal and synthetic dosage lethal screens identify genes required for chromosome segregation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 13956-13961.


Medicherla, B., Kostova, Z., Schaefer, A., and Wolf, D. H. (2004). A genomic screen identifies Dsk2p and Rad23p as essential components of ER-associated degradation. *EMBO Rep* **5**, 692-697.

Menacho-Marquez, M., and Murguia, J. R. (2007). Yeast on drugs: *Saccharomyces cerevisiae* as a tool for anticancer drug research. *Clin Transl Oncol* **9**, 221-228.

Menne, T. F., Goyenechea, B., Sanchez-Puig, N., Wong, C. C., Tonkin, L. M., Ancliff, P. J., Brost, R. L., Costanzo, M., Boone, C., and Warren, A. J. (2007). The Shwachman-Bodian-Diamond syndrome protein mediates translational activation of ribosomes in yeast. *Nat Genet* **39**, 486-495.

Mewes, H. W., Albermann, K., Heumann, K., Liebl, S., and Pfeiffer, F. (1997). MIPS: a database for protein sequences, homology data and yeast genome information. *Nucleic Acids Res* **25**, 28-30.

- Meyen, J. (1838). Jahresbericht uber die Resultate der Arbeiten im Felde der physiologischen Botanik vom der Jahre 1837. *Wiegmann Archiv fur Naturgeschichte* 2, 1-186.
- Michaud, G. A., Salcius, M., Zhou, F., Bangham, R., Bonin, J., Guo, H., Snyder, M., Predki, P. F., and Schweitzer, B. I. (2003). Analyzing antibody specificity with whole proteome microarrays. *Nat Biotechnol* 21, 1509-1512.
- Mnaimneh, S., Davierwala, A. P., Haynes, J., Moffat, J., Peng, W. T., Zhang, W., Yang, X., Pootoolal, J., Chua, G., Lopez, A., *et al.* (2004). Exploration of essential gene functions via titratable promoter alleles. *Cell* 118, 31-44.
- Mockler, T. C., Chan, S., Sundaresan, A., Chen, H., Jacobsen, S. E., and Ecker, J. R. (2005). Applications of DNA tiling arrays for whole-genome analysis. *Genomics* 85, 1-15.
- Moehring, J. M., and Moehring, T. J. (1988). The post-translational trimethylation of diphthamide studied in vitro. *J Biol Chem* 263, 3840-3844.
- Moehring, J. M., Moehring, T. J., and Danley, D. E. (1980). Posttranslational modification of elongation factor 2 in diphtheria-toxin-resistant mutants of CHO-K1 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 1010-1014.
- Moehring, T. J., Danley, D. E., and Moehring, J. M. (1984). In vitro biosynthesis of diphthamide, studied with mutant Chinese hamster ovary cells resistant to diphtheria toxin. *Mol Cell Biol* 4, 642-650.
- Mohanty, A. K., Mukhopadhyay, U. K., Grover, S., and Batish, V. K. (1999). Bovine chymosin: production by rDNA technology and application in cheese manufacture. *Biotechnol Adv* 17, 205-217.
- Mollapour, M., Fong, D., Balakrishnan, K., Harris, N., Thompson, S., Schuller, C., Kuchler, K., and Piper, P. W. (2004). Screening the yeast deletant mutant collection for hypersensitivity and hyper-resistance to sorbate, a weak organic acid food preservative. *Yeast* 21, 927-946.
- Montpetit, B., Thorne, K., Barrett, I., Andrews, K., Jadusingh, R., Hieter, P., and Measday, V. (2005). Genome-wide synthetic lethal screens identify an interaction between the nuclear envelope protein, Apq12p, and the kinetochore in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 171, 489-501.
- Moran, S. J., Flanagan, J. F. t., Namy, O., Stuart, D. I., Brierley, I., and Gilbert, R. J. (2008). The mechanics of translocation: a molecular "spring-and-ratchet" system. *Structure* 16, 664-672.
- Mueller-Dieckmann, C., Kernstock, S., Lisurek, M., von Kries, J. P., Haag, F., Weiss, M. S., and Koch-Nolte, F. (2006). The structure of human ADP-ribosylhydrolase 3 (ARH3) provides insights into the reversibility of protein ADP-ribosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 15026-15031.
- Muller, H. M., Kenny, E. E., and Sternberg, P. W. (2004). Textpresso: an ontology-based information retrieval and extraction system for biological literature. *PLoS Biol* 2, e309.
- Murthi, A., and Hopper, A. K. (2005). Genome-wide screen for inner nuclear membrane protein targeting in *Saccharomyces cerevisiae*: roles for N-acetylation and an integral membrane protein. *Genetics* 170, 1553-1560.
- Mustacchi, R., Hohmann, S., and Nielsen, J. (2006). Yeast systems biology to unravel the network of life. *Yeast* 23, 227-238.
- Myers, C. L., Robson, D., Wible, A., Hibbs, M. A., Chiriac, C., Theesfeld, C. L., Dolinski, K., and Troyanskaya, O. G. (2005). Discovery of biological networks from diverse functional genomic data. *Genome Biol* 6, R114.
- N**
- Nagalakshmi, U., Wang, Z., Waern, K., Shou, C., Raha, D., Gerstein, M., and Snyder, M. (2008). The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. *Science* 320, 1344-1349.
- Nagao, M., and Sugimura, T. (1976). Molecular biology of the carcinogen, 4-nitroquinoline 1-oxide. *Adv Cancer Res* 23, 131-169.
- Nakahara, W., Fukuoka, F., and Sugimura, T. (1957). Carcinogenic action of 4-nitroquinoline-N-oxide. *Gan* 48, 129-137.
- Namy, O., Moran, S. J., Stuart, D. I., Gilbert, R. J., and Brierley, I. (2006). A mechanical explanation of RNA pseudoknot function in programmed ribosomal frameshifting. *Nature* 441, 244-247.

