RAQUEL FONSECA GUEDES MONTEIRO

**ESTUDO DE PROTEÍNAS QUE AFETAM A TRADUÇÃO
MITOCONDRIAL EM *Saccharomyces cerevisiae***

Tese apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Microbiologia do Instituto
de Ciências Biomédicas da Universidade
de São Paulo, para obtenção de Título de
Doutor em Ciências.

São Paulo
2017

RAQUEL FONSECA GUEDES MONTEIRO

ESTUDO DE PROTEÍNAS QUE AFETAM A TRADUÇÃO
MITOCONDRIAL EM *Saccharomyces cerevisiae*

Tese apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Microbiologia do Instituto
de Ciências Biomédicas da Universidade
de São Paulo, para obtenção de Título de
Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Mário Henrique de
Barros

Versão Corrigida. A versão original eletrônica
encontra-se disponível tanto na biblioteca do
ICB quanto na Biblioteca de Teses e
Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Fonseca Guedes Monteiro, Raquel
Estudo de proteínas que afetam a tradução
mitocondrial em *Saccharomyces cerevisiae* / Raquel
Fonseca Guedes Monteiro; orientador Mário Henrique
de Barros. -- São Paulo, 2017.
76 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. *Saccharomyces cerevisiae*. 2. ORF. 3. Tradução
mitocondrial. I. Henrique de Barros, Mário ,
orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidata: Raquel Fonseca Guedes Monteiro

Título da Tese: Estudo de proteínas que afetam a tradução mitocondrial em *Saccharomyces cerevisiae*

Orientador: Prof. Dr. Mário Henrique de Barros

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese, em sessão pública realizada a 05/09/2017, considerou

☒ (X) Aprovada ☐ () Reprovada

Examinador (a): Nome: Erich Birelli Tahara
Instituição: Universidade de Minas Gerais

Examinador (a): Nome: Fernanda Marques da Cunha
Instituição: Universidade Federal de São Paulo

Examinador (a): Nome: Luis Eduardo Soares Netto
Instituição: Universidade de São Paulo

Examinador (a): Nome: Rodrigo da Silva Galhardo
Instituição: Universidade de São Paulo

Presidente: Nome: Mário Henrique de Barros
Instituição: Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP: 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (085) (11) 3081-0722 - Telex: (085) (11) 3081-0485
e-mail: cep@icb.usp.br

Comitê de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 483/11 referente ao projeto intitulado: "*Caracterização de produtos gênicos mitocondriais com função desconhecida em *Saccharomyces cerevisiae**" sob a responsabilidade de **Raquel Fonseca Guedes Monteiro**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP n°196 de 1996.

São Paulo, 20 de setembro de 2011.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A. ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Agradeço;

Ao meu orientador Dr. Mário Henrique de Barros, por me receber em seu laboratório após anos distante da pesquisa, permitindo que eu fizesse o doutorado mesmo residindo em outra cidade. Obrigada pela orientação, transmissão do conhecimento, por confiar em mim.

Ao Professor Dr. José Ribamar dos Santos Ferreira Jr., docente da Universidade de São Paulo, na Escola de Artes, Ciências e Humanidades, pelas interessantes discussões.

À Dra. Sayuri Miyamoto, do Instituto de Química da USP e da Dra. Patrícia Apollinário, pelo auxílio com os experimentos de quantificação de cardiolipina.

Ao Professor Dr. Antoni Barrientos, da Universidade de Miami, por alguns experimentos realizados em seu laboratório.

Ao Professor Dr. Lucas Bleicher, da Universidade Federal de Minas Gerais, pelas análises de conservação e correlação de resíduos.

À Gisele, sempre muito atenciosa e paciente, por toda a ajuda burocrática.

Aos meus amigos e colegas do laboratório: Fernando, Letícia, Bruno, Ana, Janaína, Claudia, Carolina, Erich. Obrigada pela ajuda prática, intelectual e psicológica!

Aos meus colegas do fretado, por tornarem mais agradável o trajeto São José dos Campos - São Paulo.

Aos meus cunhados Cris e Lu, por me acolherem em sua casa.

As minhas amigas Alessandra, Amanda, Kátia, Milena e Tatiana.

Aos meus pais, meu irmão e meu esposo, pela incomensurável ajuda, principalmente em se tratando dos cuidados com os pequenos Gabriel ♥ e Leonardo ♥.

Às minhas avós, pelas constantes orações.

Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

MONTEIRO, R. F. G. **Estudo de proteínas que afetam a tradução mitocondrial em *Saccharomyces cerevisiae***. 2017. 81 f. Tese (Departamento de Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Uma das razões que fazem de *Saccharomyces cerevisiae* um organismo modelo é o grau de conservação dos mecanismos celulares que existe entre esta levedura e eucariotos superiores. Porém, mesmo após 21 anos do seqüenciamento do seu genoma, ainda existem mais de 600 ORFs com função desconhecida. Neste trabalho, selecionamos quatro delas para o estudo detalhado. **MRPL34** (*YDR115w*) está presente na subunidade maior do ribossomo mitocondrial de levedura e apresenta similaridade com o gene *L34* de *E. coli* e *MRP-L34* de humanos. O mutante $\Delta mrpl34$ apresenta DNA mitocondrial (mtDNA) instável e para estudá-lo foram gerados alelos sensíveis à temperatura (ts). Com os ensaios de síntese protéica mitocondrial *in vivo* foi possível identificar clara diminuição da síntese de proteínas do mutante condicional. Mrpl34p foi identificada no extrato ribossomal, conforme esperado. A desestruturação da subunidade maior do ribossomo mitocondrial, utilizando os mutantes ts, nos forneceu indícios sobre intermediários existentes no seu processo de montagem. Verificamos que a porção N-terminal da proteína é responsável pelo endereçamento à mitocôndria. **YPR116w** também apresenta alta instabilidade do DNA mitocondrial, desta forma, mutantes termosensíveis foram utilizados nos experimentos. Uma das estratégias utilizadas visou a busca de parceiros genéticos. Verificamos que *ylr091wp* aumenta a estabilidade do mtDNA de *ts-ypr116w*, sugerindo atividade supressora. Também averiguamos que o alelo *ts-ypr16w* apresenta menor quantidade de tRNA mitocondrial, através de ensaios de *Northen blot*. Duas das ORFs escolhidas (*YDL119c* e *YOR022c*) tiveram sua caracterização inicial publicada em 2016, refletindo a importância deste tipo de pesquisa. Vimos que a proteína codificada por **YDL119c** está localizada na membrana interna da mitocôndria e que o mutante $\Delta yor022c$ apresenta quantidades reduzidas de cardiolipina, quando crescido à 37°C.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*. ORF. Tradução mitocondrial.

ABSTRACT

MONTEIRO, R. F. G. **Study of proteins that affect mitochondrial translation in *Saccharomyces cerevisiae***. 2017. 81p. Ph. D. thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

One of the reasons that turn *Saccharomyces cerevisiae* a model organism is the degree of conservation of cellular mechanisms that exist between this yeast and higher eukaryotes. However, even after 21 years of sequencing their genome, there are still more than 600 ORFs with unknown function. In this work, we selected four of them for the detailed study. **MRPL34** (*YDR115w*) is present in the major subunit of the yeast mitochondrial ribosome and bears similarity to the *L34* gene of *E. coli* and *MRP-L34* from humans. The $\Delta mrp134$ mutant shows unstable mitochondrial DNA (mtDNA) and to study it, temperature sensitive alleles (ts) were generated. With the mitochondrial protein synthesis assays *in vivo*, it was possible to identify a clear decrease in the protein synthesis of the conditional mutant. Mrp134p was identified in the ribosomal extract as expected. The disassembly of the major subunit of the mitochondrial ribosome, using the ts mutants, provided us some clues about intermediates in its assembly process. We have verified that the N-terminal portion of the protein is responsible for addressing the mitochondria. **YPR116w** also shows high mitochondrial DNA instability, in this way, thermosensitive mutants were used in the experiments. One of the strategies used was the search for genetic partners. We verified that *ylr091wp* increases the stability of *ts-ypr116w* mtDNA, suggesting suppressor activity. We also found that the *ts-ypr16w* allele has a smaller amount of mitochondrial tRNA, through *Northern blot* assays. Two of the chosen ORFs (*YDL119c* and *YOR022c*) had their initial characterization published in 2016, reflecting the importance of this type of research. We have seen that the protein encoded by **YDL119c** is located on the inner membrane of the mitochondria and that the $\Delta yor022c$ mutant presents reduced amounts of cardiolipin when grown at 37°C.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*. ORF. Mitochondrial translation

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
<i>1.1 Características gerais de <i>Saccharomyces cerevisiae</i></i>	12
<i>1.2 Mitocôndria</i>	13
<i>1.2.2 Origem e evolução</i>	15
<i>1.2.3 Maquinaria geral de importação</i>	16
<i>1.2.4 Importação de proteínas ribossomais</i>	18
<i>1.3 ORFs selecionadas para este estudo</i>	19
2 OBJETIVOS	20
<i>2.1 Geral</i>	20
<i>2.2 Específicos</i>	20
3 MATERIAL & MÉTODOS	21
<i>3.1 Linhagens utilizadas</i>	21
<i>3.2 Procedimentos gerais para manipulação de <i>S. cerevisiae</i> e <i>E. coli</i></i>	22
<i>3.3 Construção de mutantes nulos</i>	22
<i>3.4 Construção de mutantes sensíveis à temperatura</i>	23
<i>3.5 Construção de ORFs fusionadas com epítomos</i>	23
<i>3.6 Isolamento de mitocôndrias</i>	23
<i>3.7 Ensaio de solubilidade protéica</i>	24
<i>3.8 Localização protéica intramitocondrial</i>	24
<i>3.9 Fusão com <i>trpE</i> para produção de anticorpo</i>	24
<i>3.10 Ensaio de crescimento com diluição seriada</i>	25
<i>3.11 Quantificação de cardiolipina</i>	25
<i>3.12 Detecção de proteínas biotinadas</i>	25
<i>3.13 Purificação de ribossomos mitocondriais</i>	25
<i>3.14 Análise de peptídeos mitocondriais recém-sintetizados</i>	26
<i>3.15 Conservação de resíduos e análise de correlação</i>	26
<i>3.16 Mutagênese sítio dirigida</i>	26
<i>3.17 Análise da porção N-terminal de <i>Ydr115wp</i></i>	27
<i>3.18 Extrato mitocondrial em gradiente de sacarose</i>	27
<i>3.19 Isolamento de RNA dos transcritos mitocondriais e Northern Blot</i>	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO PARCIAL	29

4.1 Resultados e discussão parcial - MRPL34	29
<u>4.1.1 Mutante nulo e mutantes sensíveis à temperatura</u>	29
<u>4.1.2 Mutagênese sítio dirigida</u>	31
<u>4.1.3 Localização e importação de Mrpl34p</u>	33
<u>4.1.4 Montagem dos ribossomos mitocondriais</u>	37
<u>4.1.5 Síntese protéica mitocondrial in vivo</u>	40
4.2 Resultados e discussão parcial – YPR116w	42
<u>4.2.1 Busca por parceiros genéticos</u>	42
<u>4.2.2 Mutantes ts</u>	43
<u>4.2.3 Topologia e Solubilidade de Ypr116wp e parceiros</u>	44
<u>4.2.4 Ensaios de Northern blot</u>	46
4.3 Resultados e discussão parcial – YDL119c	49
<u>4.3.1 Mutante nulo</u>	49
<u>4.3.2 Descrição topológica</u>	49
<u>4.3.3 Síntese protéica mitocondrial in vivo</u>	51
<u>4.3.4 Função de Ydl119cp</u>	51
4.4 Resultados e discussão parcial – YOR022c	52
<u>4.4.1 Mutante nulo</u>	52
<u>4.4.2 Padronização de anticorpos</u>	54
<u>4.4.3 Síntese protéica mitocondrial in vivo</u>	54
<u>4.4.4 Análise de cardiolipina</u>	56
<u>4.4.5 Função de Yor022cp</u>	57
5 DISCUSSÃO	57
REFERÊNCIAS	61
Apêndice A – Iniciadores utilizados	72
Apêndice B – Estratégias para construção dos mutantes nulos	74
Apêndice C – Estratégia para construção de mutantes de ponto em YDR115w	75
Apêndice D – Propriedades de crescimento dos mutantes $\Delta ydl119c$ e $\Delta yor022c$	76

1 INTRODUÇÃO

1.1 Características gerais de *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae é um fungo unicelular do grupo dos ascomicetos. Desde os tempos ancestrais, é utilizado de maneira empírica na produção de bebidas fermentadas e massas.

Durante a fase vegetativa, sua reprodução ocorre por brotamento. Cada broto recebe uma cópia de todos os genes nucleares da célula mãe assim como parte do citoplasma da mesma, incluindo as mitocôndrias e demais organelas. Na sua forma haplóide, pode existir como dois tipos celulares no que diz respeito ao fator sexual, ou tipo de acasalamento, sendo designadas “a” e “ α ”. Quando ocorre fusão de células de tipos de acasalamento opostos, há a formação do zigoto diplóide. Em meio de cultura rico, os diplóides também se reproduzem por brotamento, já em condições de substrato limitante, o que em laboratório é estimulado por meio contendo acetato de potássio como fonte de carbono, a célula é induzida à esporulação, processo formador de quatro esporos haplóides (2 “a” e 2 “ α ”), os quais, em meio rico, iniciarão um novo ciclo (HERSKOWITZ, 1988) (Figura 1).

Figura 1 - Ciclo de vida de *Saccharomyces cerevisiae*

Leveduras haplóides dos tipos sexuais “a” e “ α ” e a diplóide “a/α” são capazes de se multiplicar por mitose, através de brotamento. A fusão das células haplóide de tipo sexual oposto forma o diplóide, que em determinadas condições de crescimento, como oferta de fontes pobres de carbono, sofre meiose gerando quatro células filhas: duas do tipo sexual “a” e duas do tipo “ α ”. Adaptado de Herskowitz, 1988.

Por ser um eucarioto, compartilha com plantas e animais a complexidade de organização de suas células, mas sem apresentar volume significativo de DNA não codificante, o que facilita o estudo pontual de genes.

Além desta característica, diversas outras peculiaridades fazem da levedura um organismo modelo no estudo de células eucarióticas: é um fungo com rápido tempo de geração em meio rico; pode ser cultivado tanto em anaerobiose quanto em aerobiose; o processo de transformação genética é simples e a recombinação homóloga bastante eficiente.

O genoma de *S. cerevisiae* foi sequenciado em 1996 (GOFFEAU et al., 1996), representando o primeiro eucarioto a ser totalmente sequenciado.

Logo se acelerou a busca pelo entendimento do papel de suas ORFs (*Open Reading Frames*). Acreditava-se que em meados de 2007 os aproximados 6000 genes de *S. cerevisiae* já teriam sido classificados como “conhecidos” (HUGHES et al., 2004; PENA-CASTILLO; HUGHES, 2007), porém, analisando o banco de dados do *Saccharomyces Genome Database* (SGD) nota-se que há cerca de 700 ORFs descritas como “não caracterizadas” (dados de 23/02/2016).

Uma ORF dita “não caracterizada” é aquela que provavelmente codifica uma proteína, como, por exemplo, sugerido pela existência de ortólogos, mas para a qual não foram realizados experimentos específicos que confirmem a existência do produto protéico.

Além dessas, há cerca de 480 ORFs classificadas como “verificadas”, mas que na descrição está escrito “função desconhecida” ou “suposta função”. Muitas foram analisadas em trabalhos de larga escala, que demonstram a relevância biológica da ORF.

Os estudos globais empregando biologia de sistemas agregam muita informação sob diferentes aspectos, entretanto esses estudos não são suficientes para se chegar à função específica. Embora trabalhoso, o estudo pontual dos efeitos bioquímicos de uma dada mutação ainda é o caminho prioritário para a descrição funcional de um gene.

Dentre as ORFs ainda não estudadas, o interesse do nosso grupo está naquelas envolvidas na biogênese da mitocôndria.

1.2 Mitocôndria

1.2.1 Geração de energia

A mitocôndria é uma organela dinâmica que desempenha funções centrais em diversos processos celulares, como ciclo de Krebs, β -oxidação de ácidos graxos, biossíntese de heme e centros ferro-enxofre, fosforilação oxidativa, envelhecimento e morte celular (BARROS et al., 2010; FINKEL, 2015; LILL; MUHLENHOFF, 2008; MISHRA; CHAN, 2016;

SARASTE, 1999). Desta forma, as disfunções mitocondriais vêm sendo associadas com diversas doenças metabólicas e neurodegenerativas (LIGHTOWLERS et al., 2015).

É composta por uma matriz solúvel, onde estão as enzimas do ciclo de Krebs, da β -oxidação de ácidos graxos e da oxidação de aminoácidos. É onde ocorre a tradução mitocondrial. A matriz é cercada por duas membranas: a interna, bastante extensa devido suas inúmeras invaginações, conhecidas como cristas, onde ocorre a transferência de elétrons da cadeia respiratória mitocondrial, e a externa, permeável a íons e pequenas moléculas devido à presença de porinas. Entre as duas membranas, há o espaço intermembranas, onde é gerado o gradiente de prótons durante o processo de transferência de elétrons da cadeia respiratória (TZAGOLOFF, 1982).

A cadeia respiratória mitocondrial é composta, em mamíferos, de quatro aglomerados protéicos. A passagem de elétrons por estes complexos libera energia que é armazenada como um gradiente de prótons através da membrana interna, posteriormente utilizado pela ATP sintase para produzir ATP a partir de ADP (LENAZ; GENOVA, 2010; SARASTE, 1999).

O complexo I (NADH: ubiquinona oxidoreductase) constitui o maior complexo da cadeia respiratória de mamíferos, composto por 45 subunidades (HIRST, 2013), porém em *S. cerevisiae* ele é substituído por três NADH desidrogenases localizadas na membrana mitocondrial interna, sendo duas voltadas para o espaço intermembranas, responsáveis pela oxidação do NADH gerado no citossol, e uma voltada para a matriz mitocondrial, que oxida NADH da matriz, sempre com a redução da coenzima Q (GRANDIER-VAZEILLE et al., 2001; LUTTIK et al., 1998) (Figura 2).

O complexo II (Succinato: ubiquinona redutase) desempenha papel no ciclo de Krebs como succinato desidrogenase, promovendo a oxidação do succinato à fumarato, com os elétrons sendo transferidos à Coenzima Q, na cadeia respiratória. Nesta etapa não ocorre bombeamento de prótons (LANCASTER, 2002).

A coenzima Q (LENAZ et al., 2007) transfere os elétrons para o Complexo III (Ubiquinol-citocromo c redutase) (IWATA et al., 1998), o qual, em seguida, os transfere para citocromo c, acoplado ao bombeamento de prótons para o espaço intermembranas. A partir do citocromo c, os elétrons fluem para o complexo IV (Citocromo c oxidase), e finalmente para oxigênio, a etapa final da cadeia de transporte de elétrons (BELEVICH; VERKHOVSKY, 2008).

O bombeamento de prótons gera um gradiente eletroquímico através da membrana mitocondrial interna. A energia potencial armazenada no gradiente de prótons é

posteriormente utilizada para promover a síntese de ATP através do complexo da ATP sintase (SARASTE, 1999).

Figura 2 - Esquema simplificado da Cadeia Transportadora de Elétrons de *Saccharomyces cerevisiae*

A mitocôndria de *S. cerevisiae* não possui o Complexo I constituído de múltiplas subunidades. Desta forma, a oxidação do NADH intramitocondrial ocorre por meio de uma NADH:ubiquinona oxidoredutase insensível a rotenona, conhecida como NADH desidrogenase interna 1 (Ndi1p). O acoplamento da oxidação do NADH citosólico à cadeia respiratória mitocondrial ocorre por meio de duas atividades enzimáticas conhecidas como NADH desidrogenase externa 1 (Nde1p) e 2 (Nde2p). Os elétrons (e^-) provenientes do complexo II são resultado da oxidação do succinato à fumarato. A coenzima Q (Q) é responsável por transportar os elétrons provenientes das etapas anteriores para o Complexo III, os quais chegam ao Complexo IV através do citocromo c (CytC). A molécula de oxigênio é o aceptor final dos elétrons da cadeia respiratória. O bombeamento de prótons (H^+) para fora da matriz, durante as etapas III e IV gera uma diferença de potencial eletroquímico. Adaptado de Grandier-Vazeille et al., 2001.

1.2.2 Origem e evolução

De acordo com a teoria endossimbiótica, as mitocôndrias evoluíram a partir da simbiose entre uma α -proteobactéria e uma arqueobactéria (MARGULIS, 1970).

A existência de DNA na mitocôndria (SCHATZ et al., 1964) e o fato de que inibidores da síntese protéica bacteriana (cloranfenicol e eritromicina) são ineficientes na inibição da síntese protéica citossólica, mas inibem a mitocondrial (CLARK-WALKER; LINNANE, 1966) são alguns dos fatos que ajudam a suportar essa teoria.

Durante a evolução do simbiote em mitocôndria, a maioria dos seus genes foi transferida para o genoma do hospedeiro (ADAMS; PALMER, 2003; BIETENHADER et al., 2012; BLANCHARD; LYNCH, 2000), desta forma, o genoma mitocondrial contém apenas uma pequena porção de genes.

Na levedura estão presentes três subunidades da citocromo c oxidase (*COX1*, *COX2* e *COX3*), três subunidades da ATP sintase (*ATP6*, *ATP8* e *ATP9*), uma subunidade da ubiquinol citocromo c redutase (*COB1*), uma proteína ribossomal (*VARI*), os RNAs ribossomais 15S e 21S, 24 RNAs transportadores que suprem todos os códons e o RNA 9S (Rpm1r), componente da RNaseP (FOURY et al., 1998).

O DNA mitocondrial de levedura contém cerca de 85kb, sendo rico em sequências não codificantes, inclusive no interior de genes, constituindo íntrons, como em *COX1*, *COB* e *21sRNA* (DE ZAMAROCZY; BERNARDI, 1985; FOURY et al., 1998). Alguns desses íntrons são traduzidos, produzindo maturases, transcriptases reversas ou endonucleases (TZAGOLOFF; MYERS, 1986).

Há 12 unidades transcricionais, sendo que todos os genes, com exceção de *tRNA^{thr}*, são transcritos a partir da mesma fita de DNA (FOURY et al., 1998). A RNA polimerase mitocondrial é composta de um centro catalítico, Rpo41p, e de uma porção que reconhece o promotor, chamada Mtf1p (GREENLEAF et al., 1986; LISOWSKY; MICHAELIS, 1989).

É importante ressaltar que a ausência de qualquer uma das proteínas participantes diretas da replicação/manutenção do mtDNA é extremamente nociva à estabilidade dele próprio, levando a sua perda total ou parcial (KANIAK-GOLIK; SKONECZNA, 2015; MERZ; WESTERMANN, 2009).

Em *S. cerevisiae*, células que perderam o mtDNA de forma parcial (ρ^-) ou total (ρ^0) são chamadas *petites*, devido ao tamanho reduzido das colônias crescidas em meio rico, e são incapazes de respirar, obtendo energia somente pela fermentação (EPHRUSSI; HOTTINGER, 1949).

Considerando este reduzido genoma, a maioria das proteínas mitocondriais é codificada pelo genoma nuclear e são transportadas para a organela, envolvendo ações coordenadas entre esses dois genomas.

1.2.3 Maquinaria geral de importação

A mitocôndria desempenha um importante papel no metabolismo e em processos regulatórios na célula. Apesar de conter seu próprio genoma, este codifica apenas 1% do total de proteínas. A grande maioria (cerca de 1000 em *S. cerevisiae*) é traduzida fora da organela, em ribossomos no citoplasma celular (CHACINSKA et al., 2009; NEUPERT; HERRMANN, 2007).

A biogênese mitocondrial depende de complexo um mecanismo de importação de proteínas, o qual irá recebê-las, processá-las e distribuí-las pelos diferentes compartimentos mitocondriais.

A maioria das proteínas mitocondriais precursoras possui uma pré-sequência clivável na porção N-terminal, responsável pelo direcionamento do peptídeo nos compartimentos da organela, porém, muitas das proteínas possuem o sinal de endereçamento disperso ao longo da sequência (NEUPERT; HERRMANN, 2007; VOGTLE et al., 2009).

As pré-sequências direcionam a importação de grande parte das proteínas da matriz, de uma importante fração dos peptídeos da membrana interna e de vários do espaço intermembranas. Consistem em cerca de 15 à 55 resíduos de aminoácidos que possuem potencial para formar hélices anfipáticas positivamente carregadas e hidrofóbicas (VOGTLE et al., 2009). No geral, o peptídeo sinal é proteoliticamente removido por peptidases ou proteases, após a importação (MOSSMANN et al., 2012).

As propriedades específicas das sequências de endereçamento permitiram a geração de algoritmos, como TargetP (EMANUELSSON et al., 2007), MitoPred (GUDA et al., 2004) e MitoProt (CLAROS; VINCENS, 1996) que predizem o provável endereçamento de determinada proteína.

O principal portão de entrada das proteínas destinadas à mitocôndria é o complexo TOM (translocase da membrana externa). Tom20p e Tom70p (MOCZKO et al., 1992; MOCZKO et al., 1993; PFANNER et al., 1996) estão ancoradas na membrana externa com a porção hidrofílica exposta para o citosol. O domínio hidrofílico de Tom70p contém 11 repetições tetratricopeptídicas que exibem preferência por precursores protéicos que apresentam o sinal de endereçamento interno (WU; SHA, 2006). Tom20p reconhece as proteínas com sequência N-terminal (MUTO et al., 2001).

Tom22p (LITHGOW et al., 1994) transfere as proteínas para o poro geral de importação (GIP), constituído pelo componente central Tom40p (VESTWEBER et al., 1989), que forma uma estrutura de β -barril, e três subunidades associadas: Tom5p, Tom6p e Tom7p (DEKKER et al., 1998).

O complexo Tim9p-Tim10p, localizado no espaço intermembranas, media a transferência das proteínas precursoras entre o complexo TOM e SAM (*sorting and assembly machinery*) (PASCHEN et al., 2005), ocorrendo a seqüente inserção na membrana externa.

Proteínas ricas em resíduos de cisteína destinadas ao espaço intermembranas dependem do sistema Mia40p-Erv1p para sua correta importação, por meio de um processo oxidativo. A oxirredutase Mia40p forma pontes de dissulfeto temporárias com a proteína

precursora, tão logo deixe o complexo TOM. Em seguida, cataliza a formação de pontes de dissulfeto no precursor, liberando-o no espaço intermembranas. Mia40p, por sua vez, é oxidada por Erv1p e esse doa elétrons para o citocromo c, entrando na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (CHACINSKA et al., 2004; DUDEK et al., 2013; MESECKE et al., 2005).

O complexo TIM22 (translocase da membrana interna), composto por Tim54p, Tim22p, Tim18p e Sdh3p (GEBERT et al., 2011), medeia a inserção de proteínas hidrofóbicas com múltiplos segmentos transmembranas – tipicamente proteínas carreadoras, na membrana interna mitocondrial.

O complexo TIM23 direciona as proteínas precursoras que contêm sequência de endereçamento na porção N-terminal para a matriz. A presença de um sinal hidrofóbico adjacente a esta sequência conduz o precursor lateralmente na membrana interna. É composto por três proteínas essenciais: Tim23p, Tim17p e Tim50p e Tim21p (CHACINSKA et al., 2005; WAGNER et al., 2009).

A transição das proteínas recém importadas para os complexos TIM22 e TIM23 pelo espaço intermembranas é realizada pelas chaperonas Tim8p-Tim13p e Tim9p-Tim10p e Tim12p (DAVIS et al., 2007; MOKRANJAC; NEUPERT, 2009).

A integração das proteínas na membrana interna é dependente da existência de potencial de membrana e ATP, enquanto a importação para a matriz requer a presença do motor de importação, associado a TIM23, denominado PAM (*presequence translocase-associated import motor*), o qual é composto por mtHsp70 que exibe atividade de ATPase e as chaperonas Pam18p, Pam16p, Mge1p, Tim44p e Pam17p (DUDEK et al., 2013; MOKRANJAC; NEUPERT, 2009).

Durante a translocação para a matriz, a maioria das pré-proteínas é proteoliticamente maturada pela peptidase MPP (*mitochondrial-processing peptidase*), um complexo dimérico que remove as pré-sequências de endereçamento (VOGTLE et al., 2009). Após a clivagem por MPP, algumas proteínas ainda precisam ser processadas por Icp55p (NAAMATI et al., 2009; VENNE et al., 2013) ou Oct1p (VOGTLE et al., 2011).

1.2.4 Importação de proteínas ribossomais

Em leveduras, o ribossomo mitocondrial é formado por 73 proteínas, sendo 39 da subunidade maior e 34 da subunidade menor. Apenas uma delas, a Var1p, é codificada pelo genoma mitocondrial (GROOT et al., 1979; WOELLHAF et al., 2014).

Ao contrário da maioria das proteínas destinadas à matriz, as proteínas do ribossomo mitocondrial não possuem características físico-químicas de endereçamento na porção N-

terminal, resultando na falta de consenso dos resultados gerados entre os programas específicos para determinar localização protéica (WOELLHAF et al., 2014).

A biogênese de três proteínas do ribossomo mitocondrial foi bem caracterizada e demonstram importantes desvios no processo.

Estudos realizados em levedura determinaram que, apesar dos primeiros 71 resíduos de Mrp132p não serem carregados positivamente e nem exibirem propriedades para formação de alfa-hélices anfipáticas, são determinantes para o processo de importação. Após ser importada, Mrp132p não é processada por MPP e sim pela protease m-AAA (NOLDEN et al., 2005), que desempenha importante papel no controle de qualidade das proteínas mitocondriais (TATSUTA; LANGER, 2008) e atua no processamento de algumas proteínas da membrana interna (ESSER et al., 2002).

Também utilizando *S. cerevisiae*, o estudo realizado com Mrp10p mostrou que os 29 resíduos da região N-terminal são responsáveis pelo direcionamento da proteína para a mitocôndria, apesar de também não apresentarem as características consenso. Após a importação, Mrp10p interage com a oxirredutase Mia40p no espaço intermembranas e tem seus quatro resíduos de cisteína oxidados. Mia40p, por sua vez, é oxidada por Erv1p e essa doa elétrons para o citocromo c, entrando na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial. Em mutantes que apresentam atividade reduzida da citocromo c oxidase, Mrp10p não é eficientemente oxidado e uma grande fração é degradada, diminuindo a síntese protéica mitocondrial geral (LONGEN et al., 2014).

Trabalhando com células humanas e de rato, foi mostrado que a proteína Mrp112, cujo ortólogo em levedura é Mnp1p, sofre um primeiro processamento por MPP, que retira a sequência sinal de endereçamento N-terminal e, em seguida, pode ocorrer uma excisão por MIP (*mitochondrial intermediate protease*). Desta forma, as duas formas maduras coexistem na matriz e estão envolvidas na regulação da transcrição mitocondrial e na biogênese mitocondrial (NOUWS et al., 2016).

1.3 ORFs selecionadas para este estudo

Neste trabalho foram selecionadas para o estudo detalhado, quatro ORFs de função desconhecida, com provável ação no metabolismo mitocondrial. Em duas delas (***YDR115w*** e ***YPR116w***) tivemos avanços significativos na elucidação de suas funções.

Também apresentaremos os resultados de outras duas ORFs estudadas: ***YDL119c*** e ***YOR022c***.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Contribuir com o estudo detalhado de ORFs com papel desconhecido a fim de atribuir função para suas proteínas.

2.2 Específicos

- **YDR115w**: Estudar sua participação no processo de montagem do ribossomo mitocondrial;
- **YPR116w**: Buscar sua função protéica.
- **YDL119c**: Averiguar a localização de seu produto protéico;
- **YOR022c**: Verificar possível atuação no metabolismo de fosfolipídios.

3 MATERIAL & MÉTODOS

3.1 Linhagens utilizadas

A linhagem de *Escherichia coli* está descrita na Tabela 1.

Tabela 1 - Linhagem de *E. coli*

Linhagens <i>E. coli</i>	Genótipo	Referência
RR1	(Δ (gpt-proA)62, leuB6, thi-1, lacY1, hsd _B 20, rpsL20 (Str ^r), ara-14, galK2, xyl-5, mtl-1, supE44, mcrB _B)	(HANAHAN, 1983)

As linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 - Linhagens de *S. cerevisiae*

Linhagens <i>S. cerevisiae</i>	Genótipo	Referência
W303-1A	<i>MATa leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15</i>	Rothstein, R. Columbia University
W303-1B	<i>MATa leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15</i>	Rothstein, R. Columbia University
W303 diplóide	<i>MATa/α leu2-3,112/ leu2-3,112 trp1-1/ trp1-1 can1-100/ can1-100 ura3-1/ ura3-1 ade2-1/ ade2-1 his3-11,15/ his3-11,15</i>	Rothstein, R. Columbia University
CB11	<i>MATa ade1, p⁰</i>	Tzagoloff, A. Columbia University
KL14	<i>MATa his, ile, val, p⁰</i>	Tzagoloff, A. Columbia University
W303ΔYDL119c	<i>MATa leu2-3,112 trp1-1, can1-100, ura3-1, ade2-1, his3-11,15, ydl119c::HIS3</i>	Este trabalho
W303ΔYOR022c	<i>MATa leu2-3,112, trp1-1 can1-100, ura3-1 ade2-1, his3-11,15, yor022c::HIS3</i>	Este trabalho
W303ΔMRPL34 (YDR115w) heterozigota	<i>MATa/α leu2-3,112/ leu2-3,112 trp1-1/ trp1-1 can1-100/ can1-100 ura3-1/ ura3-1 ade2-1/ ade2-1 his3-11,15/ his3-11,15 MRPL34::HIS3/MRPL34</i>	Este trabalho
W303ΔPET130 heterozigota	<i>MATa/α leu2-3,112/ leu2-3,112 trp1-1/ trp1-1 can1-100/ can1-100 ura3-1/ ura3-1 ade2-1/ ade2-1 his3-11,15/ his3-11,15 pet130::LEU2/PET130</i>	Este trabalho
W303ΔYLR091 heterozigota	<i>MATa/α leu2-3,112/ leu2-3,112 trp1-1/ trp1-1 can1-100/ can1-100 ura3-1/ ura3-1 ade2-1/ ade2-1 his3-11,15/ his3-11,15 ylr091::HIS3/YLR091</i>	Este trabalho
W303ΔYDR065 heterozigota	<i>MATa/α leu2-3,112/ leu2-3,112 trp1-1/ trp1-1 can1-100/ can1-100 ura3-1/ ura3-1 ade2-1/ ade2-1 his3-11,15/ his3-11,15 ydr065::HIS3/YDR065c</i>	Este trabalho
W303ΔMRPL34(YDR115w) haplóide	<i>MATa leu2-3,112, trp1-1 can1-100, ura3-1 ade2-1, his3-11,15, MRPL34::HIS3</i>	Este trabalho

3.2 *Procedimentos gerais para manipulação de S. cerevisiae e E. coli*

- Meios de cultura para crescimento de levedura e bactéria (ROSE et al., 1990).
- Transformação de *E. coli* com DNA exógeno, preparação de bactérias competentes pelo método de CaCl_2 , reações de polimerase em cadeia (PCR), ligações entre moléculas de DNA, eletroforese e recuperação de DNA de gel por eletroeluição (SAMBROOK et al., 1989).
- Preparação de DNA plasmideal em média escala por lise com Triton (AUSUBEL et al., 1989).
- Transformação de *S. cerevisiae* (SCHIELSTL; GIETZ, 1989).
- Micromanipulação de ascos (SHERMAN; HICKS, 1991).
- Mini preparação de DNA plasmideal (BIRNBOIM; DOLY, 1979).
- Mini preparação de DNA genômico de levedura (HOLM et al., 1986).
- Quantificação de proteínas (LOWRY et al., 1951).
- Análise de proteínas por SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970).
- Transferência para nitrocelulose e imunodecoração (TOWBIN et al., 1979).
- Os iniciadores utilizados estão descritos no Apêndice A.

3.3 *Construção de mutantes nulos*

Inicialmente, as regiões codificadoras dos genes de interesse foram amplificadas por PCR e os fragmentos resultantes ligados em vetores de clonagem. Em seguida, duas estratégias foram utilizadas. Na primeira, a região central do gene a ser interrompido foi removida com auxílio de enzimas de restrição e a marca de seleção inserida no lugar da sequência retirada (Apêndice B).

A segunda estratégia foi utilizada nos casos em que não havia sítios de restrição adequados, sendo assim foi necessário transferir a ORF para um vetor menor, amplificar com iniciadores que continham sítios de restrição e que foram desenhados de maneira que amplificassem uma pequena porção da ORF e todo o plasmídeo (ver Apêndice B). Em seguida a marca de seleção foi inserida.

Nos dois casos, o cassete foi utilizado na transformação da levedura. A substituição do gene selvagem pelo gene interrompido ocorreu por recombinação homóloga (ORRWEAVER; SZOSTAK, 1983).