- Narayanaswamy, R., Niu, W., Scouras, A. D., Hart, G. T., Davies, J., Ellington, A. D., Iyer, V. R., and Marcotte, E. M. (2006). Systematic profiling of cellular phenotypes with spotted cell microarrays reveals mating-pheromone response genes. *Genome Biol* 7, R6.
- Newman, J. R., Ghaemmaghami, S., Ihmels, J., Breslow, D. K., Noble, M., DeRisi, J. L., and Weissman, J. S. (2006). Single-cell proteomic analysis of *S. cerevisiae* reveals the architecture of biological noise. *Nature* 441, 840-846.
- Ng, S. K., Zhang, Z., and Tan, S. H. (2003). Integrative approach for computationally inferring protein domain interactions. *Bioinformatics* 19, 923-929.
- Ni, L., and Snyder, M. (2001). A genomic study of the bipolar bud site selection pattern in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 12, 2147-2170.
- Nielsen, J., and Oliver, S. (2005). The next wave in metabolome analysis. *Trends Biotechnol* 23, 544-546.
- Nierhaus, K. H. (1996). Protein synthesis. An elongation factor turn-on. *Nature* 379, 491-492.
- Nimmegern, E., Fox, T., Fleming, M. A., and Thomson, J. A. (1996). Conformational changes and stabilization of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase associated with ligand binding and inhibition by mycophenolic acid. *J Biol Chem* 271, 19421-19427.
- Nissen, P., Kjeldgaard, M., Thirup, S., Polekhina, G., Reshetnikova, L., Clark, B. F., and Nyborg, J. (1995). Crystal structure of the ternary complex of Phe-tRNAPhe, EF-Tu, and a GTP analog. *Science* 270, 1464-1472.
- Niu, W., Li, Z., Zhan, W., Iyer, V. R., and Marcotte, E. M. (2008). Mechanisms of cell cycle control revealed by a systematic and quantitative overexpression screen in *S. cerevisiae*. *PLoS Genet* 4, e1000120.
- Noller, H. F., Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Baucom, A., and Cate, J. H. (2002). Translocation of tRNA during protein synthesis. *FEBS Lett* 514, 11-16.
- Nunoshiba, T., and Demple, B. (1993). Potent intracellular oxidative stress exerted by the carcinogen 4-nitroquinoline-N-oxide. *Cancer Res* 53, 3250-3252.
- 
- O'Neill, B. M., Hanway, D., Winzeler, E. A., and Romesberg, F. E. (2004). Coordinated functions of WSS1, PSY2 and TOF1 in the DNA damage response. *Nucleic Acids Res* 32, 6519-6530.
- Odds, F. C., Brown, A. J., and Gow, N. A. (2003). Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol* 11, 272-279.
- Ogawa, N., DeRisi, J., and Brown, P. O. (2000). New components of a system for phosphate accumulation and polyphosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by genomic expression analysis. *Mol Biol Cell* 11, 4309-4321.
- Ogle, J. M., and Ramakrishnan, V. (2005). Structural insights into translational fidelity. *Annu Rev Biochem* 74, 129-177.
- Ohya, Y., Sese, J., Yukawa, M., Sano, F., Nakatani, Y., Saito, T. L., Saka, A., Fukuda, T., Ishihara, S., Oka, S., *et al.* (2005). High-dimensional and large-scale phenotyping of yeast mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 19015-19020.
- Ooi, S. L., Pan, X., Peyser, B. D., Ye, P., Meluh, P. B., Yuan, D. S., Irizarry, R. A., Bader, J. S., Spencer, F. A., and Boeke, J. D. (2006). Global synthetic-lethality analysis and yeast functional profiling. *Trends Genet* 22, 56-63.
- Ooi, S. L., Shoemaker, D. D., and Boeke, J. D. (2001). A DNA microarray-based genetic screen for nonhomologous end-joining mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 294, 2552-2556.
- Ooi, S. L., Shoemaker, D. D., and Boeke, J. D. (2003). DNA helicase gene interaction network defined using synthetic lethality analyzed by microarray. *Nat Genet* 35, 277-286.
- Ortiz, P. A., and Kinzy, T. G. (2005). Dominant-negative mutant phenotypes and the regulation of translation elongation factor 2 levels in yeast. *Nucleic Acids Res* 33, 5740-5748.
- Ortiz, P. A., Ulloque, R., Kihara, G. K., Zheng, H., and Kinzy, T. G. (2006). Translation elongation factor 2 anticodon mimicry domain mutants affect fidelity and diphtheria toxin resistance. *J Biol Chem* 281, 32639-32648.

Orton, R. J., Sellers, W. I., and Gerloff, D. L. (2004). YETI: Yeast Exploration Tool Integrator. *Bioinformatics* 20, 284-285.

Ouyang, Z., Takats, Z., Blake, T. A., Gologan, B., Guymon, A. J., Wiseman, J. M., Oliver, J. C., Davisson, V. J., and Cooks, R. G. (2003). Preparing protein microarrays by soft-landing of mass-selected ions. *Science* 301, 1351-1354.

P

Page, N., Gerard-Vincent, M., Menard, P., Beaulieu, M., Azuma, M., Dijkgraaf, G. J., Li, H., Marcoux, J., Nguyen, T., Dowse, T., *et al.* (2003). A *Saccharomyces cerevisiae* genome-wide mutant screen for altered sensitivity to K1 killer toxin. *Genetics* 163, 875-894.

Palmer, E., Wilhelm, J. M., and Sherman, F. (1979). Phenotypic suppression of nonsense mutants in yeast by aminoglycoside antibiotics. *Nature* 277, 148-150.

Pan, X., Ye, P., Yuan, D. S., Wang, X., Bader, J. S., and Boeke, J. D. (2006). A DNA integrity network in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 124, 1069-1081.

Pan, X., Yuan, D. S., Ooi, S. L., Wang, X., Sookhai-Mahadeo, S., Meluh, P., and Boeke, J. D. (2007). dSLAM analysis of genome-wide genetic interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods* 41, 206-221.

Pan, X., Yuan, D. S., Xiang, D., Wang, X., Sookhai-Mahadeo, S., Bader, J. S., Hieter, P., Spencer, F., and Boeke, J. D. (2004). A robust toolkit for functional profiling of the yeast genome. *Mol Cell* 16, 487-496.

Panavas, T., Serviene, E., Brasher, J., and Nagy, P. D. (2005). Yeast genome-wide screen reveals dissimilar sets of host genes affecting replication of RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 7326-7331.

Pappenheimer, A. M., Jr., Dunlop, P. C., Adolph, K. W., and Bodley, J. W. (1983). Occurrence of diphthamide in archaebacteria. *J Bacteriol* 153, 1342-1347.

Parsons, A. B., Brost, R. L., Ding, H., Li, Z., Zhang, C., Sheikh, B., Brown, G. W., Kane, P. M., Hughes, T. R., and Boone, C. (2004). Integration of chemical-genetic and genetic interaction data links bioactive compounds to cellular target pathways. *Nat Biotechnol* 22, 62-69.

Parsons, A. B., Lopez, A., Givoni, I. E., Williams, D. E., Gray, C. A., Porter, J., Chua, G., Sopko, R., Brost, R. L., Ho, C. H., *et al.* (2006). Exploring the mode-of-action of bioactive compounds by chemical-genetic profiling in yeast. *Cell* 126, 611-625.

Pasteur, L. (1872). Nouvelles experiences pour demontrer que le germe de la levure qui fait le vin provient de 1-exterieur des grains de raisin. *Comptes Rendus de l'Academie des Science de Paris* 75, 781-796.

Patel, O., Satchell, J., Baell, J., Fernley, R., Coloe, P., and Macreadie, I. (2003). Inhibition studies of sulfonamide-containing folate analogs in yeast. *Microb Drug Resist* 9, 139-146.

Patterson, S. D., and Aebersold, R. H. (2003). Proteomics: the first decade and beyond. *Nat Genet* 33 *Suppl*, 311-323.

Pellegrini, M., Marcotte, E. M., Thompson, M. J., Eisenberg, D., and Yeates, T. O. (1999). Assigning protein functions by comparative genome analysis: protein phylogenetic profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4285-4288.

Pena-Castillo, L., and Hughes, T. R. (2007). Why are there still over 1000 uncharacterized yeast genes? *Genetics* 176, 7-14.

Perkins, E., Sun, D., Nguyen, A., Tulac, S., Francesco, M., Tavana, H., Nguyen, H., Tugendreich, S., Barthmaier, P., Couto, J., *et al.* (2001). Novel inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase/PARP1 and PARP2 identified using a cell-based screen in yeast. *Cancer Res* 61, 4175-4183.

Phan, L. D., Perentesis, J. P., and Bodley, J. W. (1993). *Saccharomyces cerevisiae* elongation factor 2. Mutagenesis of the histidine precursor of diphthamide yields a functional protein that is resistant to diphtheria toxin. *J Biol Chem* 268, 8665-8668.

Pierce, S. E., Fung, E. L., Jaramillo, D. F., Chu, A. M., Davis, R. W., Nislow, C., and Giaever, G. (2006). A unique and universal molecular barcode array. *Nat Methods* 3, 601-603.

Pilpel, Y., Sudarsanam, P., and Church, G. M. (2001). Identifying regulatory networks by combinatorial analysis of promoter elements. *Nat Genet* 29, 153-159.

- Poehlsgaard, J., and Douthwaite, S. (2005). The bacterial ribosome as a target for antibiotics. *Nat Rev Microbiol* 3, 870-881.
- Pokholok, D. K., Harbison, C. T., Levine, S., Cole, M., Hannett, N. M., Lee, T. I., Bell, G. W., Walker, K., Rolfe, P. A., Herbolzheimer, E., *et al.* (2005). Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell* 122, 517-527.
- Ponting, C. P., Schultz, J., Milpetz, F., and Bork, P. (1999). SMART: identification and annotation of domains from signalling and extracellular protein sequences. *Nucleic Acids Res* 27, 229-232.
- Powers, T., and Walter, P. (1999). Regulation of ribosome biogenesis by the rapamycin-sensitive TOR-signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 10, 987-1000.
- Prakash, S., Sung, P., and Prakash, L. (1993). DNA repair genes and proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet* 27, 33-70.
- Pratt, J. M., Petty, J., Riba-Garcia, I., Robertson, D. H., Gaskell, S. J., Oliver, S. G., and Beynon, R. J. (2002). Dynamics of protein turnover, a missing dimension in proteomics. *Mol Cell Proteomics* 1, 579-591.
- Proszynski, T. J., Klemm, R. W., Gravert, M., Hsu, P. P., Gloor, Y., Wagner, J., Kozak, K., Grabner, H., Walzer, K., Bagnat, M., *et al.* (2005). A genome-wide visual screen reveals a role for sphingolipids and ergosterol in cell surface delivery in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 17981-17986.
- Proud, C. G. (2004). mTOR-mediated regulation of translation factors by amino acids. *Biochem Biophys Res Commun* 313, 429-436.
- Ptacek, J., Devgan, G., Michaud, G., Zhu, H., Zhu, X., Fasolo, J., Guo, H., Jona, G., Breitkreutz, A., Sopko, R., *et al.* (2005). Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature* 438, 679-684.

Q

- Qiu, Y., Fairbanks, L. D., Ruckermann, K., Hawrlowicz, C. M., Richards, D. F., Kirschbaum, B., and Simmonds, H. A. (2000). Mycophenolic acid-induced GTP depletion also affects ATP and pyrimidine synthesis in mitogen-stimulated primary human T-lymphocytes. *Transplantation* 69, 890-897.

R

- Raamsdonk, L. M., Teusink, B., Broadhurst, D., Zhang, N., Hayes, A., Walsh, M. C., Berden, J. A., Brindle, K. M., Kell, D. B., Rowland, J. J., *et al.* (2001). A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations. *Nat Biotechnol* 19, 45-50.
- Ramachandran, N., Hainsworth, E., Bhullar, B., Eisenstein, S., Rosen, B., Lau, A. Y., Walter, J. C., and LaBaer, J. (2004). Self-assembling protein microarrays. *Science* 305, 86-90.
- Ramakrishnan, V. (2002). Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell* 108, 557-572.
- Ramakrishnan, V. (2008). What we have learned from ribosome structures. *Biochem Soc Trans* 36, 567-574.
- Ramani, A. K., and Marcotte, E. M. (2003). Exploiting the co-evolution of interacting proteins to discover interaction specificity. *J Mol Biol* 327, 273-284.
- Rand, J. D., and Grant, C. M. (2006). The thioredoxin system protects ribosomes against stress-induced aggregation. *Mol Biol Cell* 17, 387-401.
- Rao, S. S., and Grollman, A. P. (1967). Cycloheximide resistance in yeast: a property of the 60s ribosomal subunit. *Biochem Biophys Res Commun* 29, 696-704.
- Ravid, T., Kreft, S. G., and Hochstrasser, M. (2006). Membrane and soluble substrates of the Doa10 ubiquitin ligase are degraded by distinct pathways. *Embo J* 25, 533-543.
- Remm, M., Storm, C. E., and Sonnhammer, E. L. (2001). Automatic clustering of orthologs and in-paralogs from pairwise species comparisons. *J Mol Biol* 314, 1041-1052.
- Riles, L., Shaw, R. J., Johnston, M., and Reines, D. (2004). Large-scale screening of yeast mutants for sensitivity to the IMP dehydrogenase inhibitor 6-azauracil. *Yeast* 21, 241-248.
- Rine, J., Hansen, W., Hardeman, E., and Davis, R. W. (1983). Targeted selection of recombinant clones through gene dosage effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 6750-6754.
- Robinson, M. D., Grigull, J., Mohammad, N., and Hughes, T. R. (2002). FunSpec: a web-based cluster interpreter for yeast. *BMC Bioinformatics* 3, 35.