3.4 Construção de mutantes sensíveis à temperatura

Para gerar mutantes sensíveis à temperatura, a ORF foi amplificada por PCR propenso a erro, em quatro reações de PCR separadas. Utilizou-se MgCl_2 (1,5 mM), pequena quantidade de MnCl_2 (0,05 mM), quantidade limitante de um dos desoxinucleotídeos (0,02 mM) e habitual dos outros três (0,1 mM).

Os amplicons foram reunidos, clonados em vetor centromérico e transformados em *E. coli*. Foi extraído DNA deste *pool* de clones e procedeu-se com a transformação no mutante diplóide heterozigoto. As leveduras transformadas foram induzidas à esporulação pelo crescimento em meio KAc sólido (0,5% de extrato de levedura, 1% de acetato de potássio, 0,05% de glicose, 2% ágar) e os ascósporos tratados com glusulase para rompimento da parede do asco.

A massa de esporos foi plaqueada em meio seletivo para a respiração (YPEG) e o crescimento testado na temperatura permissiva (30 °C) e restritiva (37 °C).

3.5 Construção de ORFs fusionadas com epítomos

A ORF *YDR115w*, juntamente com seu promotor endógeno, foi clonada em um plasmídeo contendo o epítipo ProteínaC-Histidina e em outro plasmídeo com o epítipo da Biotina (cortesias do Dr. Alexander Tzagoloff, Columbia University), excluindo-se o códon de terminação da ORF.

Também foi feita uma fusão do epítipo da Hemaglutinina (HA) na porção N-terminal de *YDR115w*, após o códon de iniciação.

Para as ORFs *YDL119c* e *YOR022c* foi utilizado o epítipo da Hemaglutinina, adicionado através de iniciadores e amplificação por PCR, antes do códon de terminação da ORF.

3.6 Isolamento de mitocôndrias

As linhagens foram pré-crescidas em 50 mL de YPGal por 24h e transferidas para um inóculo de 800 mL de YPGal, o qual cresceu por 18 horas, sob agitação. As células foram digeridas com zimoliase (1 mg/ml), rompidas utilizando-se homogeneizador tipo Potter e agitador Blender. As mitocôndrias foram isoladas por centrifugação diferenciada, sendo lavadas e suspensas em tampão contendo 0,6 M Sorbitol, 10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA (FAYE et al., 1974).

3.7 Ensaios de solubilidade protéica

Para verificar a solubilidade, proteínas mitocondriais na concentração de 10 mg/mL foram sonicadas por 10 segundos (Processador ultrassônico Vibra Cell – Sonics) e centrifugadas 30.000 g por 30 minutos. O sobrenadante foi coletado e o precipitado suspenso em volume equivalente de tampão. Uma alíquota da suspensão do precipitado foi guardada e o restante foi incubado com um volume de carbonato de sódio (0,2 M) por 30 minutos em gelo. Repetiu-se a centrifugação.

3.8 Localização protéica intramitocondrial

Foram preparadas mitocôndrias que mantiveram a membrana externa intacta. Para isso, durante o processo de extração é utilizado apenas o homogeneizador tipo Potter e as mitocôndrias são lavadas e suspensas em tampão 0,6 M Sorbitol, 20 mM HEPES (GLICK, 1995).

Em seguida, 160 uL de mitocôndrias na concentração de 10 mg/mL foram divididos em 4 tubos e receberam tratamentos diferenciados, conforme Tabela 3.

Tabela 3 - Tratamentos realizados para localização protéica intramitocondrial

	1	2	3	4
Mitocôndria	40 µL	40 µL	40 µL	40 µL
0,6 M Sorbitol;10mM Hepes pH 7,5	210 µL	210 µL	-	-
10 mM Hepes pH 7,5	-	-	210 µL	210 µL
Proteinase K 10 mg/ml	-	2,5 µL	-	2,5 µL

As amostras foram incubadas em gelo por 60 minutos. Foi adicionado 5,0 µL de PMSF 100 mM. Centrifugou-se 24.000 g, por 25 minutos. Separou-se o sobrenadante. O precipitado foi suspenso em 100 µL de 0,6 M Sorbitol; 20 mM Hepes. Adicionaram-se 10 µL de ácido tricloroacético 50%. Centrifugou-se por 5 minutos e suspendeu o precipitado em 110 µL de tampão Laemmli.

3.9 Fusão com *trpE* para produção de anticorpo

A construção híbrida *YDR115w/trpE* foi obtida por clonagem da ORF no vetor pATH11. Já a construção de *YOR022c/trpE* no feita no vetor pATH21 (KOERNER et al., 1991), ambas de forma que ficassem em fase com *trpE* de *E. coli*.

As proteínas insolúveis foram purificadas da seguinte maneira: após corar parte do gel de poliacrilamida 12,5% com azul de commassie, a banda correspondente à proteína de fusão foi excisada e eletroeluída. Ao volume recolhido, foi adicionada acetona gelada e após centrifugação, o precipitado foi seco a vácuo e suspenso em tampão Tris/EDTA gelado. Adicionou-se 1m M de NaOH e 0,02% de SDS. Depois de centrifugado, o sobrenadante foi

dialisado e concentrado com polietilenoglicol na porção exterior da membrana. Cerca de 2mg de proteína desnaturada foi entregue à empresa VBP Biotecnologia LTDA para a produção dos anticorpos policlonais.

3.10 Ensaio de crescimento com diluição seriada

A capacidade de crescimento em meio seletivo para respiração (YPEG) foi analisada plaqueando-se 3 µL de suspensão celular concentrada e diluída (10 x, 100 x, 1000 x, 10000 x), de forma sequencial, em meio YPD e YPEG.

3.11 Quantificação de cardiolipina

A extração de lipídio (BLIGH; DYER, 1959) foi realizada a partir de 0,6 mg de mitocôndrias isoladas (FAYE et al., 1974). Após a extração, as amostras foram secas em nitrogênio e solubilizadas em 50 µl de clorofórmio:isopropanol (1:1, v/v). Um volume de 10 µl foi aplicado manualmente em uma placa TLC sílica gel 60 F254 e separados por cromatografia de camada delgada. A placa foi revelada com spray de ácido sulfúrico (50%) e aquecimento até a visualização das bandas como *spots* marrons escuros. A análise de densitometria das bandas foi feita com o programa ImageJ (LUEVANO-MARTINEZ et al., 2013).

Este experimento foi realizado no laboratório da Dra. Sayuri Miyamoto, do Instituto de Química da USP, com o auxílio da Pós-doutoranda, Patrícia Apollinário.

3.12 Detecção de proteínas biotinadas

Após a separação das proteínas por SDS-PAGE e transferência para nitrocelulose, a membrana foi lavada duas vezes com leite 1,5% preparado em tampão contendo 10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA, 0,1% Triton. Em seguida, adicionou-se 50 uL de peroxidase conjugada com avidina em 10 mL de leite 1,5% . Após incubar por 15 minutos, lavou-se uma vez com tampão contendo NaCl 1 M e uma vez com PBS. Adicionou-se o substrato cromogênico 4-cloro-1-naphtol (3 mg dissolvido em 1 mL de etanol) a 5 mL de PBS contendo 5 uL de peróxido de hidrogênio e incubou-se a membrana com esta mistura. A bioluminescência apareceu em alguns minutos (CRONAN, 1990).

3.13 Purificação de ribossomos mitocondriais

A extração de ribossomos mitocondriais foi realizada a partir de 8mg de mitocôndrias frescas. Inicialmente foi feita lise com 1% deoxicolato (tampão AMT: 10 mM Tris-Cl, pH 7,5; 10 mM MgCl₂, 500 mM NH₄Cl₂; 6 mM 2-mercaptoetanol). Após centrifugar 36.000 g

por 20 minutos (Sorvall, rotor 70.1 TI), o sobrenadante foi colocado cuidadosamente no topo de uma solução 50% sacarose (em tampão AMT) e centrifugado 229.000 g, por 16 horas, no mesmo rotor.

O precipitado – que contem os ribossomos – foi suspenso em 400 uL de AMT e centrifugado 15.700 g, por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e repetiu-se a centrifugação, até não se observar mais a presença de precipitados. Para o fracionamento dos ribossomos foi utilizado gradiente de sacarose 10-30% (DE SILVA et al., 2013; PAUL et al., 2012). Foram coletadas cerca de 15 frações, as quais foram analisadas por *Western blot*.

3.14 Análise de peptídeos mitocondriais recém-sintetizados

Poli-peptídeos mitocondriais recém sintetizados foram marcados *in vivo* com [³⁵S] metionina/cisteína (7 mCi/nmol), em células de leveduras previamente tratadas com cicloheximida (HERRMANN et al., 1994). As amostras foram centrifugadas e tratadas com excesso de metionina e cisteína não marcadas. Foi feita a separação protéica em gel de poliacrilamida (17.5%) (BARROS et al., 2011). Após a eletroforese, transferiu-se as proteínas para membrana de nitrocelulose, que, após seca à 80 °C por 1 hora, foi exposta a filme de raios-X.

3.15 Conservação de resíduos e análise de correlação

Com a colaboração do Dr. Lucas Bleicher, da Universidade Federal de Minas Gerais, foram realizados alinhamentos com a proteína codificada por *YDR115w*, utilizando-se mais de 4000 sequências obtidas utilizando-se o código PF00468 do PFAM (FINN et al., 2010). Para o alinhamento utilizou-se o programa Muscle (EDGAR, 2004).

As sequências foram filtradas por tamanho para eliminação de fragmentos (mínimo de 80% de cobertura em relação à sequência de referência), por identidade mínima de 20% e por identidade máxima para eliminação de redundância (para qualquer par de sequências com mais de 80% de identidade, uma delas é eliminada, preferencialmente a de menor tamanho). Após a aplicação destes crivos, obteve-se um alinhamento final de 367 sequências, as quais foram empregadas na análise de frequência e redes de correlação de resíduos (Bleicher et al., 2011).

3.16 Mutagênese sítio dirigida

A estrutura de Mrpl34p (AMUNTS et al., 2014) está disponível no “Protein Data Bank” (PDB), com o código de acesso 3J6B. Utilizando-se o programa PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3 Schrödinger, LLC), é possível identificar prováveis

sítios de interação da proteína madura com outros componentes da subunidade maior do ribossomo.

Para determinar os resíduos que seriam mutagenizados, além desses pontos de interação citados acima, também foi considerado o grau de conservação de resíduos de Ydr115wp e as regiões mutadas aleatoriamente nos alelos TS.

Desta forma determinamos três resíduos para a construção de mutantes de ponto. A estratégia utilizada está explicada no Apêndice C.

3.17 Análise da porção N-terminal de Ydr115wp

Para analisarmos a região N-terminal de Ydr115wp, foi utilizado vetor YCplac22 (GIETZ; SUGINO, 1988) previamente construído no laboratório, o qual contém o promotor constitutivo GPD (gliceroldeído-3-fosfato desidrogenase), clonado entre *SacI* e *BamHI* e a sequência de endereçamento mitocondrial do gene *ATP9* de *Neurospora crassa* clonado em *BamHI*.

Utilizando-se iniciadores específicos, na primeira fusão foi mantido a partir do resíduo 55 de Ydr115wp, na segunda a partir do resíduo 61 e na terceira, a partir do resíduo 65.

3.18 Extrato mitocondrial em gradiente de sacarose

As propriedades de sedimentação das proteínas ribossomais em gradiente de sacarose foram analisadas (DE SILVA et al., 2013). Para isso, mitocôndrias da linhagem selvagem e do mutante *ydr115w-ts* foram extraídas. Quatro mg foram solubilizados em 400uL de tampão de extração (20 mM Hepes pH 7,4, 25 mM KCl, 0,5 mM PMSF, 0,8% Triton X100, 5 mM EDTA ou 0,5 mM MgCl₂) e mantidos em gelo por 5 minutos. O extrato obtido por centrifugação a 27.000 g por 15 minutos foi aplicado em um gradiente contínuo de sacarose 0,3 M – 1,0 M, contendo 20 mM Hepes pH 7,4, 25 mM KCl, 0,5 mM PMSF, 0,8% Triton X100, 5 mM EDTA ou 0,5 mM MgCl₂.

Após a centrifugação por 3 horas e 10 minutos a 40.000 rpm (rotor Beckman 55Ti), foram coletadas 14 frações de igual volume. Destas, 40 uL foram utilizados para determinar a distribuição de proteínas do ribossomo mitocondrial nos imunoenaios.

3.19 Isolamento de RNA dos transcritos mitocondriais e Northern Blot

Mitocôndrias foram preparadas a partir de células cultivadas em meio YPGal nas temperaturas de 30° ou 37 °C. A extração do RNA total foi realizada inicialmente com amostras mitocondriais sob a concentração proteica de 5 mg/mL (em 0,4 mL de amostra). Foi adicionado um volume igual ao da amostra do tampão composto por 1% SDS, 0,5 mM EDTA

e 100 mM NaCl, para solubilizar as mitocôndrias. Em seguida foi adicionado um volume igual do Reagente TrizolTM, a mistura foi centrifugada a 13.200 rpm por 5 minutos em um microtubo de 2 mL e cerca de 0,7 mL foi coletado do sobrenadante e transferido para um novo tubo. A extração foi seguida pela adição do mesmo volume presente em cada tubo de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) seguida de centrifugação (5 minutos a 13.200 rpm), o sobrenadante foi coletado, transferido para um novo tubo. Em seguida foi realizada a precipitação dos ácidos nucleicos pela adição de 0,05 volume de NaCl 5 M e três volumes de etanol 100%, a mistura foi incubada em gelo seco por 5 minutos para acelerar o processo e depois centrifugada a 13.200 rpm por 5 min. O precipitado obtido foi lavado 3 vezes com etanol 80% e foi secado em um concentrador (EppendorfTM VacufugeTM Concentrator) e a quantificação foi realizada utilizando NanoDrop ND1000 (NanoDrop Technologies). Cerca de 2,5 – 3 µg da amostra de RNA total mitocondrial foi separado em gel de agarose 1 ou 2%, dependendo do tipo de RNA a ser verificado. O gel foi corado com brometo de etídeo, fotografado e os RNAs foram transferidos para uma membrana de nylon (Nytran®—SuPerCharge, TurboBlotterTM GE). Após a transferência foi realizado o cross-link utilizando luz UV, seguida da pré-hibridização da membrana, a 43 °C com 125 µg de DNA de esperma de salmão em 5x SSC, 5x Denhardtts (Ficoll 1% tipo 400, polivinilpirrolidona 1% e albumina do soro bovino 1%) e SDS 0,5%. O RNA presente na membrana foi hibridizado “*overnight*” a 43 °C com sondas específicas para *tRNAQ*, *tRNAP*, *tRNAS*, *tRNAE*, *COX2* e *COB1*. A preparação dos oligonucleotídeos das sondas de tRNA foi realizada em nosso laboratório (SCHONAUER et al., 2008). As sondas foram marcadas na extremidade 3' com biotina, utilizando um kit de marcação (Thermo Scientific).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO PARCIAL

Os resultados e discussão parcial serão apresentados separados por ORF.

4.1 *Resultados e discussão parcial - MRPL34*

YDR115w apresenta similaridade com o gene L34 de *E. coli* e *MRP-L34* de humanos, fazendo parte da subunidade maior dos mitorribossomos (GAN et al., 2002). Dada a homologia, será chamada de *MRPL34*.

A mitocôndria de *S. cerevisiae* contém ribossomos 74S que consistem de uma subunidade menor de 37S, formada por rRNA 15S e cerca de 34 proteínas. Já a subunidade maior 54S possui rRNA 21S e pelo menos 44 proteínas (Smiths et al., 2007). Todas as proteínas constituintes dos mitorribossomos são codificadas pelo DNA nuclear, com a única exceção de Var1p, que em *S. cerevisiae* é codificada pelo mtDNA.

Recentemente, um grupo de pesquisadores do Reino Unido disponibilizou a estrutura da subunidade maior do ribossomo mitocondrial de levedura, confirmando a presença de Mrpl34p como parte desta composição (AMUNTS et al., 2014). Mrpl34p possui 105 resíduos, mas na forma madura apresentada por Amunts e colaboradores estão presentes apenas os 44 resíduos finais.

4.1.1 Mutante nulo e mutantes sensíveis à temperatura

É possível obter comercialmente mutantes nulos para cada um dos genes de *S. cerevisiae*, tendo como genótipo parental a linhagem BY4741 (BRACHMANN et al., 1998). Essa linhagem possui o gene *HAP1* mutado, cuja proteína atua como fator regulador de transcrição para diversos genes cujas proteínas estão envolvidas no metabolismo energético da célula. Essa, entre outras diferenças genéticas, contribui para a reduzida capacidade respiratória da linhagem BY4741 que é inclusive refletida na sua baixa capacidade de esporulação, quando comparada com outras linhagens laboratoriais.

Desta forma, optamos por não utilizar os mutantes da coleção e sim construí-los na linhagem W303 (Rodney Rothstein, Columbia University) que é mais apropriada para estudos relacionados à biogênese mitocondrial.

O mutante nulo para a ORF *MRPL34* apresenta alta instabilidade no DNA mitocondrial (mtDNA), gerando a formação de células *petites*. Essas células, conhecidas há mais de 60 anos (EPHRUSSI; HOTTINGER, 1949), quando crescidas em meio com fonte de carbono fermentável, originam colônias de tamanho reduzido, as quais não crescem em meio com fonte de carbono não fermentável, como etanol/glicerol.

A confirmação da perda de mtDNA nos mutantes $\Delta mrpl34$ foi realizada através de testes genéticos de cruzamento com as linhagens de referência aCB11, e α KL14 desprovidas de mtDNA (ρ^0). Os diplóides gerados a partir desses cruzamentos foram incapazes de crescer em meio contendo fonte de carbono não fermentável, concluindo-se que os isolados iniciais de *mrpl34* estavam desprovidos de material genético mitocondrial, já que não houve complementação.

A falta das proteínas participantes da replicação/manutenção do mtDNA é prejudicial à estabilidade do próprio DNA mitocondrial. Entretanto, diversos outros fatores de forma pleiotrópica afetam indiretamente a estabilidade do DNA organelar em *S. cerevisiae*, como, por exemplo, deficiências na maquinaria geral de tradução mitocondrial (MYERS et al., 1985).

Uma estratégia utilizada para estudar mutantes que perdem mtDNA é através de alelos sensíveis à temperatura (ts). Estas linhagens, na temperatura permissiva, exibem comportamento selvagem, relacionado à manutenção do mtDNA. Na temperatura restritiva, podemos monitorar o fenótipo especificamente relacionado ao mutante.