- Robyr, D., Suka, Y., Xenarios, I., Kurdistani, S. K., Wang, A., Suka, N., and Grunstein, M. (2002). Microarray deacetylation maps determine genome-wide functions for yeast histone deacetylases. *Cell* **109**, 437-446.
- Rodnina, M. V., Savelsbergh, A., Katunin, V. I., and Wintermeyer, W. (1997). Hydrolysis of GTP by elongation factor G drives tRNA movement on the ribosome. *Nature* **385**, 37-41.
- Rodriguez-Suarez, R., Xu, D., Veillette, K., Davison, J., Sillaots, S., Kauffman, S., Hu, W., Bowman, J., Martel, N., Trosok, S., *et al.* (2007). Mechanism-of-action determination of GMP synthase inhibitors and target validation in *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Chem Biol* **14**, 1163-1175.
- Roguev, A., Wiren, M., Weissman, J. S., and Krogan, N. J. (2007). High-throughput genetic interaction mapping in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat Methods* **4**, 861-866.
- Ross-Macdonald, P., Coelho, P. S., Roemer, T., Agarwal, S., Kumar, A., Jansen, R., Cheung, K. H., Sheehan, A., Symoniatis, D., Umansky, L., *et al.* (1999). Large-scale analysis of the yeast genome by transposon tagging and gene disruption. *Nature* **402**, 413-418.
- Ross-Macdonald, P., Sheehan, A., Roeder, G. S., and Snyder, M. (1997). A multipurpose transposon system for analyzing protein production, localization, and function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 190-195.
- Rothstein, R. (1991). Targeting, disruption, replacement, and allele rescue: integrative DNA transformation in yeast. *Methods Enzymol* **194**, 281-301.
- Ruiz-Echevarria, M. J., Yasenchak, J. M., Han, X., Dinman, J. D., and Peltz, S. W. (1998). The upf3 protein is a component of the surveillance complex that monitors both translation and mRNA turnover and affects viral propagation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8721-8726.
- S**
- Saeed, A. I., Sharov, V., White, J., Li, J., Liang, W., Bhagabati, N., Braisted, J., Klapa, M., Currier, T., Thiagarajan, M., *et al.* (2003). TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* **34**, 374-378.
- Sagot, I., Schaeffer, J., and Daignan-Fornier, B. (2005). Guanylic nucleotide starvation affects *Saccharomyces cerevisiae* mother-daughter separation and may be a signal for entry into quiescence. *BMC Cell Biol* **6**, 24.
- Said, M. R., Begley, T. J., Oppenheim, A. V., Lauffenburger, D. A., and Samson, L. D. (2004). Global network analysis of phenotypic effects: protein networks and toxicity modulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 18006-18011.
- Saini, P., Eyler, D. E., Green, R., and Dever, T. E. (2009). Hypusine-containing protein eIF5A promotes translation elongation. *Nature* **459**, 118-121.
- Saito, T. L., Ohtani, M., Sawai, H., Sano, F., Saka, A., Watanabe, D., Yukawa, M., Ohya, Y., and Morishita, S. (2004). SCMD: *Saccharomyces cerevisiae* Morphological Database. *Nucleic Acids Res* **32**, D319-322.
- Sambade, M., Alba, M., Smardon, A. M., West, R. W., and Kane, P. M. (2005). A genomic screen for yeast vacuolar membrane ATPase mutants. *Genetics* **170**, 1539-1551.
- Sambrook, J., and Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning : a laboratory manual*, 3rd edn (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Samuel, D. (1996). Investigation of Ancient Egyptian Baking and Brewing Methods by Correlative Microscopy. *Science* **273**, 488-490.
- Santos, C., and Ballesta, J. P. (2002). Role of the ribosomal stalk components in the resistance of *Aspergillus fumigatus* to the sordarin antifungals. *Mol Microbiol* **43**, 227-237.
- Santos, C., Rodriguez-Gabriel, M. A., Remacha, M., and Ballesta, J. P. (2004). Ribosomal P0 protein domain involved in selectivity of antifungal sordarin derivatives. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 2930-2936.
- Sarin, S., Ross, K. E., Boucher, L., Green, Y., Tyers, M., and Cohen-Fix, O. (2004). Uncovering novel cell cycle players through the inactivation of securin in budding yeast. *Genetics* **168**, 1763-1771.
- Savelsbergh, A., Matassova, N. B., Rodnina, M. V., and Wintermeyer, W. (2000). Role of domains 4 and 5 in elongation factor G functions on the ribosome. *J Mol Biol* **300**, 951-961.

- Scherens, B., and Goffeau, A. (2004). The uses of genome-wide yeast mutant collections. *Genome Biol* 5, 229.
- Schlitt, T., Palin, K., Rung, J., Dietmann, S., Lappe, M., Ukkonen, E., and Brazma, A. (2003). From gene networks to gene function. *Genome Res* 13, 2568-2576.
- Schreiber, S. L. (2005). Small molecules: the missing link in the central dogma. *Nat Chem Biol* 1, 64-66.
- Schuldiner, M., Collins, S. R., Thompson, N. J., Denic, V., Bhamidipati, A., Punna, T., Ihmels, J., Andrews, B., Boone, C., Greenblatt, J. F., *et al.* (2005). Exploration of the function and organization of the yeast early secretory pathway through an epistatic miniarray profile. *Cell* 123, 507-519.
- Schuler, G. D., Epstein, J. A., Ohkawa, H., and Kans, J. A. (1996). Entrez: molecular biology database and retrieval system. *Methods Enzymol* 266, 141-162.
- Sciorra, V. A., Audhya, A., Parsons, A. B., Segev, N., Boone, C., and Emr, S. D. (2005). Synthetic genetic array analysis of the PtdIns 4-kinase Pik1p identifies components in a Golgi-specific Ypt31/rab-GTPase signaling pathway. *Mol Biol Cell* 16, 776-793.
- Segre, D., Deluna, A., Church, G. M., and Kishony, R. (2005). Modular epistasis in yeast metabolism. *Nat Genet* 37, 77-83.
- Sengupta, J., Nilsson, J., Gursky, R., Kjeldgaard, M., Nissen, P., and Frank, J. (2008). Visualization of the eEF2-80S ribosome transition-state complex by cryo-electron microscopy. *J Mol Biol* 382, 179-187.
- Serrano, R., Bernal, D., Simon, E., and Arino, J. (2004). Copper and iron are the limiting factors for growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in an alkaline environment. *J Biol Chem* 279, 19698-19704.
- Service, R. F. (2006). Gene sequencing. The race for the \$1000 genome. *Science* 311, 1544-1546.
- Serviene, E., Jiang, Y., Cheng, C. P., Baker, J., and Nagy, P. D. (2006). Screening of the yeast yTHC collection identifies essential host factors affecting tombusvirus RNA recombination. *J Virol* 80, 1231-1241.
- Serviene, E., Shapka, N., Cheng, C. P., Panavas, T., Phuangrat, B., Baker, J., and Nagy, P. D. (2005). Genome-wide screen identifies host genes affecting viral RNA recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 10545-10550.
- Shalon, D., Smith, S. J., and Brown, P. O. (1996). A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res* 6, 639-645.
- Shamir, R., Maron-Katz, A., Tanay, A., Linhart, C., Steinfeld, I., Sharan, R., Shiloh, Y., and Elkon, R. (2005). EXPANDER--an integrative program suite for microarray data analysis. *BMC Bioinformatics* 6, 232.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., and Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 13, 2498-2504.
- Sharan, R., and Ideker, T. (2006). Modeling cellular machinery through biological network comparison. *Nat Biotechnol* 24, 427-433.
- Sharan, R., Ideker, T., Kelley, B., Shamir, R., and Karp, R. M. (2005a). Identification of protein complexes by comparative analysis of yeast and bacterial protein interaction data. *J Comput Biol* 12, 835-846.
- Sharan, R., Suthram, S., Kelley, R. M., Kuhn, T., McCuine, S., Uetz, P., Sittler, T., Karp, R. M., and Ideker, T. (2005b). Conserved patterns of protein interaction in multiple species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 1974-1979.
- Shastry, M., Nielsen, J., Ku, T., Hsu, M. J., Liberator, P., Anderson, J., Schmatz, D., and Justice, M. C. (2001). Species-specific inhibition of fungal protein synthesis by sordarin: identification of a sordarin-specificity region in eukaryotic elongation factor 2. *Microbiology* 147, 383-390.
- Shendure, J., Porreca, G. J., Reppas, N. B., Lin, X., McCutcheon, J. P., Rosenbaum, A. M., Wang, M. D., Zhang, K., Mitra, R. D., and Church, G. M. (2005). Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome. *Science* 309, 1728-1732.
- Sherlock, G., Hernandez-Boussard, T., Kasarskis, A., Binkley, G., Matese, J. C., Dwight, S. S., Kaloper, M., Weng, S., Jin, H., Ball, C. A., *et al.* (2001). The Stanford Microarray Database. *Nucleic Acids Res* 29, 152-155.
- Shoemaker, D. D., Lashkari, D. A., Morris, D., Mittmann, M., and Davis, R. W. (1996). Quantitative phenotypic analysis of yeast deletion mutants using a highly parallel molecular bar-coding strategy. *Nat Genet* 14, 450-456.
- Sigg, H. P., and Stoll, C. (1969). Antibiotic SL 2266 (United States Patent).

- Sikorski, R. S., and Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *122*, 19-27.
- Sinclair, D. A., Mills, K., and Guarente, L. (1997). Accelerated aging and nucleolar fragmentation in yeast *sgs1* mutants. *Science* *277*, 1313-1316.
- Singh, A., Ursic, D., and Davies, J. (1979). Phenotypic suppression and misreading *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* *277*, 146-148.
- Slessareva, J. E., Routt, S. M., Temple, B., Bankaitis, V. A., and Dohlman, H. G. (2006). Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase Vps34 by a G protein alpha subunit at the endosome. *Cell* *126*, 191-203.
- Smith, J. J., Sydorokyy, Y., Marelli, M., Hwang, D., Bolouri, H., Rachubinski, R. A., and Aitchison, J. D. (2006). Expression and functional profiling reveal distinct gene classes involved in fatty acid metabolism. *Mol Syst Biol* *2*, 2006 0009.
- Smith, S., Hwang, J. Y., Banerjee, S., Majeed, A., Gupta, A., and Myung, K. (2004). Mutator genes for suppression of gross chromosomal rearrangements identified by a genome-wide screening in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 9039-9044.
- Smith, V., Botstein, D., and Brown, P. O. (1995). Genetic footprinting: a genomic strategy for determining a gene's function given its sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 6479-6483.
- Soe, R., Mosley, R. T., Justice, M., Nielsen-Kahn, J., Shastry, M., Merrill, A. R., and Andersen, G. R. (2007). Sordarin derivatives induce a novel conformation of the yeast ribosome translocation factor eEF2. *J Biol Chem* *282*, 657-666.
- Sonnhammer, E. L., Eddy, S. R., and Durbin, R. (1997). Pfam: a comprehensive database of protein domain families based on seed alignments. *Proteins* *28*, 405-420.
- Sopko, R., Huang, D., Preston, N., Chua, G., Papp, B., Kafadar, K., Snyder, M., Oliver, S. G., Cyert, M., Hughes, T. R., *et al.* (2006). Mapping pathways and phenotypes by systematic gene overexpression. *Mol Cell* *21*, 319-330.
- Spahn, C. M., Gomez-Lorenzo, M. G., Grassucci, R. A., Jorgensen, R., Andersen, G. R., Beckmann, R., Penczek, P. A., Ballesta, J. P., and Frank, J. (2004). Domain movements of elongation factor eEF2 and the eukaryotic 80S ribosome facilitate tRNA translocation. *Embo J* *23*, 1008-1019.
- Spahn, C. M., and Nierhaus, K. H. (1998). Models of the elongation cycle: an evaluation. *Biol Chem* *379*, 753-772.
- St Onge, R. P., Mani, R., Oh, J., Proctor, M., Fung, E., Davis, R. W., Nislow, C., Roth, F. P., and Giaever, G. (2007). Systematic pathway analysis using high-resolution fitness profiling of combinatorial gene deletions. *Nat Genet* *39*, 199-206.
- Stansfield, I., Akhmaloka, and Tuite, M. F. (1995). A mutant allele of the SUP45 (SAL4) gene of *Saccharomyces cerevisiae* shows temperature-dependent allosuppressor and omnipotent suppressor phenotypes. *Curr Genet* *27*, 417-426.
- Stearns, T., Hoyt, M. A., and Botstein, D. (1990). Yeast mutants sensitive to antimicrotubule drugs define three genes that affect microtubule function. *Genetics* *124*, 251-262.
- Stein, L., Sternberg, P., Durbin, R., Thierry-Mieg, J., and Spieth, J. (2001). WormBase: network access to the genome and biology of *Caenorhabditis elegans*. *Nucleic Acids Res* *29*, 82-86.
- Steinmetz, L. M., Scharfe, C., Deutschbauer, A. M., Mokranjac, D., Herman, Z. S., Jones, T., Chu, A. M., Giaever, G., Prokisch, H., Oefner, P. J., and Davis, R. W. (2002). Systematic screen for human disease genes in yeast. *Nat Genet* *31*, 400-404.
- Steitz, T. A. (2008). A structural understanding of the dynamic ribosome machine. *Nat Rev Mol Cell Biol* *9*, 242-253.
- Stepchenkova, E. I., Kozmin, S. G., Alenin, V. V., and Pavlov, Y. I. (2005). Genome-wide screening for genes whose deletions confer sensitivity to mutagenic purine base analogs in yeast. *BMC Genet* *6*, 31.
- Steuer, R., Kurths, J., Fiehn, O., and Weckwerth, W. (2003). Observing and interpreting correlations in metabolomic networks. *Bioinformatics* *19*, 1019-1026.
- Stocklein, W., and Piepersberg, W. (1980). Binding of cycloheximide to ribosomes from wild-type and mutant strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob Agents Chemother* *18*, 863-867.