Utilizando a técnica de PCR propenso a erro descrito no Material e Métodos, conseguimos isolar dois alelos ts para *MRPL34*. O fenótipo de crescimento do mutante nulo e dos ts obtidos pode ser visto na Figura 3.

Figura 3 - Propriedades de crescimento do mutante nulo e dos mutantes ts de $\Delta mrpl34$.

Com o teste de diluição seriada, após três dias, é possível observar que o mutante nulo não cresce no meio não fermentável (etanol/glicerol) e os mutantes ts apresentam crescimento inibido em YPEG 37 °C.

O mutante ts1 apresenta duas alterações de resíduos, sendo a primeira na posição 90, de uma lisina para uma arginina (K90R) e a segunda na posição 95, havendo a troca de uma arginina por um triptofano (R95W).

O ts 2 apresenta três alterações. A primeira no resíduo 58, de uma arginina para uma glicina (R58G), a segunda também na posição 90 (K90R) e a terceira, assim como no ts1, na posição 95, porém há a substituição de uma arginina por uma serina (R95S).

Os dois ts que obtivemos apresentam mutação em dois resíduos iguais, o 90 e 95. Logo, esses resíduos devem ser importantes para a estabilidade da proteína.

4.1.2 Mutagênese sítio dirigida

Com o objetivo de identificar resíduos chave para a função da proteína, foram gerados 3 mutantes de ponto.

Para a seleção dos resíduos que seriam mutados, analisamos as potenciais interações entre Mrpl34p e os demais componentes da subunidade maior do ribossomo mitocondrial, utilizando a estrutura protéica disponível por Amunts e colaboradores (2014).

Também consideramos as informações da análise de conservação e correlação de resíduos realizada pelo Dr. Lucas Bleicher. A correlação de resíduos de aminoácidos de uma dada família de proteínas tem sido utilizada como ferramenta para avaliação funcional de certo conjunto de resíduos na estrutura e função da proteína (BLEICHER et al., 2011). Para a família de Mrpl34p não encontramos comunidades de aminoácidos que significativamente formassem redes de correlação, mas pelo menos dois resíduos chamaram atenção pela sua alta conservação e possível interação com 21SRNA e outras proteínas ribossomais: F79 e W101.

Desta forma, optamos por gerar uma mutação na posição F79, um resíduo altamente conservado (identidade de 96,2% em relação às sequências alinhadas) e que possivelmente faz interação com 21SRNA. A fenilalanina 79 foi substituída por uma alanina (F79A). Segundo as análises do Dr. Lucas Bleicher, este resíduo aparenta ser bastante importante para a estabilidade da proteína, desta forma optamos por fazer uma substituição por aminoácidos da mesma classe. Também geramos uma mutação pontual no triptofano 101. Este aparenta fazer interação com outras proteínas ribossomais (Mrpl40p e Mrp20p) e também com o 21SRNA, sendo conservado entre as sequências estudadas. Foi feito o mutante W101R (de apolar para polar básico).

Embora esperássemos que essas mutações em resíduos conservados refletissem em algum fenótipo de crescimento em meio seletivo para a atividade respiratória, esse não foi o resultado observado (Figura 4). Por outro lado, não chegamos a avaliar se os ribossomos desses mutantes apresentam algum acúmulo de precursores de montagem que seria reflexo de um menor *fitness* das linhagens F79A e W101A. De qualquer maneira essa possível menor adequação de montagem não chega a refletir na capacidade de crescimento dos mutantes.

Figura 4 - Propriedades de crescimento dos mutantes de ponto de MRPL34.

Com o teste de diluição seriada, após três dias, é possível observar que os mutantes restauraram a capacidade respiratória.

Considerando as mutações obtidas espontaneamente nos mutantes TS, também optamos por criar um mutante com uma única alteração na R95 (Figura 5), por ser uma posição altamente conservada (99,7% de identidade) e segundo a estrutura cristalográfica, deve haver interação deste resíduo com 21SRNA. Desta forma foi gerado o mutante R95W (de polar básico para apolar).

Figura 5 - Propriedades de crescimento dos mutantes ts de MRPL34 e do mutante R95W.

Com o teste de diluição seriada, após três dias, é possível observar que o mutante R95W ($\Delta mrpl34$ /R95W) exibe um fenótipo deficiente respiratório sutil na temperatura restritiva.

Quando comparamos o crescimento dos ts gerados aleatoriamente (contêm as duas mutações na porção madura da proteína) com o mutante que contém apenas uma mutação (Figura 5), observamos um melhor crescimento do mutante R95W na temperatura permissiva em relação aos mutantes ts, mas podemos ainda considerar seu crescimento de caráter intermediário em relação à linhagem parental.

Este fato sustenta a hipótese de que os dois resíduos: R95 e K90 são importantes para estabilidade da proteína, e que a mutação simultânea deles seria responsável pela perda da função de Mrpl34p e conseqüente incapacidade de crescimento no meio contendo fonte de carbono não fermentável na temperatura não permissiva.

4.1.3 Localização e importação de Mrpl34p

No início do projeto, tínhamos a intenção de fazer ensaios de localização protéica, pois esta é uma etapa importante na determinação da função de uma proteína. Para isso, realizamos duas fusões com epítomos distintos na porção carboxi-terminal de Mrpl34p (epítomo da ProteínaC-Histidina e Biotina). Porém, essas *tags* adicionadas comprometeram a atividade da proteína, o que inferimos pela manutenção do fenótipo deficiente respiratório.

Optamos por insistir nesta análise e transformamos a linhagem selvagem W303-1A com Mrpl34p biotinada (Mrpl34-BIO). Neste ensaio, foi revelada uma banda no tamanho esperado – 12 KDa (Figura 6) na linhagem parental contendo Mrpl34p-BIO, mas não na linhagem mutante $\Delta mrpl34$ com Mrpl34p-BIO.

Como mencionado acima, a construção Mrpl34p-BIO é incapaz de restaurar o fenótipo do mutante nulo *mrpl34*. Nesse caso, as células não mantêm mtDNA e dessa maneira toda a linha de montagem de ribossomos mitocondriais é abolida, também pela ausência de rRNAs 15S e 21S e da proteína Var1p (constituente da subunidade menor do ribossomo mitocondrial). Assim, podemos explicar a detecção do produto Mrpl34-BIO na linhagem selvagem transformada, pelo fato da linhagem selvagem ter a linha de montagem dos ribossomos mitocondriais intacta e dessa maneira a proteína Mrpl34p-BIO se une a um complexo inicial de montagem, tornando-se mais estável e passível de ser detectada.

Na linhagem parental também é possível identificar duas bandas que possivelmente correspondem a uma forma não processada (banda maior) e outra processada (banda menor) da Mrpl34p-BIO.

Figura 6 - Mrpl34p fusionada à biotina é detectada em mitocôndrias isoladas

A banda é detectada na linhagem selvagem W303-1A transformada com o plasmídeo epissemal contendo a ORF *MRPL34* fusionada com biotina, na porção C-terminal. O ensaio foi revelado por reação da biotina com avidina, conjugada com peroxidase, na presença de peróxido de oxigênio e substrato cromogênico. Foram utilizados 40 µg de proteína. Na linhagem selvagem são observadas duas bandas, sendo a maior possivelmente resultado da proteína não processada.

Devido a não funcionalidade da adição de “tags” a porção C-terminal de Mrpl34p, e da falta de uma sequência típica e processável de endereçamento mitocondrial na porção N-terminal, optamos por tentar localizar a Mrpl34p pela adição de epítipo de Hemaglutinina (HA) na sua porção N-terminal.

A fusão de HA à porção N-terminal de Mrpl34p mostrou-se funcional e complementou o fenótipo do mutante $\Delta mrpl34$, o que foi verificado após transformação do diplóide heterozigo $a/\alpha W303\Delta mrpl34$, com plasmídeo expressando Mrpl34p-HA, seguido por dissecação de tétrades e avaliação positiva de crescimento dos esporos contendo o mutante nulo *mrpl34* e Mrpl34p-HA em meio contendo fonte de carbono não fermentável (dados não mostrados).

Porém não foi possível detectar a Mrpl34p-HA nos imunoenaios, sugerindo que a região N-terminal foi processada e removida da proteína madura. Essa hipótese foi de certa maneira confirmada pela revelação da estrutura da subunidade maior do ribossomo mitocondrial no qual Mrpl34p não contém 60 resíduos de aminoácidos da porção N-terminal (AMUNTS et al., 2014).

As proteínas constituintes dos ribossomos mitocondriais de *S. cerevisiae* podem ser divididas em três grandes grupos: homólogas à proteínas ribossomais de bactérias; homólogas à proteínas ribossomais de outros eucariotos; proteínas típicas de levedura. Mrpl34p e outras proteínas pertencentes ao primeiro grupo, embora encontrem homólogos bacterianos, na sua sequência grandes extensões amino ou carboxi terminal são encontradas. Em muitos casos essas extensões atuam preenchendo lacunas que, no ribossomo bacteriano é ocupado por RNA ribossomal (AMUNTS et al., 2014). Entretanto esse não parece ser o caso de Mrpl34p, sua extensão N-terminal não está presente em *E. coli* mas também não faz parte da proteína madura (AMUNTS et al., 2014).

A fim de avaliar o papel da extensão N-terminal de Mrpl34p na montagem do mitoribossomo 54S, fizemos um alinhamento entre Mrpl34p e proteínas ortólogas de fungos, plantas e mamíferos (Figura 7).

Figura 7 - Alinhamento parcial de Mrpl34p.

<i>Zebrafish</i>	66	---	PLWNHQVVRTV	RGTEYQPSN	IKRKRT	HGWIKR	ISTPGG	IEVILRR	MIKGRKSL	TH-
<i>H. sapiens</i>	36	--	WGLPTPQQARG	KARGNEYQPSN	IKRKNR	HGWVRR	ISTPAG	VQVILRR	MIKGRKSL	SH-
<i>P. troglodytes</i>	36	--	WGLPTPQQARG	KARGNEYQPSN	IKRKNR	HGWVRR	ISTPAG	VQVILRR	MIKGRKSL	SH-
<i>S. cerevisiae</i>	54	IGQ-----	RRWKS	RGNTYQPS	TIKKRRT	FGFLAR	AKSKQGS	KILKKR	KIKGRWFL	SH-
<i>Z. rouxii</i>	46	MGQ-----	RRWKS	RGNTYQPS	TIKKRRT	VGFLAR	AKSKQGS	KILQRR	KHKGRWFL	TH-
<i>D. melanogaster</i>	24	DKH-AFNRAVL	RPKVRCH	FPPKMEV	KRINVHG	ANAR	STPEGR	VLMNR	TIKGRHNL	SH-
<i>N. crassa</i>	91	QIR----	CG-PR----	PTMSGAT	RVQKR	RHGFLSR	VTKNGQ	TLKRL	AKGRLR	LSA-
<i>S. pombe</i>	57	MQ-----	Q-VRWK	TYGNEYQPS	NRKKR	RHGFLSR	RSVNGR	VLRDR	CKGRMYL	SH-
<i>O. sativa</i>	89	DGKDPVANE-	PLELLPKRT	YQPS	TIKKRRT	HGFLTR	KSTKGG	RKVIARR	AKGRHR	ISV-
<i>E. coli</i>	1	-----	-----	MKRTFQPS	VTKRNR	SHGFRAR	ATKNGR	QVLARR	AKGRAR	LVS-
<i>A. thaliana</i>	92	EVD--PSSE-	PLLLFPKRT	FQPS	TIKKRNR	HGFFARK	ATKGG	RKVIARR	AKGRHR	VTA-

O alinhamento foi realizado utilizando-se o programa Clustal Omega (SIEVERS et al., 2011) e apresentado conforme o BOXSHADE. Há grande identidade entre as sequências analisadas.

Desta forma, realizamos fusões de três porções da proteína Mrpl34p no vetor YCplac22 (GIETZ; SUGINO, 1988) contendo o promotor GPD1 (ALBERTYN et al., 1994) e a sequência de endereçamento mitocondrial do gene ATP9 de *N. crassa*, previamente construído em nosso laboratório.

Na primeira construção, mantivemos a partir do resíduo 55 de Mrpl34p, considerando a identidade entre as sequências de *Saccharomyces cerevisiae* e *Zygosaccharomyces rouxii*, um outro fungo.

Na segunda, a fusão teve início a partir do resíduo 61, seguindo a identidade entre as sequências de *Saccharomyces cerevisiae*, *Homo sapiens*, *Pan troglodytes*, mas principalmente as informações fornecidas pela estrutura cristalográfica disponível no trabalho de Amunts e colaboradores, 2014, onde a proteína madura aparentemente perde os primeiros 60 resíduos. Na terceira, conservamos a partir do resíduo 65, devido à similaridade com *E. coli*.

As três construções foram clonadas e transformadas tanto no mutante diplóide heterozigoto (W303Δmrpl34/MRPL34), quanto na linhagem selvagem haplóide. O imunoenensaio ilustrado na Figura 8 mostra que a proteína Mrpl34p, a partir do resíduo 65, corresponde a uma proteína funcional, capaz de desempenhar seu papel na tradução mitocondrial. As duas outras construções não foram funcionais.

Figura 8 - Fusão do peptídeo sinal de *ATP9* de *N. crassa* a partir dos 65 resíduos finais da proteína Mrpl34p

Células foram crescidas na temperatura permissiva e restritiva. Após o isolamento das mitocôndrias, foi feita a imunodeteção com anticorpo policlonal contra o epítipo da hemaglutinina na concentração 1:1000 e anticorpo secundário anti-rabbit IgG conjugado com peroxidase 1:2000 (Sigma). A proteína foi visualizada com o substrato quimioluminescente SuperSignal (Pierce).

A migração anômala em relação ao tamanho das bandas mostra algum produto de fusão não processado. **Amostra 1:** Linhagem mutante $\Delta mrp14$ transformada a partir do resíduo 65 de Mrpl34p; **Amostra 2:** Linhagem selvagem transformada a partir do resíduo 65 de Mrpl34p; **Amostra 3:** Linhagem mutante $\Delta mrp14$ transformada a partir do resíduo 65 de Mrpl34p termossensível; **Amostra 4:** Linhagem selvagem transformada a partir do resíduo 65 de Mrpl34p termossensível.

Através do crescimento por diluição seriada é possível verificar a viabilidade das linhagens (Figura 9).

Figura 9 - Viabilidade das linhagens com a construção YCplac22ATP9 MRPL34

As células das respectivas linhagens citadas foram diluídas de forma seriada e plaqueadas na temperatura permissiva (30 °C) e não permissiva (37 °C) em meio rico de cultura contendo glicose (YPD), ou etanol-glicerol (YPEG). A ausência de crescimento da linhagem mutante $\Delta mrp14$ transformada com os 65 resíduos finais de Mrpl34p termossensível em meio não fermentável está condizente com o esperado.

4.1.4 Montagem dos ribossomos mitocondriais

Ainda com o objetivo de localizar Mrpl34p nos ribossomos mitocondriais, obtivemos anticorpos específicos contra Mrpl34p a partir da geração de uma proteína recombinante trpE-Mrpl34p conforme descrito em Material e Métodos.

Os anticorpos recebidos pela empresa VBP Biotecnologia LTDA se mostraram com baixa atividade e como resultado, não atingimos as condições ideais para detecção de Mrpl34p.

Contudo, a partir da extração de mitocôndrias da linhagem selvagem W303-1A, isolamos os ribossomos por centrifugação e em seguida aplicamos essa amostra em um gradiente contínuo de sacarose, que foi submetido à ultracentrifugação por 16 horas. Cerca de 15 alíquotas foram coletadas por gravidade e empregadas nos imunoenaios, utilizando-se o anticorpo policlonal específico.

Detectamos a proteína Mrpl34p (Figura 10) nas frações 6 e 7, justamente nas frações onde foram detectadas as proteínas Mrpl2p e Mrpl1p, as quais compõem a subunidade maior do ribossomo mitocondrial. A proteína Mrpl10p, que faz parte da subunidade menor, foi revelada nas frações 8 e 9. Este resultado confirma a presença de Mrpl34p como constituinte do ribossomo mitocondrial da levedura, mais especificamente da subunidade maior 54S. Devido à deficiência desse anticorpo descrito acima, não pudemos utilizar o anticorpo nos ensaios subsequentes.

Figura 10 - Gradiente de sacarose de ribossomos mitocondriais

Os ribossomos foram extraídos de mitocôndrias frescas isoladas da linhagem W303-1A e aplicados em gradiente de sacarose 10-30%. A imunodetecção foi feita com anticorpo policlonal contra Mrpl34p (VBP Biotecnologia LTDA), na concentração 1:333, anti-MRPL2 e anti-MRPL1 na concentração de 1:1000 e anti-MRP10, 1:250 e anticorpo secundário anti-*rabbit* IgG conjugado com peroxidase (Sigma). As proteínas foram visualizadas com o substrato quimioluminescente SuperSignal (Pierce). Os números de 4 a 14 indicam as frações coletadas.

Um ponto importante na caracterização de uma proteína que compõe o ribossomo é a identificação de intermediários na formação da subunidade ribossomal na qual essa proteína está envolvida. Em *E. coli* há pelo menos três etapas de biogênese: inicial, média e tardia. O homólogo bacteriano de Mrpl34p é considerado de assimilação tardia ao complexo de montagem (SHAJANI et al., 2011).

Como o mutante nulo *mrpl34* não mantém seu mtDNA, não há nesse mutante o início de qualquer montagem de ribossomos mitocondriais. Entretanto, pudemos realizar o estudo de biogênese com os mutantes Mrpl34p termossensíveis.

A identificação de intermediários de montagem pode também ser observada através da extração das proteínas mitocondriais em condições que mantenham a associação dos mitoribossomos estáveis ou dissociados. Assim, pode-se fazer essa extração na presença de magnésio, que mantém a estrutura de monossomo 74S, e na presença de EDTA, onde há a dissociação entre as subunidades maior 54S e menor 37S dos ribossomos.

O laboratório do Dr. Barrientos desenvolveu condições extremamente bem determinadas para extração, formação de um gradiente de sacarose e fracionamento dos extratos (DE SILVA et al., 2013), e aplicamos essas condições nos mutantes *mrpl34* condicionais.

Os resultados com EDTA mostram um claro espalhamento da subunidade ribossomal 54S ao longo das frações do gradiente, indicando a presença de intermediários de montagem que estão sendo acumulados pela deficiência funcional de Mrpl34p termossensível (Figura

11). A imunodecoração de Mrp10 indica as frações de sedimentação da subunidade 37S (frações 6 e 7 para ambas linhagens). Os demais anticorpos indicam a sedimentação da subunidade 54S (frações 3 e 4 para a linhagem parental).