- Stuart, J. M., Segal, E., Koller, D., and Kim, S. K. (2003). A gene-coexpression network for global discovery of conserved genetic modules. *Science* 302, 249-255.
- Sutcliffe, J. A. (2005). Improving on nature: antibiotics that target the ribosome. *Curr Opin Microbiol* 8, 534-542.
- Svejstrup, J. Q. (2007). Elongator complex: how many roles does it play? *Curr Opin Cell Biol* 19, 331-336.
- Tabuchi, M., Audhya, A., Parsons, A. B., Boone, C., and Emr, S. D. (2006). The phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and TORC2 binding proteins Slm1 and Slm2 function in sphingolipid regulation. *Mol Cell Biol* 26, 5861-5875.
- Tada, M., and Tada, M. (1976). Main binding sites of the carcinogen, 4-nitroquinoline 1-oxide in nucleic acids. *Biochim Biophys Acta* 454, 558-566.
- Tamura, T., and Picciano, M. F. (2006). Folate and human reproduction. *Am J Clin Nutr* 83, 993-1016.
- Tanabe, L., Scherf, U., Smith, L. H., Lee, J. K., Hunter, L., and Weinstein, J. N. (1999). MedMiner: an Internet text-mining tool for biomedical information, with application to gene expression profiling. *Biotechniques* 27, 1210-1214, 1216-1217.
- Tanay, A., Sharan, R., Kupiec, M., and Shamir, R. (2004). Revealing modularity and organization in the yeast molecular network by integrated analysis of highly heterogeneous genomewide data. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2981-2986.
- Taylor, D. J., Nilsson, J., Merrill, A. R., Andersen, G. R., Nissen, P., and Frank, J. (2007). Structures of modified eEF2 80S ribosome complexes reveal the role of GTP hydrolysis in translocation. *Embo J* 26, 2421-2431.
- Teixeira, M. C., Monteiro, P., Jain, P., Tenreiro, S., Fernandes, A. R., Mira, N. P., Alenquer, M., Freitas, A. T., Oliveira, A. L., and Sa-Correia, I. (2006). The YEASTRACT database: a tool for the analysis of transcription regulatory associations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 34, D446-451.
- Thevissen, K., Idkowiak-Baldys, J., Im, Y. J., Takemoto, J., Francois, I. E., Ferket, K. K., Aerts, A. M., Meert, E. M., Winderickx, J., Roosen, J., and Cammue, B. P. (2005). SKN1, a novel plant defensin-sensitivity gene in *Saccharomyces cerevisiae*, is implicated in sphingolipid biosynthesis. *FEBS Lett* 579, 1973-1977.
- Thorpe, G. W., Fong, C. S., Alic, N., Higgins, V. J., and Dawes, I. W. (2004). Cells have distinct mechanisms to maintain protection against different reactive oxygen species: oxidative-stress-response genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 6564-6569.
- Tilstone, C. (2003). DNA microarrays: vital statistics. *Nature* 424, 610-612.
- Tong, A. H., Evangelista, M., Parsons, A. B., Xu, H., Bader, G. D., Page, N., Robinson, M., Raghibizadeh, S., Hogue, C. W., Bussey, H., *et al.* (2001). Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants. *Science* 294, 2364-2368.
- Tong, A. H., Lesage, G., Bader, G. D., Ding, H., Xu, H., Xin, X., Young, J., Berriz, G. F., Brost, R. L., Chang, M., *et al.* (2004). Global mapping of the yeast genetic interaction network. *Science* 303, 808-813.
- Tu, B. P., Kudlicki, A., Rowicka, M., and McKnight, S. L. (2005). Logic of the yeast metabolic cycle: temporal compartmentalization of cellular processes. *Science* 310, 1152-1158.
- Tucker, C. L., and Fields, S. (2001). A yeast sensor of ligand binding. *Nat Biotechnol* 19, 1042-1046.
- Tucker, C. L., and Fields, S. (2003). Lethal combinations. *Nat Genet* 35, 204-205.
- Tucker, C. L., and Fields, S. (2004). Quantitative genome-wide analysis of yeast deletion strain sensitivities to oxidative and chemical stress. *Comp Funct Genom* 5, 216-224.
- Typas, A., Nichols, R. J., Siegele, D. A., Shales, M., Collins, S. R., Lim, B., Braberg, H., Yamamoto, N., Takeuchi, R., Wanner, B. L., *et al.* (2008). High-throughput, quantitative analyses of genetic interactions in *E. coli*. *Nat Methods*.

U

Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., Mansfield, T. A., Judson, R. S., Knight, J. R., Lockshon, D., Narayan, V., Srinivasan, M., Pochart, P., *et al.* (2000). A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* *403*, 623-627.

V

Valencia, A., and Pazos, F. (2002). Computational methods for the prediction of protein interactions. *Curr Opin Struct Biol* *12*, 368-373.

Valente, L., and Kinzy, T. G. (2003). Yeast as a sensor of factors affecting the accuracy of protein synthesis. *Cell Mol Life Sci* *60*, 2115-2130.

Van Ness, B. G., Howard, J. B., and Bodley, J. W. (1980). ADP-ribosylation of elongation factor 2 by diphtheria toxin. Isolation and properties of the novel ribosyl-amino acid and its hydrolysis products. *J Biol Chem* *255*, 10717-10720.

van Voorst, F., Houghton-Larsen, J., Jonson, L., Kielland-Brandt, M. C., and Brandt, A. (2006). Genome-wide identification of genes required for growth of *Saccharomyces cerevisiae* under ethanol stress. *Yeast* *23*, 351-359.

Vaughan-Martini, A., and Martini, A. (1995). Facts, myths and legends on the prime industrial microorganism. *J Ind Microbiol* *14*, 514-522.

Vazquez, A., Flammini, A., Maritan, A., and Vespignani, A. (2003). Global protein function prediction from protein-protein interaction networks. *Nat Biotechnol* *21*, 697-700.

Velculescu, V. E., Zhang, L., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (1995). Serial analysis of gene expression. *Science* *270*, 484-487.

Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., *et al.* (2001). The sequence of the human genome. *Science* *291*, 1304-1351.

Vidal, M., Brachmann, R. K., Fattaey, A., Harlow, E., and Boeke, J. D. (1996). Reverse two-hybrid and one-hybrid systems to detect dissociation of protein-protein and DNA-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 10315-10320.

Villas-Boas, S. G., Moxley, J. F., Akesson, M., Stephanopoulos, G., and Nielsen, J. (2005). High-throughput metabolic state analysis: the missing link in integrated functional genomics of yeasts. *Biochem J* *388*, 669-677.

von Mering, C., Krause, R., Snel, B., Cornell, M., Oliver, S. G., Fields, S., and Bork, P. (2002). Comparative assessment of large-scale data sets of protein-protein interactions. *Nature* *417*, 399-403.

Vottero, E., Balgi, A., Woods, K., Tugendreich, S., Melese, T., Andersen, R. J., Mauk, A. G., and Roberge, M. (2006). Inhibitors of human indoleamine 2,3-dioxygenase identified with a target-based screen in yeast. *Biotechnol J* *1*, 282-288.

W

Wade, C. H., Umbarger, M. A., and McAlear, M. A. (2006). The budding yeast rRNA and ribosome biosynthesis (RRB) regulon contains over 200 genes. *Yeast* *23*, 293-306.

Wang, J., Wang, X., Fang, Y., and Zhou, B. (2007). Genome-wide screening of yeast metal homeostasis genes involved in mitochondrial functions. *Mol Genet Genomics* *277*, 673-683.

Wang, X., and Proud, C. G. (2006). The mTOR pathway in the control of protein synthesis. *Physiology (Bethesda)* *21*, 362-369.

Ward, J. H. (1963). Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function. *J Am Statist Assoc* *58*, 236-244.

Warren, C. D., Eckley, D. M., Lee, M. S., Hanna, J. S., Hughes, A., Peyser, B., Jie, C., Irizarry, R., and Spencer, F. A. (2004). S-phase checkpoint genes safeguard high-fidelity sister chromatid cohesion. *Mol Biol Cell* *15*, 1724-1735.