Figura 11 - Fracionamento das subunidades ribossomais na presença de EDTA

Células de levedura da linhagem parental (W303) e do mutante *mrp134 ts2* foram crescidas na temperatura restritiva (37 °C) em YPGal e suas mitocôndrias isoladas. As proteínas mitocondriais foram então extraídas na presença de 25mM KCl, 5mM EDTA, 0.1% Triton e carregadas em gradiente formado entre 1 M e 0.3 M de sacarose. Após ultracentrifugação, foram coletadas 14 frações idênticas e quantidades equivalentes das frações e do extrato inicial (Ex) examinado em gel SDS-PAGE 12%. Após eletroforese e transferência para nitrocelulose, as membranas obtidas foram imunodecoradas com os anticorpos indicados ao lado da figura.

O mesmo procedimento foi realizado com as amostras na presença de magnésio, que como mencionado anteriormente, permite a manutenção de monossomos (Figura 12). Marcadores utilizados para subunidade 54S (Mrp140, Mrp20) mostram na linhagem selvagem o pico de fracionamento entre as frações 1 e 2, e no mutante *mrp134/ts*, nas frações 3 e 4 - novamente confirmando a existência de intermediários de montagem nos ribossomos no mutante ts.

Figura 12 - Fracionamento das subunidades ribossomais na presença de Magnésio.

Células de levedura da linhagem parental (W303) e dos mutantes *mrp134 ts2* foram crescidas na temperatura restritiva (37 °C) em YPGal e suas mitocôndrias isoladas. As proteínas mitocondriais foram então extraídas na presença de 25 mM KCl, 0,5mM MgCl₂, 0.1% Triton e carregadas em gradiente formado entre 1 M e 0.3 M de sacarose. Após ultracentrifugação foram coletadas 14 frações idênticas e quantidades equivalentes das frações e do extrato inicial (Ex) examinado em gel SDS-PAGE 12%. Após eletroforese e transferência para nitrocelulose, as membranas obtidas foram imunodecoradas com os anticorpos indicados ao lado da figura.

4.1.5 Síntese protéica mitocondrial in vivo

A análise de peptídeos mitocondriais recém sintetizados é um passo importante na caracterização de mutantes que tem alteração na síntese protéica mitocondrial, seja pela deficiência em proteínas que atuam diretamente neste processo, ou por um efeito pleiotrópico decorrente da mutação estudada. A presença de cicloheximida, inibidor da síntese protéica citossólica, permite a visualização somente de proteínas traduzidas no interior da mitocôndria.

Conforme esperado, houve uma clara diminuição da síntese de proteínas do mutante *ts1*, quando crescido na temperatura restritiva, em comparação à mesma linhagem quando crescida na temperatura permissiva (Figura 13). A menor síntese de novos produtos mitocondriais na temperatura não permissiva corrobora a hipótese que Mrp134p está envolvido num processo geral da montagem do ribossomo mitocondrial.

A linhagem parental W303 apresentou menor síntese de citocromo b, por alguma razão que não pudemos identificar, entretanto ainda está clara a menor síntese do conjunto de proteínas mitocondriais da linhagem contendo o alelo *ts1* em relação a W303. O mutante nulo *mrp134* apresenta deficiência generalizada de síntese em virtude da falta de mtDNA em suas células e portanto não foi incluída nessa figura.

A linhagem identificada neste experimento como ts3 refere-se ao mutante R95W gerado por mutação sítio dirigida, o qual apresenta comportamento termossensível bem sutil e síntese protéica mitocondrial semelhante nas duas temperaturas de crescimento avaliadas.

Figura 13 - Síntese protéica mitocondrial.

Os produtos gênicos mitocondriais foram marcados com [³⁵S] metionina e [³⁵S] cisteína. As proteínas totais de quantidade equivalente de células foram separadas por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida, 17,5%, transferidas para membrana de nitrocelulose e esta foi exposta ao filme de raios-X. Observa-se diminuição da síntese protéica do mutante ts1, à 37°C., quando comparado ao crescimento à 30 °C.

4.2 Resultados e discussão parcial – *YPR116w*

A ORF *YPR116w* vem sendo estudada em nosso laboratório há alguns anos. Já havia sido verificado que o mutante nulo não consegue manter seu DNA mitocondrial, desta forma, para viabilizar seu estudo, foram gerados alelos sensíveis à temperatura. Todavia, mesmo dispondo desses alelos, não foi possível identificar nenhuma atividade respiratória mitocondrial, ou de montagem dos complexos respiratórios, particularmente afetada na ausência de Ypr116wp funcional.

4.2.1 Busca por parceiros genéticos

Analisando o banco de dados SGD, verificamos que Ypr116wp parece estar complexada com as proteínas codificadas por *YDR065w*, *YLR091w*, *PET130* e *RPM2*, cujos mutantes nulos também apresentam mtDNA instável. As três primeiras não têm função conhecida, mas Rpm2p possui papel bem caracterizado como subunidade da RNase P mitocondrial (MORALES et al., 1992).

Linhas diplóides heterozigotas para *YDR065w*, *YLR091w* e *PET130* foram geradas e os respectivos mutantes nulos obtidos após dissecação de tétrades também apresentaram deficiência respiratória aliada a alta instabilidade na manutenção do DNA mitocondrial.

Essa coincidência de fenótipos aliada à observação em escala proteômica da interação física entre *YPR116w* com *RPM2* e as outras ORFs nos levou a testar se a superexpressão de algumas delas atuaria como supressor multi-cópia dos mutantes *ypr116w*. Contudo, nenhum evento de recuperação de fenótipo foi observado nos clones transformantes, no entanto o mutante *ypr116w* termossensível aumentou a estabilidade de manutenção do DNA mitocondrial na presença de cópias extras de *YLR091w*. o que pode indicar uma atividade correlacionada (Figura 14).

Figura 14 - Contribuição de cópias extras de *YLR091w* para a estabilidade de *ypr116w* ts.

Após a transformação, as células foram crescidas em meio mínimo (WO) suplementado, por dois dias, para promover a manutenção do plasmídeo epissomal (YEP351). Foram plaqueadas cerca de 100 células em YPD e após 3 dias, foi feita a réplica para YPEG. A menor porcentagem de petites resultante da transformação com YLR091w foi estatisticamente significativa ($P < 0,05$).

4.2.2 *Mutantes ts*

Tendo em vista que os mutantes nulos das ORFs *YDR065w*, *YLR091w*, *PET130* e *RPM2* apresentam instabilidade no DNA mitocondrial, buscamos gerar mutantes termosensíveis. Foram obtidos alelos para *YLR091w* e *PET130* (Figura 15 e 16). Após sequenciamento, verificamos que no Ts1 de *ylr091w* ocorreu a mutação R108G e no Ts5 do *pet130* a mutação I213N.

Figura 15 - Propriedades de crescimento dos mutantes ts de *ylr091w*

Com o teste de diluição seriada, após três dias, é possível observar que os mutantes ts apresentam crescimento atrasado em YPEG 37 °C. O mutante ts3 também exibe crescimento reduzido na temperatura permissiva e não é um bom candidato aos estudos subsequentes.

Figura 16 - Propriedades de crescimento dos mutantes ts de *pet130*

Com o teste de diluição seriada, após três dias, é possível observar que os mutantes ts apresentam crescimento atrasado em YPEG 37 °C. O mutante ts1 também exibe crescimento reduzido na temperatura permissiva e não é um bom candidato aos estudos subsequentes.

4.2.3 Topologia e Solubilidade de *Ypr116wp* e parceiros

No ensaio de topologia são utilizados anticorpos específicos contra proteínas conhecidas, endereçadas para os diversos compartimentos da mitocôndria, como controle do experimento.

Sco1p (*Suppressor of Cytochrome Oxidase deficiency*) é uma proteína ligante de cobre localizada na membrana interna da mitocôndria, com face voltada para o espaço intermembranas, requerida para a atividade da citocromo c oxidase (BALATRI et al., 2003; NITTIS et al., 2001; SCHULZE; RODEL, 1988). Kgd2p é um componente do complexo alfa-ceto glutarato desidrogenase, localizada na matriz mitocondrial (REPETTO; TZAGOLOFF, 1990). Cytb2p é uma lactato citocromo oxirredutase, presente no espaço intermembranas (DAUM et al., 1982).

Na Figura 17 é possível observar que *Ypr116wp* e *Pet130p* são proteínas localizadas na membrana interna da mitocôndria, com face voltada para a matriz.

Figura 17 - Topologia de Ypr116wp e Pet130p

Mitocôndria (Mt) e mitoplastos (Mp) foram incubados em gelo, na presença ou ausência de Proteinase K (ProtK). Em seguida procedeu-se como descrito em Material e Métodos. Foram utilizados 20 μ g de proteína. A imunodeteção foi feita com anticorpo policlonal contra o epítipo da hemaglutinina, fusionado à ORF em questão. Além de anticorpos contra Scolp e α -Kgd2p, foram utilizados contra Cytb2p, localizada no espaço intermembranas. A numeração de 1 a 4 corresponde às preparações apresentadas na Tabela 3. Os anticorpos específicos foram doados pelo Dr. Alexandre Tazagoloff (Columbia University). **A:** Ensaio realizado para Ypr116wp fusionada ao epítipo da proteína C. **B:** Ensaio realizado para Pet130p fusionada ao epítipo da hemaglutinina.

Também realizamos três tratamentos com Ypr116wp, Pet130p e Ylr091wp a fim de verificar a solubilidade dessas proteínas. Na Figura 18 está o resultado do ensaio, mostrando que os três polipeptídeos são associados à membrana, sendo que Ypr116wp apresenta uma relação mais intrínseca.

Figura 18 - Solubilidade de Ypr116wp e parceiros

Mitocôndrias na concentração de 10mg/mL foram sonicadas (Branson) por 10 segundos e centrifugadas por 30 minutos, 22.000 rpm. O sobrenadante (SON) foi coletado e o precipitado (SON) suspenso em volume igual ao sobrenadante em tampão STE. Separou-se 20 uL do precipitado (SON) e o restante foi tratado com carbonato de sódio 0,2 M e incubado em gelo por 30 minutos, ou com 0,1% lauryl-dodecil sulfato. Repetiu-se a centrifugação para a separação das proteínas solúveis (sobrenadante CARB, sobrenadante DODECIL) das de membrana (precipitado CARB, precipitado DODECIL). À esquerda da imagem, a amostra descrita como mitocôndria é resultado de centrifugação diferencial. Foram utilizados 20 ug desta 10 ug das demais amostras em um gel de poliacrilamida 12%. Para a detecção de Pet130p foi utilizado anticorpo policlonal contra o epítipo da hemaglutinina. Para a detecção de Ylr091wp e Ypr116wp foi utilizado anticorpo policlonal contra o epítipo da proteína C. As três proteínas não são solubilizadas pela sonicação (estão majoritariamente no precipitado-SON). Pet130p e Ylr091wp são parcialmente solubilizadas com carbonato (sobrenadante-CARB), indicativo de associação periférica à membrana e solubilizadas com detergente (sobrenadante-DODECIL). Ypr116wp é solubilizada somente com detergente (sobrenadante-DODECIL), indicando associação intrínseca com a membrana.

4.2.4 *Ensaio de Northern blot*

Considerando a possível interação de Ypr116wp com proteínas relacionadas ao processamento de RNA transportadores mitocondriais, realizamos ensaios de *Northern blot*, utilizando sondas para os transcritos da citocromo oxidase 2 (*COX2*), do citocromo B1 (*COB1*), e os RNAs transportadores de serina, prolina, glutamina e ácido glutâmico.

Na Figura 19, observa-se uma clara diminuição na quantidade de tRNA no mutante *ypr116w* comparado com o selvagem, sugerindo o envolvimento de Ypr116wp no processamento de tRNAs. Também nesse ensaio observamos redução quantitativa dos transcritos controle *COB1* e *COX2*. O alto número de células pequenas gerados durante o crescimento das células para o isolamento de RNAs mitocondriais nesse ensaio em particular prejudica uma avaliação mais rigorosa do real efeito de Ypr116wp.

Figura 19 - Análise dos transcritos mitocondriais no mutante *ypr116w TS*

RNA extraído de células da linhagem selvagem (wt) e do mutante *ypr116w TS*. Os tRNAs mitocondriais foram separados em um gel 2% de agarose e os mRNAs, em um gel 1% de agarose, transferidos para uma membrana de nylon e os transcritos foram detectados com sondas biotinadas. Observa-se diminuição da quantidade dos tRNAs analisados de *ypr116w TS* em relação ao selvagem, assim como de mRNA de COB1 e COX2.

Realizamos o ensaio também para os mutantes TS *ypr116w*, *pet130* e *ylr091w*, submetendo o crescimento das linhagens à temperatura permissiva e restritiva (Figura 20). Os mutantes apresentam quantidade menor dos tRNAs analisados, em ambas as temperaturas de execução do experimento, comparado com a linhagem selvagem, sugerindo um envolvimento das respectivas proteínas no processamento de RNAs transportadores. No ensaio de *ylr091w* do tRNAQ, quando crescido por 7 horas à 37 °C observa-se uma banda alta, podendo se tratar de um intermediário, não adequadamente processado.

Figura 20 - Análise de transcritos mitocondriais no mutante *ypr116w ts* e parceiros

As linhagens foram crescidas à 30 °C somente, ou por uma fração de 7 horas do período à 37 °C. RNA total foi extraído de células da linhagem selvagem (wt) e mutante TS *ypr116w*, *pet130* e *ylr091w*. Os tRNAs mitocondriais foram separados em um gel 2% de agarose e os mRNAs, em um gel 1% de agarose, transferidos para uma membrana de nylon e os transcritos foram detectados com sondas biotinadas. Observa-se diminuição da quantidade dos tRNAs analisados dos mutantes TS em relação ao selvagem.

4.3 Resultados e Discussão parcial – YDL119c

Um ano após o sequenciamento do genoma da levedura, o produto gênico da ORF *YDL119c* foi filogeneticamente relacionado a um carreador mitocondrial (ELMOUALIJ et al., 1997). Outros trabalhos (BELENKIY et al., 2000; DEL ARCO; SATRUSTEGUI, 2005; PALMIERI et al., 2006) também enquadram esta proteína na família de carreadores mitocondriais, mais especificamente como um ortólogo da humana *SLC25A38*, apresentando 33% de identidade (HAITINA et al., 2006).

Os carreadores de soluto SLC25 são responsáveis pelo transporte de uma grande variedade de moléculas relacionadas à mitocôndria, estando localizados na membrana interna da organela (HAITINA et al., 2006). Mutações no gene *SLC25A38* estão relacionadas a uma forma autossômica recessiva de anemia sideroblástica (GUERNSEY et al., 2009), caracterizada pela presença de eritroblastos anormais na medula óssea, contendo numerosos grânulos de ferro arranjados em anel (FLEMING, 2002).

Após a realização de alguns experimentos em *Zebrafish* e *S. cerevisiae*, foi sugerido que *SLC25A38* está relacionado com a importação de glicina para a mitocôndria e também exportação de 5-ALA (ácido 5-aminolevulínico) para o citoplasma (GUERNSEY et al., 2009). 5-ALA é um dos principais precursores da via de síntese de HEME, o que poderia explicar o fenótipo apresentado pelos pacientes portadores da síndrome (FLEMING, 2011)

4.3.1 Mutante nulo

O mutante nulo $\Delta ydl119c$ não exibe fenótipo deficiente respiratório claro, crescendo eficientemente em meio não fermentável (Apêndice D).

4.3.2 Descrição topológica

Na Figura 21 estão reunidos os resultados para Ydl119cp, uma proteína localizada na membrana interna da mitocôndria, com face voltada para o espaço intermembranas.

Figura 21 - Topologia de ydl119cp.

A, Mitocôndria da linhagem $\Delta ydl119c$ + YDL119c – HA (plasmídeo integrativo) foi extraída, 20 μ g foram aplicadas em gel SDS-PAGE 12% e transferidas para membrana de nitrocelulose. A imunodeteção foi feita com anticorpo policlonal contra o epítipo da hemaglutinina, fusionado à ORF em questão, na concentração 1:1000 e anticorpo secundário anti-rabbit IgG conjugado com peroxidase 1:2000 (Sigma). A proteína foi visualizada com o substrato quimioluminescente SuperSignal (Pierce).

B, Mitocôndrias na concentração de 10mg/mL foram sonicadas (Branson) por 10 segundos e centrifugadas por 30 minutos, 22.000 rpm. O sobrenadante (SON) foi coletado e o precipitado (SON) suspenso em volume igual ao sobrenadante em tampão STE. Separou-se 20 μ L do precipitado (SON) e o restante foi tratado com carbonato de sódio 0,2 M e incubado em gelo por 30 minutos. Repetiu-se a centrifugação para a separação das proteínas solúveis (sobrenadante CARB) das de membrana (precipitado CARB). À esquerda da imagem, a amostra descrita como Sob provem da centrifugação diferencial na extração de mitocôndria. Foram utilizados 20 μ g desta e das mitocôndrias e 10 μ g das demais amostras em um gel de poliacrilamida 12%. Para a detecção de Ydl119cp foi utilizado anticorpo policlonal contra o epítipo da hemaglutinina. Também foram utilizados anticorpos específicos para a detecção de Sco1p, uma proteína de membrana interna voltada para o espaço intermembranas e α -Kgd2p, proteína de matriz, participante do ciclo de Krebs, como controles da reação.

C, Mitocôndria (Mt) e mitoplastos (Mp) foram incubados em gelo, na presença ou ausência de Proteinase K (ProtK). Em seguida procedeu-se como descrito em Material e Métodos. Foram utilizados 20 μ g de proteína. A imunodeteção foi feita com anticorpo policlonal contra o epítipo da hemaglutinina, fusionado à ORF em questão. Além de anticorpos contra Sco1p e α -Kgd2p, foram utilizados contra Cytb2p, localizada no espaço intermembranas. A numeração de 1 a 4 corresponde às preparações apresentadas na Tabela 3. Os anticorpos específicos foram doados pelo Dr. Alexandre Tazagoloff (Columbia University).

4.3.3 Síntese protéica mitocondrial in vivo

A análise da capacidade de síntese protéica mitocondrial é uma etapa fundamental na caracterização de um possível mutante respiratório de *S. cerevisiae*.

Como o mutante $\Delta ydl119c$ não apresenta qualquer diferença significativa de síntese em relação à linhagem parental (Figura 23) é pouco provável que seu produto gênico esteja envolvido no processo de tradução protéica mitocondrial, como esperado.