- Warringer, J., Ericson, E., Fernandez, L., Nerman, O., and Blomberg, A. (2003). High-resolution yeast phenomics resolves different physiological features in the saline response. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 15724-15729.
- Watkins, S. M., and German, J. B. (2002). Metabolomics and biochemical profiling in drug discovery and development. *Curr Opin Mol Ther* *4*, 224-228.
- Webb, T. R., Cross, S. H., McKie, L., Edgar, R., Vizor, L., Harrison, J., Peters, J., and Jackson, I. J. (2008). Diphthamide modification of eEF2 requires a J-domain protein and is essential for normal development. *J Cell Sci* *121*, 3140-3145.
- Weckwerth, W., and Morgenthal, K. (2005). Metabolomics: from pattern recognition to biological interpretation. *Drug Discov Today* *10*, 1551-1558.
- Wheeler, R. T., and Fink, G. R. (2006). A drug-sensitive genetic network masks fungi from the immune system. *PLoS Pathog* *2*, e35.
- Willingham, S., Outeiro, T. F., DeVit, M. J., Lindquist, S. L., and Muchowski, P. J. (2003). Yeast genes that enhance the toxicity of a mutant huntingtin fragment or alpha-synuclein. *Science* *302*, 1769-1772.
- Wilson, B., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Cairns, B. R. (2006). The RSC chromatin remodeling complex bears an essential fungal-specific protein module with broad functional roles. *Genetics* *172*, 795-809.
- Wilson, K. S., and Noller, H. F. (1998). Mapping the position of translational elongation factor EF-G in the ribosome by directed hydroxyl radical probing. *Cell* *92*, 131-139.
- Wilson, W. A., Wang, Z., and Roach, P. J. (2002). Systematic identification of the genes affecting glycogen storage in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: implication of the vacuole as a determinant of glycogen level. *Mol Cell Proteomics* *1*, 232-242.
- Wingender, E., Dietze, P., Karas, H., and Knuppel, R. (1996). TRANSFAC: a database on transcription factors and their DNA binding sites. *Nucleic Acids Res* *24*, 238-241.
- Winzeler, E. A., Shoemaker, D. D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J. D., Bussey, H., *et al.* (1999). Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* *285*, 901-906.
- Wolfe, K. (2004). Evolutionary genomics: yeasts accelerate beyond BLAST. *Curr Biol* *14*, R392-394.
- Wong, S. L., Zhang, L. V., Tong, A. H., Li, Z., Goldberg, D. S., King, O. D., Lesage, G., Vidal, M., Andrews, B., Bussey, H., *et al.* (2004). Combining biological networks to predict genetic interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 15682-15687.
- Woolstencroft, R. N., Beilharz, T. H., Cook, M. A., Preiss, T., Durocher, D., and Tyers, M. (2006). Ccr4 contributes to tolerance of replication stress through control of CRT1 mRNA poly(A) tail length. *J Cell Sci* *119*, 5178-5192.
- Wright, R., Parrish, M. L., Cadera, E., Larson, L., Matson, C. K., Garrett-Engele, P., Armour, C., Lum, P. Y., and Shoemaker, D. D. (2003). Parallel analysis of tagged deletion mutants efficiently identifies genes involved in endoplasmic reticulum biogenesis. *Yeast* *20*, 881-892.
- Wu, H. I., Brown, J. A., Dorie, M. J., Lazzeroni, L., and Brown, J. M. (2004). Genome-wide identification of genes conferring resistance to the anticancer agents cisplatin, oxaliplatin, and mitomycin C. *Cancer Res* *64*, 3940-3948.
- Wuster, A., and Madan Babu, M. (2008). Chemogenomics and biotechnology. *Trends Biotechnol* *26*, 252-258.
- Wyrick, J. J., Aparicio, J. G., Chen, T., Barnett, J. D., Jennings, E. G., Young, R. A., Bell, S. P., and Aparicio, O. M. (2001). Genome-wide distribution of ORC and MCM proteins in *S. cerevisiae*: high-resolution mapping of replication origins. *Science* *294*, 2357-2360.
- Xenarios, I., Rice, D. W., Salwinski, L., Baron, M. K., Marcotte, E. M., and Eisenberg, D. (2000). DIP: the database of interacting proteins. *Nucleic Acids Res* *28*, 289-291.
- Xie, M. W., Jin, F., Hwang, H., Hwang, S., Anand, V., Duncan, M. C., and Huang, J. (2005). Insights into TOR function and rapamycin response: chemical genomic profiling by using a high-density cell array method. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 7215-7220.



Xu, C. W. (2002). High-density cell microarrays for parallel functional determinations. *Genome Res* 12, 482-486.

Xu, D., Jiang, B., Ketela, T., Lemieux, S., Veillette, K., Martel, N., Davison, J., Sillaots, S., Trosok, S., Bachewich, C., *et al.* (2007). Genome-wide fitness test and mechanism-of-action studies of inhibitory compounds in *Candida albicans*. *PLoS Pathog* 3, e92.



Yadav, J., Muend, S., Zhang, Y., and Rao, R. (2007). A phenomics approach in yeast links proton and calcium pump function in the Golgi. *Mol Biol Cell* 18, 1480-1489.

Yamada, T., Kanehisa, M., and Goto, S. (2006). Extraction of phylogenetic network modules from the metabolic network. *BMC Bioinformatics* 7, 130.

Yamamoto, K., Inoue, S., and Kawanishi, S. (1993). Site-specific DNA damage and 8-hydroxydeoxyguanosine formation by hydroxylamine and 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide in the presence of Cu(II): role of active oxygen species. *Carcinogenesis* 14, 1397-1401.

Yan, Z., Costanzo, M., Heisler, L. E., Paw, J., Kaper, F., Andrews, B. J., Boone, C., Giaever, G., and Nislow, C. (2008). Yeast Barcoders: a chemogenomic application of a universal donor-strain collection carrying bar-code identifiers. *Nat Methods* 5, 719-725.

Yates, S. P., Jorgensen, R., Andersen, G. R., and Merrill, A. R. (2006). Stealth and mimicry by deadly bacterial toxins. *Trends Biochem Sci* 31, 123-133.

Ye, P., Peyser, B. D., Pan, X., Boeke, J. D., Spencer, F. A., and Bader, J. S. (2005). Gene function prediction from congruent synthetic lethal interactions in yeast. *Mol Syst Biol* 1, 2005 0026.

Yonath, A. (2005). Antibiotics targeting ribosomes: resistance, selectivity, synergism and cellular regulation. *Annu Rev Biochem* 74, 649-679.

Yoshimoto, H., Saltsman, K., Gasch, A. P., Li, H. X., Ogawa, N., Botstein, D., Brown, P. O., and Cyert, M. S. (2002). Genome-wide analysis of gene expression regulated by the calcineurin/Crz1p signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 277, 31079-31088.

Yu, L., Pena Castillo, L., Mnaimneh, S., Hughes, T. R., and Brown, G. W. (2006). A survey of essential gene function in the yeast cell division cycle. *Mol Biol Cell* 17, 4736-4747.

Yuen, K. W., Warren, C. D., Chen, O., Kwok, T., Hieter, P., and Spencer, F. A. (2007). Systematic genome instability screens in yeast and their potential relevance to cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 3925-3930.



Zabel, R., Bar, C., Mehlgarten, C., and Schaffrath, R. (2008). Yeast alpha-tubulin suppressor Ats1/Kti13 relates to the Elongator complex and interacts with Elongator partner protein Kti11. *Mol Microbiol* 69, 175-187.

Zakrzewska, A., Boorsma, A., Delneri, D., Brul, S., Oliver, S. G., and Klis, F. M. (2007). Cellular processes and pathways that protect *Saccharomyces cerevisiae* cells against the plasma membrane-perturbing compound chitosan. *Eukaryot Cell* 6, 600-608.