4.3.4 Função de Ydl119cp

Em Janeiro de 2016 foi descoberta a função da proteína codificada por *SLC25A38*, devido aos estudos desenvolvidos com seu homólogo em levedura, *YDL119C*, nomeado de *HEM25*. *SLC25A38* é capaz de complementar a deficiência de heme associada ao mutante nulo $\Delta hem25$. De fato comprovou-se ser um transportador de glicina para a mitocôndria, mas não o único. Ymc1p atua como carreador secundário, quando o nível de glicina está elevado (FERNANDEZ-MURRAY et al., 2016).

4.4 Resultados e Discussão Parcial - YOR022c

A ORF *YOR022c* apresenta similaridade com a fosfolipase A1 (*Phosphatidic Acid-Preferring Phospholipase A1* - PA-PLA1) de testículo bovino (HIGGS et al., 1998) e com o gene *SGR2*, o qual codifica uma fosfolipase A1 envolvida no graviropismo de *Arabidopsis* (KATO et al., 2002). De fato Yor022cp possui a sequência consenso das lipases (GX SXG), o que reafirma sua possível atuação no metabolismo de lipídios.

4.4.1 Mutante nulo

O mutante nulo Δ yor022c não apresenta deficiência de crescimento em meio de cultura contendo fonte de carbono não fermentável, indicando a competência do seu metabolismo respiratório (Apêndice D).

4.4.2 Padronização de anticorpos

Com o objetivo de fazer ensaios de localização de Yor022cp, foi produzido anticorpo policlonal específico (VBP Biotecnologia LTDA) contra esta proteína, porém não foi possível padronizar seu uso. O anticorpo mostrou reação cruzada com outras proteínas mitocondriais, o que tem dificultado a interpretação dos resultados (Figura 22).

Também testamos a construção com hemaglutinina, onde foi revelada uma banda na altura de 30 KDa, muito inferior ao tamanho de 82 KDa esperados. Esta banda de 30 KDa também parece ser vista na linhagem mutante com plasmídeo episomal, quando utilizado o anticorpo específico. Poderíamos levantar a hipótese de um possível processamento pós-traducional, porém os resultados não se confirmaram em outros experimentos, prejudicando a análise

Figura 22 - Detecção de Yor022cp por Western blot.

A, Ensaio utilizando anticorpos específico contra Yor022cp, na concentração 1:250. Após a extração de mitocôndrias, 80ug de proteína foram aplicadas em gel de poliácridamida 10%. Na imagem estão representadas a amostra selvagem (W303-1A), o mutante nulo (Δ yor022c) e o mutante com plasmídeo multi-cópia (Δ yor022c + YEP022c). **B**, Ensaio utilizando anticorpo policlonal contra o epítipo da Hemaglutinina fusionado à ORF em questão, na concentração 1:1000. Após a extração de mitocôndrias, 40ug de proteína foram aplicadas em gel de poliácridamida 12%. A imunodeteção foi realizada com anticorpo policlonal contra o epítipo da Hemaglutinina fusionado à ORF em questão, na concentração 1:1000. Na imagem são mostrados o sobrenadante (Sob) proveniente da centrifugação diferencial da extração de mitocôndrias (Mit), da linhagem contendo o vetor episomal (Epi) ou integrativo (Int).

Outra questão importante é a igualdade na intensidade da banda nas duas construções testadas: multicópia e integrativa (Imagem B da Figura 22), considerando o número de cópias, a expressão de Yor022cp-HA no vetor multicópia deveria gerar um produto muito mais abundante que a expressão de Yor022cp-HA no vetor integrativo (uma única cópia por genoma). Como esse produto menor que 31KDa não está presente no extrato mitocondrial da linhagem parental (não mostrado aqui) consideramos que ele possa de fato estar relacionado a Yor022cp-HA.

Uma possibilidade para resolução desse problema seria a adição de um segundo “tag” à proteína na sua porção N-terminal logo após o seu sítio de clivagem de endereçamento mitocondrial. Segundo o algoritmo “Mitoprot” (CLAROS; VINCENS, 1996), a sequência

“MLRFTHRGLPSRFFRN” é removida durante o processo de importação mitocodrial, assim adicionaríamos o novo “tag” logo após essa região.

4.4.3 *Síntese protéica mitocondrial in vivo*

Avaliamos a síntese protéica mitocondrial *in vivo* do mutante $\Delta yor022c$ (Figura 23). Assim como para $\Delta ydl119c$, não houve diferença quando comparada com a linhagem selvagem, independentemente da temperatura de realização do ensaio, indicando que estes peptídeos não estão envolvidos diretamente na tradução, como as proteínas ribossomais, por exemplo, ou indiretamente, como na estabilização de algum polipeptídio.

Figura 23 – Síntese protéica mitocondrial.

As linhagens foram crescidas à 30 °C ou 37 °C. Os produtos gênicos mitocondriais foram marcados com [³⁵S] metionina e [³⁵S] cisteína. As proteínas totais de quantidade equivalente de células foram separadas por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida, 17,5%, transferidas para membrana de nitrocelulose e esta foi exposta ao filme de raios-X. Não há diferença entre as linhagens mutantes e a selvagem.

4.4.4 *Análise de cardiolipina*

Estudando os possíveis parceiros genéticos de Yor022cp através do banco de dados SGD, encontramos a proteína codificada por *UPS1* (TAMURA et al., 2009), envolvida no metabolismo de fosfolipídios, cujos mutantes nulos têm níveis alterados de cardiolipina e fosfatidiletanolamina.

Relacionando este fato com a similaridade apresentada por Yor022cp com fosfolipases (HIGGS et al., 1998; KATO et al., 2002) e também à observação de que ao crescer a linhagem mutante à 37 °C é obtida uma maior porcentagem de colônias *petites* (Figura 24),

quando comparada à selvagem, avaliamos as taxas de cardiolipina presentes no mutante *Δyor022c*.

Os resultados estão mostrados na Figura 25. É possível notar que há dispersão nos resultados, mas persiste diferença estatisticamente significativa entre as linhagens selvagem e mutante, quando crescidas à 37 °C, o que reforça a suspeita da participação de Yor022cp no processamento de lipídeos mitocondriais.

Figura 24 - Formação de colônias *petite* em *Δyor022c*

A linhagem selvagem e a mutante foram crescidas à 30 °C ou 37 °C, por aproximadamente 16 horas. Após o crescimento, cerca de 100 células foram plaqueadas em meio YPD e após o crescimento das colônias, foram replicadas em YPEG e fez-se a identificação e contagem das colônias *petite*.

Analizamos a quantidade de cardiolipina das linhagens W303, *yor022c*, e W303 Rho⁰ (que não possui mtDNA). Os resultados (Figura 25) mostram que a quantia do fosfolípídeo linhagem Rho⁰, independente da temperatura de crescimento, é a mesma. Comparada com o selvagem, há uma redução estatisticamente significativa, nas duas temperaturas. Em se tratando do mutante *Δyor022*, verificamos que, a 30 °C, não há diferença na abundância de cardiolipina entre este e o selvagem. Já a 37 °C, não há diferença entre o mutante nulo e a linhagem W303 Rho⁰. Todos esses achados ratificam a possível participação de Yor022cp no processamento de lipídeos mitocondriais.

Figura 25 - Quantificação de cardiolipina

Os dados mostrados são resultado de triplicatas de extração de mitocôndrias para a linhagem selvagem (WT) e *yor022c* (022) e duplicata para WT rho0 (* p = 0,001). A quantidade de cardiolipina no mutante *yor022c* à 30 °C é estatisticamente igual à quantidade do selvagem WT na mesma temperatura. Já a 37 °C, há menor quantidade do fosfolípido no mutante em comparação com o selvagem. A quantia reduzida encontrada em WT rho0 reforça o resultado do experimento.

4.4.5 *Função de Yor022cp*

Recentemente, em outubro, foi descoberta a função de Yor022cp. Por espectroscopia de massa foi demonstrado que esta proteína é realmente uma fosfolipase A1, atuante no metabolismo de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e ácido fosfatídico, localizada na matriz mitocondrial (URAFUJI; ARIOKA, 2016).

A fosfolipase A2 Cld1p atua especificamente no remodelamento de cardiolipina (BERANEK et al., 2009), porém, não se sabe se cardiolipina também é substrato de Yor022cp. Segundo nossos achados, esta é uma hipótese bastante plausível.

5 DISCUSSÃO

Esse projeto iniciou-se com um objetivo geral de auxiliar na caracterização de ORFs de levedura de função desconhecida. A definição da função específica de todas as proteínas celulares tem sido buscada pela comunidade científica como um natural avanço dos estudos genômicos do final do século XX. Duas ORFs escolhidas para estudo: *YDL119c* e *YOR022c* tiveram sua caracterização inicial publicadas em 2016, o que mostra o grande interesse de outros grupos de pesquisa por esse tipo de estudo, natural em pesquisas na fronteira do conhecimento.

Já a ORF *YDR115w* (*MRPL34*) também foi descrita dentro de um projeto de crioestrutura do mitoribossomo (AMUNTS et al., 2014). No nosso processo de caracterização geramos uma série de informações a respeito da sua função ao identificarmos resíduos importantes para sua estabilidade térmica (K90 e R95) bem como resíduos altamente conservados, mas que aparentemente não são essenciais para sua função (W101 e F79). Por outro lado, tivemos dificuldade em seguir seu produto gênico por alguns motivos: a) A adição de epítomos ou *tags* à porção C-terminal torna a proteína não funcional; b) A adição de *tags* na porção N-terminal é perdida; c) O anticorpo gerado pela empresa VBP Biotecnologia LTDA não é consistente na reprodução de dados.

Fusionamos a porção correspondente a Mrpl34p madura (AMUNTS et al., 2014) com a sequência de endereçamento do gene *ATP9* de *Neurospora crassa* (*NcATP9*). Esse tipo de construção tem sido utilizado com frequência para endereçamento de proteínas de interesse para a mitocôndria de levedura, inclusive pelo nosso laboratório (BARROS et al., 2011). Verificamos assim que a extensão N-terminal endereça a proteína para a mitocôndria, sem outra função biológica aparente. Utilizamos então essa construção para a adição do *tag* HA a porção N-terminal da proteína após o processamento da *NcATP9*, o que permitiu finalmente a detecção de Mrpl34p.

A presença de uma extensão N-terminal em Mrpl34p em leveduras não encontrada em procariotos também ocorre em outras proteínas ribossomais (AMUNTS et al., 2014). Curiosamente, embora os ribossomos mitocondriais sejam muito mais parecidos com os bacterianos do que os citossólicos, existem diferenças importantes constatadas principalmente pelos estudos estruturais (BECKMANN; HERRMANN, 2015).

Os mutantes *mrpl34-ts1* e *mrpl34-ts2* foram importantes não só para identificação de resíduos necessários à estabilidade térmica da proteína como também foram utilizados em ensaios de avaliação da síntese protéica mitocondrial e de biogênese ribossomal.

A síntese protéica mitocondrial do mutante *mrpl34-ts1* de células crescidas na temperatura não permissiva revelou uma diminuição generalizada da síntese de novos produtos mitocondriais, o que sugere que nessas células haveria um menor conteúdo de ribossomos funcionais.

Entretanto, quando as células foram crescidas na temperatura permissiva e somente a marcação radioativa dos novos produtos mitocondriais realizada na temperatura não permissiva (resultado não mostrado), não foi possível detectar qualquer diferença significativa na síntese dos produtos mitocondriais; esse resultado, por sua vez, indica que *mrpl34-ts1* não é capaz de desestabilizar ribossomos já montados quando da mudança de temperatura, e assim a síntese protéica ocorre normalmente no ensaio.

Nos ensaios de biogênese ribossomal, empregamos gradientes de fracionamento para identificação das proteínas ribossomais e notamos que no mutante *mrpl34-ts1* houve um claro espalhamento dessas proteínas ao longo das frações do gradiente, fato não verificado na linhagem parental (W303-1A) controle, isso tanto quando o monossomo ribossomal foi mantido (na presença de magnésio) quando dissociado (presença de EDTA) nas subunidades 54S e 37S.

O conjunto de marcadores da subunidade 54S que usamos parece já estar incorporado ao precursor 54S. O fato das subunidades que testamos já estarem incorporadas sugere que Mrpl34p entraria posteriormente nesses complexos e assim sua adição na via de montagem da subunidade 54S se daria de forma tardia, tal qual ocorre com seu homólogo em *E. coli* (SHAJANI et al., 2011).

O mutante nulo da ORF *YPR116w* apresenta alta instabilidade do DNA mitocondrial e para prosseguir os estudos, foram gerados alelos sensíveis à temperatura. Como não foi identificada relação com atividade respiratória mitocondrial direta, buscamos identificar parceiros genéticos que possivelmente atuam em conjunto. Os produtos das ORFs *YDR065w*, *YLR091w*, *PET130* e *RPM2*, segundo o SGD, parecem estar complexados com Ypr116wp.

Ao transformar o mutante *TS ypr116w* com cópias extras dessas proteínas, clonadas em vetor episomal, verificou-se que *ylr091wp* é capaz de aumentar a estabilidade do mtDNA, sugerindo uma atividade correlacionada.

Todos estes possíveis parceiros também apresentam mtDNA instável e com exceção de *RPM2*, não tem função conhecida.

Verificamos que os mutantes *ts-ypr116w* contém menor quantidade de tRNA mitocondrial que a linhagem selvagem. O processamento da porção 5' dos transcritos de

tRNA envolve a enzima RNase P, (DANG; MARTIN, 1993). É composta por uma porção protéica codificada pelo gene nuclear *RPM2* (MORALES et al., 1992) e RNA, transcrito pelo gene mitocondrial *RPM1* (HOLLINGSWORTH; MARTIN, 1986; MARTIN; LANG, 1997). Já a extensão 3' é processada pela RNase Z (CHEN et al., 2005).

Com base nesses achados, realizamos ensaios de *Northen blot* utilizando sondas de tRNA e verificamos que os mutantes *ts- ypr116w*, *pet130* e *ylr091w* apresentam menor quantidade dos tRNAs analisados na temperatura restritiva, quando comparado com o selvagem, sugerindo uma atuação no metabolismo de tRNAs mitocondriais. A presença de um intermediário de tRNAQ no mutante *ylr091-ts* também reforça a hipótese do envolvimento dessas ORFs no metabolismo de tRNAs. Esses resultados preliminares devem ser confirmados em novas extrações de RNAs mitocondriais, assim como a repetição de sondas para mRNAs, pois o resultado até aqui obtido para *COB1* e *COX2* pode dar uma interpretação ambígua (Fig. 21).

A ORF *YDL119c* é ortóloga à *SLC25A38* humana, que codifica um carreador mitocondrial localizado na membrana interna mitocondrial. Defeitos neste carreador são responsáveis por um tipo de anemia sideroblástica (GUERNSEY et al., 2009). No que diz respeito à localização protéica, nossos experimentos confirmaram a localização de Ydl119cp.

Ainda segundo Guernsey e colaboradores, 2009, com base em alguns experimentos realizados em *Zebrafish* e *S. cerevisiae* (*Δydl119c*), *SLC25A38p* seria responsável pela importação de glicina e talvez pela exportação de ALA para o citosol, ambos participantes da síntese de HEME. A maioria dos transportadores *SLC25* promove a troca de um metabólito por outro através da membrana interna da mitocôndria (FLEMING, 2011). As três proteínas ortólogas possuem o dipeptídeo RD relacionado ao transporte de aminoácidos (KUNJI; ROBINSON, 2006)

O curioso é que Guernsey e colaboradores, 2009, demonstram *Δydl119c* como sendo deficiente respiratória, comportamento que não observamos na linhagem nocaute feita por nós (W303). O maior déficit respiratório das linhagens geradas a partir da parental BY4741 tem sido reportado (OCAMPO et al., 2012) e está relacionado à presença de um alelo *HAP1* mutado nessa linhagem (GAISNE et al., 1999). *HAP1* é um fator de transcrição que regula a expressão de diversos genes importantes para o metabolismo respiratório (GUARENTE et al., 1984; PFEIFER et al., 1989).

No início deste ano foi confirmada a função de *ydl119c* como um transportador de glicina para a mitocôndria (FERNANDEZ-MURRAY et al., 2016).

Em relação à ORF *YOR022c* não conseguimos progredir com a descrição topológica, pois tivemos bastante dificuldade em padronizar o uso de anticorpos, seja o específico, seja contra o epítipo da Hemaglutinina adicionado à porção C-terminal da proteína.

Como se trata de uma proteína grande (82KDa), optamos por clonar no vetor de expressão apenas os últimos 341 nucleotídeos, e talvez não tenha sido a porção ideal para gerar imunogenicidade.

Por outro lado, obtivemos bons resultados ao quantificarmos a cardiolipina de mitocôndrias isoladas da linhagem selvagem e mutante $\Delta yor022c$, crescidas a 30°C e 37°C. É possível afirmar que o mutante nulo apresenta quantidades reduzidas deste fosfolípido, quando crescida à 37 °C.

A análise da quantidade de cardiolipina da linhagem W303 Rho⁰ (que não possui mtDNA), apresentou quantidades reduzidas deste fosfolípido, confirmando nossos achados.

Em outubro deste ano foi descoberta a função de Yor022cp. Demonstrou-se que esta proteína é uma fosfolipase A1, atuante no metabolismo de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e ácido fosfatídico, localizada na matriz mitocondrial (URAFUJI; ARIOKA, 2016). Não se sabe ainda se cardiolipina seria substrato de Yor022cp, como nossos achados sugerem.

REFERÊNCIAS*

- ADAMS, K. L.; PALMER, J. D. Evolution of mitochondrial gene content: gene loss and transfer to the nucleus. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 29, n. 3, p. 380-395, 2003.
- ALBERTYN, J.; HOHMANN, S.; THEVELEIN, J. M.; PRIOR, B. A. GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. **Molecular and cellular biology**, v. 14, n. 6, p. 4135-4144, 1994.
- AMUNTS, A.; BROWN, A.; BAI, X. C.; LLACER, J. L.; HUSSAIN, T.; EMSLEY, P.; LONG, F.; MURSHUDOV, G.; SCHERES, S. H.; RAMAKRISHNAN, V. Structure of the yeast mitochondrial large ribosomal subunit. **Science**, v. 343, n. 6178, p. 1485-1489, 2014.
- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Short protocols in Molecular Biology**. Boston: Publishing Associates and Wiley-Interscience – Harvard Medical School, 1989.
- BALATRI, E.; BANCİ, L.; BERTINI, I.; CANTINI, F.; CIOFI-BAFFONI, S. Solution structure of Sco1: a thioredoxin-like protein Involved in cytochrome c oxidase assembly. **Structure**, v. 11, n. 11, p. 1431-1443, 2003.
- BARROS, M. H.; DA CUNHA, F. M.; OLIVEIRA, G. A.; TAHARA, E. B.; KOWALTOWSKI, A. J. Yeast as a model to study mitochondrial mechanisms in ageing. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 131, n. 7-8, p. 494-502, 2010.
- BARROS, M. H.; RAK, M.; PAULELA, J. A.; TZAGOLOFF, A. Characterization of Gtf1p, the connector subunit of yeast mitochondrial tRNA-dependent amidotransferase. **The Journal of biological chemistry**, v. 286, n. 38, p. 32937-32947, 2011.
- BECKMANN, R.; HERRMANN, J. M. Structural biology. Mitochondrion oddities. **Science**, v. 348, n. 6232, p. 288-289, 2015.
- BELENKIY, R.; HAEFELE, A.; EISEN, M. B.; WOHLRAB, H. The yeast mitochondrial transport proteins: new sequences and consensus residues, lack of direct relation between consensus residues and transmembrane helices, expression patterns of the transport protein genes, and protein-protein interactions with other proteins. **Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes**, v. 1467, n. 1, p. 207-218, 2000.
- BELEVICH, I.; VERKHOVSKY, M. I. Molecular mechanism of proton translocation by cytochrome c oxidase. **Antioxidants & redox signaling**, v. 10, n. 1, p. 1-29, 2008.
- BERANEK, A.; RECHBERGER, G.; KNAUER, H.; WOLINSKI, H.; KOHLWEIN, S. D.; LEBER, R. Identification of a cardiolipin-specific phospholipase encoded by the gene CLD1 (YGR110W) in yeast. **The Journal of biological chemistry**, v. 284, n. 17, p. 11572-11578, 2009.
- BIETENHADER, M.; MARTOS, A.; TETAUD, E.; AIYAR, R. S.; SELLEM, C. H.; KUCHARCZYK, R.; CLAUDE-MUNSTER, S.; GIRAUD, M. F.; GODARD, F.; SALIN,

B.; SAGOT, I.; GAGNEUR, J.; DEQUARD-CHABLAT, M.; CONTAMINE, V.; HERMANN-LE DENMAT, S.; SAINSARD-CHANET, A.; STEINMETZ, L. M.; DI RAGO, J. P. Experimental relocation of the mitochondrial ATP9 gene to the nucleus reveals forces underlying mitochondrial genome evolution. **Public Library of Science genetics**, v. 8, n. 8, p. e1002876, 2012.

BIRNBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Res**, v. 7, n. 6, p. 1513-1523, 1979.

BLANCHARD, J. L.; LYNCH, M. Organellar genes: why do they end up in the nucleus? **Trends in genetics**, v. 16, n. 7, p. 315-320, 2000.

BLEICHER, L.; LEMKE, N.; GARRATT, R. C. Using amino acid correlation and community detection algorithms to identify functional determinants in protein families. **Public Library of Science**, v. 6, n. 12, p. e27786, 2011.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BRACHMANN, C. B.; DAVIES, A.; COST, G. J.; CAPUTO, E.; LI, J.; HIETER, P.; BOEKE, J. D. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. **Yeast**, v. 14, n. 2, p. 115-132, 1998.

CHACINSKA, A.; KOEHLER, C. M.; MILENKOVIC, D.; LITHGOW, T.; PFANNER, N. Importing Mitochondrial Proteins: Machineries and Mechanisms. **Cell**, v. 138, n. 4, p. 628-644, 2009.

CHACINSKA, A.; LIND, M.; FRAZIER, A. E.; DUDEK, J.; MEISINGER, C.; GEISLER, A.; SICKMANN, A.; MEYER, H. E.; TRUSCOTT, K. N.; GUIARD, B.; PFANNER, N.; REHLING, P. Mitochondrial presequence translocase: switching between TOM tethering and motor recruitment involves Tim21 and Tim17. **Cell**, v. 120, n. 6, p. 817-829, 2005.

CHACINSKA, A.; PFANNSCHMIDT, S.; WIEDEMANN, N.; KOZJAK, V.; SANJUAN SZKLARZ, L. K.; SCHULZE-SPECKING, A.; TRUSCOTT, K. N.; GUIARD, B.; MEISINGER, C.; PFANNER, N. Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins. **The EMBO journal**, v. 23, n. 19, p. 3735-3746, 2004.

CHEN, Y.; BECK, A.; DAVENPORT, C.; SHATTUCK, D.; TAVTIGIAN, S. V. Characterization of TRZ1, a yeast homolog of the human candidate prostate cancer susceptibility gene ELAC2 encoding tRNase Z. **BMC molecular biology** v. 6, p. 12, 2005.

CLARK-WALKER, G. D.; LINNANE, A. W. In vivo differentiation of yeast cytoplasmic and mitochondrial protein synthesis with antibiotics. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 25, n. 1, p. 8-13, 1966.

CLAROS, M. G.; VINCENS, P. Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. **European Journal of Biochemistry**, v. 241, n. 3, p. 779-786, 1996.

CRONAN, J. E., JR. Biotination of proteins in vivo. A post-translational modification to label, purify, and study proteins. **The Journal of biological chemistry**, v. 265, n. 18, p. 10327-10333, 1990.

DANG, Y. L.; MARTIN, N. C. Yeast mitochondrial RNase P. Sequence of the RPM2 gene and demonstration that its product is a protein subunit of the enzyme. **The Journal of biological chemistry**, v. 268, n. 26, p. 19791-19796, 1993.

DAUM, G.; BOHNI, P. C.; SCHATZ, G. Import of proteins into mitochondria. Cytochrome b2 and cytochrome c peroxidase are located in the intermembrane space of yeast mitochondria. **The Journal of biological chemistry**, v. 257, n. 21, p. 13028-13033, 1982.

DAVIS, A. J.; ALDER, N. N.; JENSEN, R. E.; JOHNSON, A. E. The Tim9p/10p and Tim8p/13p complexes bind to specific sites on Tim23p during mitochondrial protein import. **Molecular biology of the cell**, v. 18, n. 2, p. 475-486, 2007.

DE SILVA, D.; FONTANESI, F.; BARRIENTOS, A. The DEAD box protein Mrh4 functions in the assembly of the mitochondrial large ribosomal subunit. **Cell Metabolism**, v. 18, n. 5, p. 712-725, 2013.

DE ZAMAROCZY, M.; BERNARDI, G. Sequence organization of the mitochondrial genome of yeast--a review. **Gene**, v. 37, n. 1-3, p. 1-17, 1985.

DEKKER, P. J.; RYAN, M. T.; BRIX, J.; MULLER, H.; HONLINGER, A.; PFANNER, N. Preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane: molecular dissection and assembly of the general import pore complex. **Molecular and cellular biology**, v. 18, n. 11, p. 6515-6524, 1998.

DEL ARCO, A.; SATRUSTEGUI, J. New mitochondrial carriers: an overview. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, n. 19-20, p. 2204-2227, 2005.

DUDEK, J.; REHLING, P.; VAN DER LAAN, M. Mitochondrial protein import: common principles and physiological networks. **Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics**, v. 1833, n. 2, p. 274-285, 2013.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, p. 1792-1797, 2004.

ELMOUALIJ, B.; DUYCKAERTS, C.; LAMOTTEBRASSEUR, J.; SLUSE, F. E. Phylogenetic classification of the mitochondrial carrier family of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 13, n. 6, p. 573-581, 1997.

EMANUELSSON, O.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G.; NIELSEN, H. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. **Nature protocols**, v. 2, n. 4, p. 953-971, 2007.

EPHRUSSI, B.; HOTTINGER, H. Action de l'acylamin sur les levures. II Etude genetique du mutant "petite colonie". **Annales de l'Institut Pasteur**, v. 76, p. 419-450, 1949.

ESSER, K.; TURSUN, B.; INGENHOVEN, M.; MICHAELIS, G.; PRATJE, E. A novel two-step mechanism for removal of a mitochondrial signal sequence involves the mAAA complex and the putative rhomboid protease Pcp1. **Journal of molecular biology**, v. 323, n. 5, p. 835-843, 2002.

FAYE, G.; KUJAWA, C.; FUKUHARA, H. Physical and genetic organization of petite and grande yeast mitochondrial DNA. IV. In vivo transcription products of mitochondrial DNA and localization of 23 S ribosomal RNA in petite mutants of *saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Molecular Biology**, v. 88, n. 1, p. 185-203, 1974.

FERNANDEZ-MURRAY, J. P.; PRYKHOZHII, S. V.; DUFAY, J. N.; STEELE, S. L.; GASTON, D.; NASRALLAH, G. K.; COOMBS, A. J.; LIWSKI, R. S.; FERNANDEZ, C. V.; BERMAN, J. N.; MCMASTER, C. R. Glycine and Folate Ameliorate Models of Congenital Sideroblastic Anemia. **PLoS genetics**, v. 12, n. 1, p. e1005783, 2016.

FINKEL, T. The metabolic regulation of aging. **Nature Medicine**, v. 21, n. 12, p. 1416-1423, 2015.

FINN, R. D.; MISTRY, J.; TATE, J.; COGGILL, P.; HEGER, A.; POLLINGTON, J. E.; GAVIN, O. L.; GUNASEKARAN, P.; CERIC, G.; FORSLUND, K.; HOLM, L.; SONNHAMMER, E. L.; EDDY, S. R.; BATEMAN, A. The Pfam protein families database. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. Database issue, p. D211-222, 2010.

FLEMING, M. D. The genetics of inherited sideroblastic anemias. **Seminars in hematology**, v. 39, n. 4, p. 270-281, 2002.

FLEMING, M. D. Congenital sideroblastic anemias: iron and heme lost in mitochondrial translation. **Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology**, v. 2011, p. 525-531, 2011.

FOURY, F.; ROGANTI, T.; LECRENIER, N.; PURNELLE, B. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, v. 440, n. 3, p. 325-331, 1998.

GAISNE, M.; BECAM, A. M.; VERDIERE, J.; HERBERT, C. J. A 'natural' mutation in *Saccharomyces cerevisiae* strains derived from S288c affects the complex regulatory gene HAP1 (CYP1). **Current Genetics**, v. 36, n. 4, p. 195-200, 1999.

GAN, X.; KITAKAWA, M.; YOSHINO, K.; OSHIRO, N.; YONEZAWA, K.; ISONO, K. Tag-mediated isolation of yeast mitochondrial ribosome and mass spectrometric identification of its new components. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 21, p. 5203-5214, 2002.

GEBERT, N.; GEBERT, M.; OELJEKLAUS, S.; VON DER MALSBURG, K.; STROUD, D. A.; KULAWIAK, B.; WIRTH, C.; ZAHEDI, R. P.; DOLEZAL, P.; WIESE, S.; SIMON, O.; SCHULZE-SPECKING, A.; TRUSCOTT, K. N.; SICKMANN, A.; REHLING, P.; GUIARD, B.; HUNTE, C.; WARSCHEID, B.; VAN DER LAAN, M.; PFANNER, N.; WIEDEMANN, N. Dual function of Sdh3 in the respiratory chain and TIM22 protein translocase of the mitochondrial inner membrane. **Molecular cell**, v. 44, n. 5, p. 811-818, 2011.

GIETZ, R. D.; SUGINO, A. New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. **Gene**, v. 74, n. 2, p. 527-534, 1988.

GLICK, B. S. Pathways and energetics of mitochondrial protein import in *Saccharomyces cerevisiae*. **Methods Enzymol**, v. 260, p. 224-231, 1995.

GOFFEAU, A.; BARRELL, B. G.; BUSSEY, H.; DAVIS, R. W.; DUJON, B.; FELDMANN, H.; GALIBERT, F.; HOHEISEL, J. D.; JACQ, C.; JOHNSTON, M.; LOUIS, E. J.; MEWES, H. W.; MURAKAMI, Y.; PHILIPPSEN, P.; TETTELIN, H.; OLIVER, S. G. Life with 6000 genes. **Science**, v. 274, n. 5287, p. 546-&, 1996.

GRANDIER-VAZEILLE, X.; BATHANY, K.; CHAIGNEPAIN, S.; CAMOUGRAND, N.; MANON, S.; SCHMITTER, J. M. Yeast mitochondrial dehydrogenases are associated in a supramolecular complex. **Biochemistry**, v. 40, n. 33, p. 9758-9769, 2001.

GREENLEAF, A. L.; KELLY, J. L.; LEHMAN, I. R. Yeast RPO41 gene product is required for transcription and maintenance of the mitochondrial genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 10, p. 3391-3394, 1986.

GROOT, G. S.; MASON, T. L.; VAN HARTEN-LOOSBROEK, N. Var1 is associated with the small ribosomal subunit of mitochondrial ribosomes in yeast. **Molecular & general genetic**, v. 174, n. 3, p. 339-342, 1979.

GUARENTE, L.; LALONDE, B.; GIFFORD, P.; ALANI, E. Distinctly regulated tandem upstream activation sites mediate catabolite repression of the *CYC1* gene of *S. cerevisiae*. **Cell**, v. 36, n. 2, p. 503-511, 1984.

GUDA, C.; FAHY, E.; SUBRAMANIAM, S. MITOPRED: a genome-scale method for prediction of nucleus-encoded mitochondrial proteins. **Bioinformatics**, v. 20, n. 11, p. 1785-1794, 2004.

GUERNSEY, D. L.; JIANG, H.; CAMPAGNA, D. R.; EVANS, S. C.; FERGUSON, M.; KELLOGG, M. D.; LACHANCE, M.; MATSUOKA, M.; NIGHTINGALE, M.; RIDEOUT, A.; SAINT-AMANT, L.; SCHMIDT, P. J.; ORR, A.; BOTTOMLEY, S. S.; FLEMING, M. D.; LUDMAN, M.; DYACK, S.; FERNANDEZ, C. V.; SAMUELS, M. E. Mutations in mitochondrial carrier family gene *SLC25A38* cause nonsyndromic autosomal recessive congenital sideroblastic anemia. **Nature Genetics**, v. 41, n. 6, p. 651-653, 2009.

HAITINA, T.; LINDBLOM, J.; RENSTROM, T.; FREDRIKSSON, R. Fourteen novel human members of mitochondrial solute carrier family 25 (*SLC25*) widely expressed in the central nervous system. **Genomics**, v. 88, n. 6, p. 779-790, 2006.

HANAHAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, v. 166, n. 4, p. 557-580, 1983.

HERRMANN, J. M.; FOELSCH, H.; NEUPERT, W.; STUART, R. A. Cell Biology: A Laboratory Handbook, Isolation of yeast mitochondria and study of mitochondrial protein translation. **Academic Press, San Diego, CA**, v. 1, p. 538-544, 1994.

HERSKOWITZ, I. LIFE-CYCLE OF THE BUDDING YEAST SACCHAROMYCES-CEREVISIAE. **Microbiological Reviews**, v. 52, n. 4, p. 536-553, 1988.

HIGGS, H. N.; HAN, M. H.; JOHNSON, G. E.; GLOMSET, J. A. Cloning of a phosphatidic acid-preferring phospholipase A(1) from bovine testis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 10, p. 5468-5477, 1998.

HIRST, J. Mitochondrial complex I. **Annual review of biochemistry**, v. 82, p. 551-575, 2013.

HOLLINGSWORTH, M. J.; MARTIN, N. C. RNase P activity in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* depends on both mitochondrion and nucleus-encoded components. **Molecular and cellular biology**, v. 6, n. 4, p. 1058-1064, 1986.

HOLM, C.; MEEKSWAGNER, D. W.; FANGMAN, W. L.; BOTSTEIN, D. A RAPID, EFFICIENT METHOD FOR ISOLATING DNA FROM YEAST. **Gene**, v. 42, n. 2, p. 169-173, 1986.

HUGHES, T. R.; ROBINSON, M. D.; MITSAKAKIS, N.; JOHNSTON, M. The promise of functional genomics: completing the encyclopedia of a cell. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, n. 5, p. 546-554, 2004.

IWATA, S.; LEE, J. W.; OKADA, K.; LEE, J. K.; IWATA, M.; RASMUSSEN, B.; LINK, T. A.; RAMASWAMY, S.; JAP, B. K. Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc₁ complex. **Science**, v. 281, n. 5373, p. 64-71, 1998.

KANIAK-GOLIK, A.; SKONECZNA, A. Mitochondria-nucleus network for genome stability. **Free radical biology & medicine**, v. 82, p. 73-104, 2015.

KATO, T.; MORITA, M. T.; FUKAKI, H.; YAMAUCHI, Y.; UEHARA, M.; NIIHAMA, M.; TASAKA, M. SGR2, a phospholipase-like protein, and ZIG/SGR4, a SNARE, are involved in the shoot gravitropism of *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v. 14, n. 1, p. 33-46, 2002.

KOERNER, T. J.; HILL, J. E.; MYERS, A. M.; TZAGOLOFF, A. High-expression vectors with multiple cloning sites for construction of trpE fusion genes – pATH vectors. **Methods in Enzymology**, v. 194, p. 477-490, 1991.

KUNJI, E. R.; ROBINSON, A. J. The conserved substrate binding site of mitochondrial carriers. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1757, n. 9-10, p. 1237-1248, 2006.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LANCASTER, C. R. Succinate:quinone oxidoreductases: an overview. **Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics**, v. 1553, n. 1-2, p. 1-6, 2002.

LENAZ, G.; FATO, R.; FORMIGGINI, G.; GENOVA, M. L. The role of Coenzyme Q in mitochondrial electron transport. **Mitochondrion**, v. 7 Suppl, p. S8-33, 2007.

LENAZ, G.; GENOVA, M. L. Structure and organization of mitochondrial respiratory complexes: a new understanding of an old subject. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 12, n. 8, p. 961-1008, 2010.

LIGHTOWLERS, R. N.; TAYLOR, R. W.; TURNBULL, D. M. Mutations causing mitochondrial disease: What is new and what challenges remain? **Science**, v. 349, n. 6255, p. 1494-1499, 2015.

LILL, R.; MUHLENHOFF, U. Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases. **Annual review of biochemistry**, v. 77, p. 669-700, 2008.

LISOWSKY, T.; MICHAELIS, G. Mutations in the genes for mitochondrial RNA polymerase and a second mitochondrial transcription factor of *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular & general genetics**, v. 219, n. 1-2, p. 125-128, 1989.

LITHGOW, T.; JUNNE, T.; SUDA, K.; GRATZER, S.; SCHATZ, G. The mitochondrial outer membrane protein Mas22p is essential for protein import and viability of yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences**, v. 91, n. 25, p. 11973-11977, 1994.