Zanzoni, A., Montecchi-Palazzi, L., Quondam, M., Ausiello, G., Helmer-Citterich, M., and Cesareni, G. (2002). MINT: a Molecular INTeraction database. *FEBS Lett* 513, 135-140.

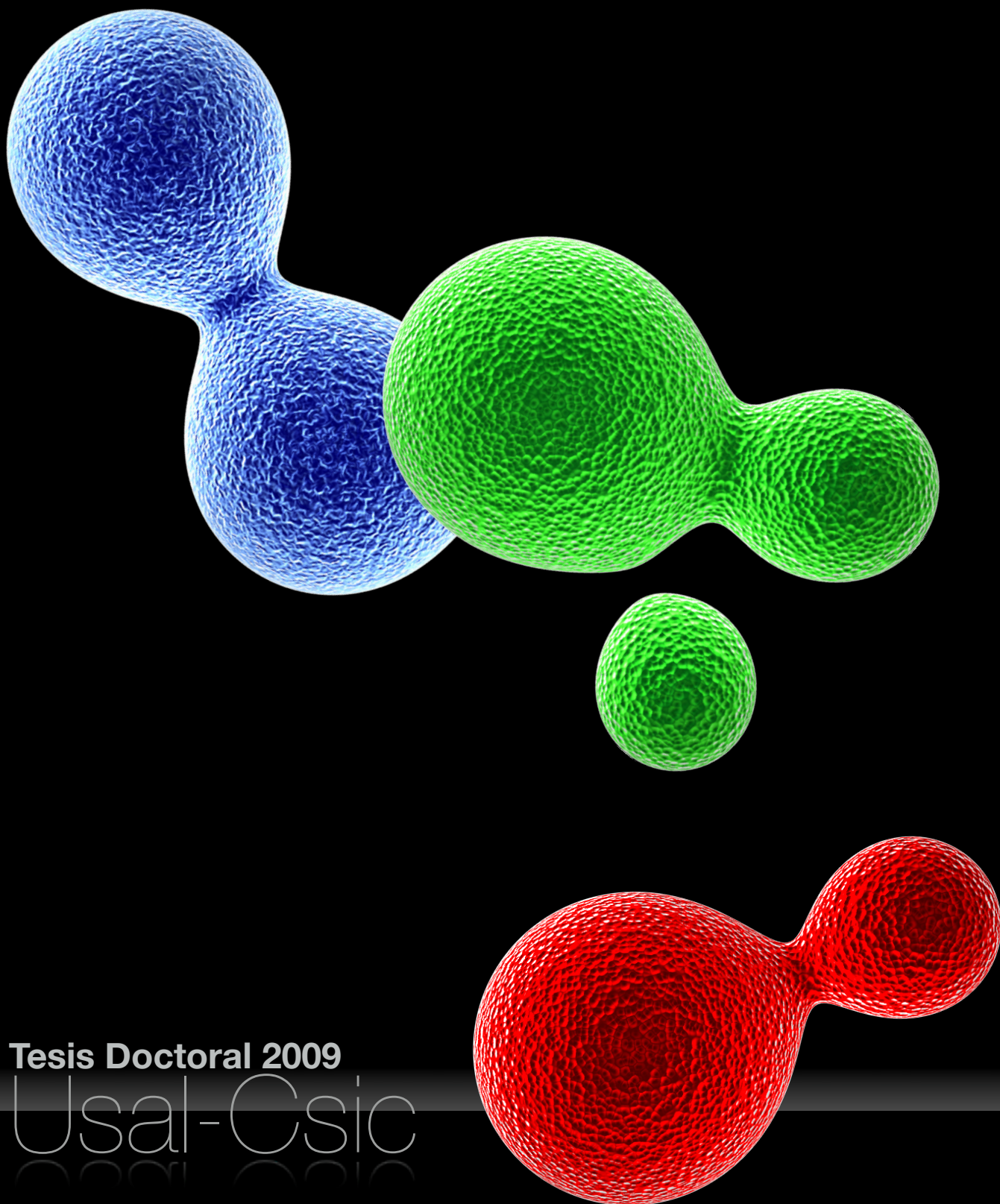
Zavialov, A. V., Haurlyuk, V. V., and Ehrenberg, M. (2005). Guanine-nucleotide exchange on ribosome-bound elongation factor G initiates the translocation of tRNAs. *J Biol* 4, 9.

Zeeberg, B. R., Feng, W., Wang, G., Wang, M. D., Fojo, A. T., Sunshine, M., Narasimhan, S., Kane, D. W., Reinhold, W. C., Lababidi, S., *et al.* (2003). GoMiner: a resource for biological interpretation of genomic and proteomic data. *Genome Biol* 4, R28.

Zewail, A., Xie, M. W., Xing, Y., Lin, L., Zhang, P. F., Zou, W., Saxe, J. P., and Huang, J. (2003). Novel functions of the phosphatidylinositol metabolic pathway discovered by a chemical genomics screen with wortmannin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 3345-3350.

Zeyl, C. (2007). How missing genes interact. *Nat Genet* 39, 440-442.

- Zhang, J., Schneider, C., Ottmers, L., Rodriguez, R., Day, A., Markwardt, J., and Schneider, B. L. (2002). Genomic scale mutant hunt identifies cell size homeostasis genes in *S. cerevisiae*. *Curr Biol* 12, 1992-2001.
- Zhang, L. V., King, O. D., Wong, S. L., Goldberg, D. S., Tong, A. H., Lesage, G., Andrews, B., Bussey, H., Boone, C., and Roth, F. P. (2005). Motifs, themes and thematic maps of an integrated *Saccharomyces cerevisiae* interaction network. *J Biol* 4, 6.
- Zhao, R., Davey, M., Hsu, Y. C., Kaplanek, P., Tong, A., Parsons, A. B., Krogan, N., Cagney, G., Mai, D., Greenblatt, J., *et al.* (2005). Navigating the chaperone network: an integrative map of physical and genetic interactions mediated by the hsp90 chaperone. *Cell* 120, 715-727.
- Zheng, X. F., and Chan, T. F. (2002). Chemical genomics in the global study of protein functions. *Drug Discov Today* 7, 197-205.
- Zhong, W., and Sternberg, P. W. (2006). Genome-wide prediction of *C. elegans* genetic interactions. *Science* 311, 1481-1484.
- Zhu, C., Byers, K. J., McCord, R. P., Shi, Z., Berger, M. F., Newburger, D. E., Saulrieta, K., Smith, Z., Shah, M. V., Radhakrishnan, M., *et al.* (2009). High-resolution DNA-binding specificity analysis of yeast transcription factors. *Genome Res* 19, 556-566.
- Zhu, H., Bilgin, M., Bangham, R., Hall, D., Casamayor, A., Bertone, P., Lan, N., Jansen, R., Bidlingmaier, S., Houfek, T., *et al.* (2001). Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science* 293, 2101-2105.
- Zimmermann, G. R., Lehar, J., and Keith, C. T. (2007). Multi-target therapeutics: when the whole is greater than the sum of the parts. *Drug Discov Today* 12, 34-42.



Tesis Doctoral 2009
Usal-Csic