LONGEN, S.; WOELLHAF, M. W.; PETRUNGARO, C.; RIEMER, J.; HERRMANN, J. M. The disulfide relay of the intermembrane space oxidizes the ribosomal subunit mrp10 on its transit into the mitochondrial matrix. **Developmental cell**, v. 28, n. 1, p. 30-42, 2014.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

LUEVANO-MARTINEZ, L. A.; APPOLINARIO, P.; MIYAMOTO, S.; URIBE-CARVAJAL, S.; KOWALTOWSKI, A. J. Deletion of the transcriptional regulator opi1p decreases cardiolipin content and disrupts mitochondrial metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 60, p. 150-158, 2013.

LUTTIK, M. A.; OVERKAMP, K. M.; KOTTER, P.; DE VRIES, S.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T. The *Saccharomyces cerevisiae* NDE1 and NDE2 genes encode separate mitochondrial NADH dehydrogenases catalyzing the oxidation of cytosolic NADH. **The Journal of biological chemistry**, v. 273, n. 38, p. 24529-24534, 1998.

MARGULIS, L. **Origin of eukaryotic cells**. New Haven, CT: Yale University Press, 1970.

MARTIN, N. C.; LANG, B. F. Mitochondrial RNase P: the RNA family grows. **Nucleic acids symposium series**, n. 36, p. 42-44, 1997.

MERZ, S.; WESTERMANN, B. Genome-wide deletion mutant analysis reveals genes required for respiratory growth, mitochondrial genome maintenance and mitochondrial protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genome Biology**, v. 10, n. 9, 2009.

MESECKE, N.; TERZIYSKA, N.; KOZANY, C.; BAUMANN, F.; NEUPERT, W.; HELL, K.; HERRMANN, J. M. A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import. **Cell**, v. 121, n. 7, p. 1059-1069, 2005.

MISHRA, P.; CHAN, D. C. Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. **The Journal of cell biology**, v. 212, n. 4, p. 379-387, 2016.

MOCZKO, M.; DIETMEIER, K.; SOLLNER, T.; SEGUI, B.; STEGER, H. F.; NEUPERT, W.; PFANNER, N. Identification of the mitochondrial receptor complex in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS letters**, v. 310, n. 3, p. 265-268, 1992.

MOCZKO, M.; GARTNER, F.; PFANNER, N. The protein import receptor MOM19 of yeast mitochondria. **FEBS letters**, v. 326, n. 1-3, p. 251-254, 1993.

MOKRANJAC, D.; NEUPERT, W. Thirty years of protein translocation into mitochondria: unexpectedly complex and still puzzling. **Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics**, v. 1793, n. 1, p. 33-41, 2009.

MORALES, M. J.; DANG, Y. L.; LOU, Y. C.; SULO, P.; MARTIN, N. C. A 105-kDa protein is required for yeast mitochondrial RNase P activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences**, v. 89, n. 20, p. 9875-9879, 1992.

MOSSMANN, D.; MEISINGER, C.; VOGTLE, F. N. Processing of mitochondrial presequences. **Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics**, v. 1819, n. 9-10, p. 1098-1106, 2012.

MUTO, T.; OBITA, T.; ABE, Y.; SHODAI, T.; ENDO, T.; KOHDA, D. NMR identification of the Tom20 binding segment in mitochondrial presequences. **Journal of molecular biology**, v. 306, n. 2, p. 137-143, 2001.

MYERS, A. M.; PAPE, L. K.; TZAGOLOFF, A. Mitochondrial protein-synthesis is required for maintenance of intact mitochondrial genomes in *Saccharomyces cerevisiae*. **The EMBO journal**, v. 4, n. 8, p. 2087-2092, 1985.

NAAMATI, A.; REGEV-RUDZKI, N.; GALPERIN, S.; LILL, R.; PINES, O. Dual targeting of Nfs1 and discovery of its novel processing enzyme, Icp55. **The Journal of biological chemistry**, v. 284, n. 44, p. 30200-30208, 2009.

NEUPERT, W.; HERRMANN, J. M. Translocation of proteins into mitochondria. In: (Ed.). **Annual Review of Biochemistry**, v.76, 2007. p.723-749. (Annual Review of Biochemistry). ISBN 0066-4154
978-0-8243-0876-6.

NITTIS, T.; GEORGE, G. N.; WINGE, D. R. Yeast Sco1, a protein essential for cytochrome c oxidase function is a Cu(I)-binding protein. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 45, p. 42520-42526, 2001.

NOLDEN, M.; EHSES, S.; KOPPEN, M.; BERNACCHIA, A.; RUGARLI, E. I.; LANGER, T. The m-AAA protease defective in hereditary spastic paraplegia controls ribosome assembly in mitochondria. **Cell**, v. 123, n. 2, p. 277-289, 2005.

NOUWS, J.; GOSWAMI, A. V.; BESTWICK, M.; MCCANN, B. J.; SUROVTSEVA, Y. V.; SHADEL, G. S. Mitochondrial Ribosomal Protein L12 Is Required for POLRMT Stability and Exists as Two Forms Generated by Alternative Proteolysis during Import. **The Journal of biological chemistry**, v. 291, n. 2, p. 989-997, 2016.

OCAMPO, A.; LIU, J.; SCHROEDER, E. A.; SHADEL, G. S.; BARRIENTOS, A. Mitochondrial respiratory thresholds regulate yeast chronological life span and its extension by caloric restriction. **Cell metabolism**, v. 16, n. 1, p. 55-67, 2012.

ORRWEAVER, T. L.; SZOSTAK, J. W. Yeast recombination - the association between double-strand gap repair and crossing over. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences**, v. 80, n. 14, p. 4417-4421, 1983.

PALMIERI, F.; AGRIMI, G.; BLANCO, E.; CASTEGNA, A.; DI NOIA, M. A.; IACOBAZZI, V.; LASORSA, F. M.; MAROBIO, C. M. T.; PALMIERI, L.; SCARCIA, P.; TODISCO, S.; VOZZA, A.; WALKER, J. Identification of mitochondrial carriers in *Saccharomyces cerevisiae* by transport assay of reconstituted recombinant proteins. **Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics**, v. 1757, n. 9-10, p. 1249-1262, 2006.

PASCHEN, S. A.; NEUPERT, W.; RAPAPORT, D. Biogenesis of beta-barrel membrane proteins of mitochondria. **Trends in biochemical sciences**, v. 30, n. 10, p. 575-582, 2005.

PAUL, M. F.; ALUSHIN, G. M.; BARROS, M. H.; RAK, M.; TZAGOLOFF, A. The putative GTPase encoded by MTG3 functions in a novel pathway for regulating assembly of the small subunit of yeast mitochondrial ribosomes. **The Journal of biological chemistry**, v. 287, n. 29, p. 24346-24355, 2012.

PENA-CASTILLO, L.; HUGHES, T. R. Why are there still over 1000 uncharacterized yeast genes? **Genetics**, v. 176, n. 1, p. 7-14, 2007.

PFANNER, N.; DOUGLAS, M. G.; ENDO, T.; HOOGENRAAD, N. J.; JENSEN, R. E.; MEIJER, M.; NEUPERT, W.; SCHATZ, G.; SCHMITZ, U. K.; SHORE, G. C. Uniform nomenclature for the protein transport machinery of the mitochondrial membranes. **Trends in biochemical sciences**, v. 21, n. 2, p. 51-52, 1996.

PFEIFER, K.; KIM, K. S.; KOGAN, S.; GUARENTE, L. Functional dissection and sequence of yeast HAP1 activator. **Cell**, v. 56, n. 2, p. 291-301, 1989.

REPETTO, B.; TZAGOLOFF, A. Structure and regulation of KGD2, the structural gene for yeast dihydrolipoyl transsuccinylase. **Molecular and cellular biology**, v. 10, n. 8, p. 4221-4232, 1990.

ROSE, M. D.; WINSTON, F. D.; HIETER, P. **Methods in Yeast Genetics. A Laboratory Course Manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; T., M. **Molecular Cloning. A laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SARASTE, M. Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. **Science**, v. 283, n. 5407, p. 1488-1493, 1999.

SCHATZ, G.; HASLBRUNNER, E.; TUPPY, H. Desoxyribonucleic acid associated with yeast mitochondria. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 15 p. 127-131, 1964.

SCHIESTL, R. H.; GIETZ, R. D. High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. **Current Genetics**, v. 16, n. 5-6, p. 339-346, 1989.

SCHONAUER, M. S.; KASTANIOTIS, A. J.; HILTUNEN, J. K.; DIECKMANN, C. L. Intersection of RNA processing and the type II fatty acid synthesis pathway in yeast mitochondria. **Molecular and cellular biology**, v. 28, n. 21, p. 6646-6657, 2008.

SCHULZE, M.; RODEL, G. SCO1, a yeast nuclear gene essential for accumulation of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit II. **Molecular genetics and genomics**, v. 211, n. 3, p. 492-498, 1988.

SHAJANI, Z.; SYKES, M. T.; WILLIAMSON, J. R. Assembly of bacterial ribosomes. **Annual review of biochemistry**, v. 80, p. 501-526, 2011.

SHERMAN, F.; HICKS, J. Micromanipulation and dissection of asci. **Methods in Enzymology**, v. 194, p. 21-37, 1991.

SIEVERS, F.; WILM, A.; DINEEN, D.; GIBSON, T. J.; KARPLUS, K.; LI, W.; LOPEZ, R.; MCWILLIAM, H.; REMMERT, M.; SODING, J.; THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular Systems Biology**, v. 7, p. 539, 2011.

TAMURA, Y.; ENDO, T.; IJIMA, M.; SESAKI, H. Ups1p and Ups2p antagonistically regulate cardiolipin metabolism in mitochondria. **Journal of Cell Biology**, v. 185, n. 6, p. 1029-1045, 2009.

TATSUTA, T.; LANGER, T. Quality control of mitochondria: protection against neurodegeneration and ageing. **The EMBO journal**, v. 27, n. 2, p. 306-314, 2008.

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

TZAGOLOFF, A. **Mitochondria**. 1st. New York: Plenum Press, 1982.

TZAGOLOFF, A.; MYERS, A. M. Genetics of mitochondrial biogenesis. **Annual review of biochemistry**, v. 55, p. 249-285, 1986.

URAFUJI, K.; ARIOKA, M. Yor022c protein is a phospholipase A1 that localizes to the mitochondrial matrix. **Biochemical and biophysical research communications**, 2016.

VENNE, A. S.; VOGTLE, F. N.; MEISINGER, C.; SICKMANN, A.; ZAHEDI, R. P. Novel highly sensitive, specific, and straightforward strategy for comprehensive N-terminal

proteomics reveals unknown substrates of the mitochondrial peptidase Icp55. **Journal of proteome research**, v. 12, n. 9, p. 3823-3830, 2013.

VESTWEBER, D.; BRUNNER, J.; BAKER, A.; SCHATZ, G. A 42K outer-membrane protein is a component of the yeast mitochondrial protein import site. **Nature**, v. 341, n. 6239, p. 205-209, 1989.

VOGTLE, F. N.; PRINZ, C.; KELLERMANN, J.; LOTTSPREICH, F.; PFANNER, N.; MEISINGER, C. Mitochondrial protein turnover: role of the precursor intermediate peptidase Oct1 in protein stabilization. **Molecular biology of the cell**, v. 22, n. 13, p. 2135-2143, 2011.

VOGTLE, F. N.; WORTELKAMP, S.; ZAHEDI, R. P.; BECKER, D.; LEIDHOLD, C.; GEVAERT, K.; KELLERMANN, J.; VOOS, W.; SICKMANN, A.; PFANNER, N.; MEISINGER, C. Global analysis of the mitochondrial N-proteome identifies a processing peptidase critical for protein stability. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 428-439, 2009.

WAGNER, K.; MICK, D. U.; REHLING, P. Protein transport machineries for precursor translocation across the inner mitochondrial membrane. **Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics**, v. 1793, n. 1, p. 52-59, 2009.

WOELLHAF, M. W.; HANSEN, K. G.; GARTH, C.; HERRMANN, J. M. Import of ribosomal proteins into yeast mitochondria. **Biochemistry and cell biology**, p. 1-10, 2014.

WU, Y.; SHA, B. Crystal structure of yeast mitochondrial outer membrane translocon member Tom70p. **Nature structural & molecular biology**, v. 13, n. 7, p. 589-593, 2006.

YANISCH-PERRON, C.; VIEIRA, J.; MESSING, J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. **Gene**, v. 33, n. 1, p. 103-119, 1985.

Apêndice A - Iniciadores utilizados

Nome	Sequência (5' -> 3')	Finalidade
496	CACCCGGGTACACGAGTTTTTTGACG	Clonagem da ORF <i>MRPL34</i> no vetor YCPlac33 ^A , utilizado com o iniciador 497
497	GGGAGCTCGTCGGCAAATGCTACTTC	Clonagem da ORF <i>MRPL34</i> no vetor YCPlac33 ^A , utilizado com o iniciador 496
494	CACCCGGGGGTACGCTGAATGGATAC	Clonagem da ORF <i>YDL119c</i> no vetor YCPlac33 ^A , utilizado com o iniciador 495
495	GGGAGCTCAACAGCCTCCAAATAAGC	Clonagem da ORF <i>YDL119c</i> no vetor YCPlac33 ^A , utilizado com o iniciador 494
504	CACCCGGGTCTGTTGGTTTTCTGACC	Clonagem da ORF <i>YOR022c</i> no vetor YCPlac111 ^A , utilizado com o iniciador 505
505	GGGAGCTCTCCACAGCTGTATCAATC	Clonagem da ORF <i>YOR022c</i> no vetor YCPlac111 ^A , utilizado com o iniciador 504
Ydr115-10	GGCAGATCTAGAGCAGAGAAAGAAGAT	Clonagem da ORF <i>MRPL34</i> no vetor pUC18 ^B , utilizado com o iniciador Ydr115-11
Ydr115-11	GGCAGATCTGGTGGTTTTGTCTCATT	Clonagem da ORF <i>MRPL34</i> no vetor pUC18 ^B , utilizado com o iniciador Ydr115-10
Ydl119c-10	GGCAGATCTCGTGGTAAGCTACTGCTC	Clonagem da ORF <i>YDL119c</i> no vetor pUC18 ^B , utilizado com o iniciador Ydl119c-11
Ydl119c-11	GGCAGATCTGGAGTTGGTCAAAAGATT	Clonagem da ORF <i>YDL119c</i> no vetor pUC18 ^B , utilizado com o iniciador Ydl119c-10
Yor022c-10	GGCAGATCTCTGGTTGATCAGTAAACGC	Clonagem da ORF <i>YOR022c</i> no vetor pUC18 ^B , utilizado com o iniciador Yor022c-11
Yor022c-11	GGCAGATCTGGGTACGTCTATGGCATA	Clonagem da ORF <i>YOR022c</i> no vetor pUC18 ^B , utilizado com o iniciador Yor022c-10
Ydr115w-110	CCGGGATCCATGCCACTATTTGCAAGG	Clonagem da ORF <i>MRPL34</i> no vetor pATH11 ^C , utilizado com o iniciador Ydr115w-120
Ydr115w-120	GGCCTGCAGATGAGACAAAACCACCTACC	Clonagem da ORF <i>MRPL34</i> no vetor pATH11 ^C , utilizado com o iniciador Ydr115w-110
Yor022-14	CCGGCATGCATGCTACGGTTTACTCATC	Clonagem da ORF <i>YOR022c</i> no vetor pATH11 ^C , utilizado com o iniciador 505
Ydr115w-HA	GGCGAGCTCATGTACCCATACGACGTCCCAGACTACGCTGCTCCACTATTTGCAAGGCTC	Adição da <i>tag</i> de hemaglutinina na porção N-terminal de <i>MRPL34</i> , utilizado com o iniciador 497
Ydl119c-HA	GGCGAGCTCAAGCGTAGTCTGGGACGTCTGTA TGGGTACATGAATCTTTTGACC	Adição da <i>tag</i> de hemaglutinina na porção C-terminal de <i>YDL119c</i> , utilizado com o iniciador Ydl119-1
Ydl119-1	GGCCTGCAGATCAGCTCAATGGCCACC	Adição da <i>tag</i> de hemaglutinina na porção C-terminal de <i>YDL119c</i>
Yor022-HA	GGCGAGCTCAAGCGTAGTCTGGGACGTCTGTA TGGGTAAACGAGTCTTTCTTTTAC	Adição da <i>tag</i> de hemaglutinina na porção C-terminal de <i>YOR022c</i> , utilizado com o iniciador Yor022c-1
Yor022c-1	GGCGCATGCCTGATTGACATGGTTAAT	Adição da <i>tag</i> de hemaglutinina na porção C-terminal de <i>YOR022C</i> , utilizado com o iniciador Yor022-HA
115-F2	GGCCTGCAGGGTCATTTGAAGCTCGGATC	Inserção de mutação de ponto em <i>MRPL4</i>
W101R-F	GGCTTAAGCCATTGAAATTTACATAC	Inserção de mutação de ponto W101R em <i>MRPL4</i> , utilizado com iniciador 497
W101R-R	GGGCTTAAGAACCGCCTACCTTTGAGCTTCC TCC	Inserção de mutação de ponto W101R em <i>MRPL4</i> , utilizado com iniciador 115-F2
F79A-F	GGCGCTAGCTAGGGCCAAGAGCAAACAGGGC	Inserção de mutação de ponto F79A em <i>MRPL4</i> , utilizado com iniciador 497
F79A-R	GGCGCTAGCGCACCAAAGTTCTCTTCCGTT TC	Inserção de mutação de ponto W101R em <i>MRPL4</i> , utilizado com iniciador 115-F2
R95W-F	GGCCTTAAGCGATGGAAGCTCAAAGGTAGGT GG	Inserção de mutação de ponto F79A em <i>MRPL4</i> , utilizado com iniciador 497

R95W-R	GGCCTTAAGTATCTTAGAGCCCTGTTTGCTC TTGG	Inserção de mutação de ponto W101R em <i>MRPL4</i> , utilizado com iniciador 115-F2
TRY1	GGGGGATCCGGTCAAAGAAGATGGAAATC	Amplificação a partir do nucleotídeo 165 de <i>MRPL4</i> , utilizado com TRY-R
TRY2	GCGGGATCCTCAAGGGGTAACACCTATC	Amplificação a partir do nucleotídeo 183 de <i>MRPL4</i> , utilizado com TRY-R
TRY-3	CCGGGATCCACCTATCAACCTAGTACATTG	Amplificação a partir do nucleotídeo 195 de <i>MRPL4</i> , utilizado com TRY-R
TRY-R	CCGCTGCAGGCGAATCAGTTTTGTCTTG	Utilizado com os iniciadores TRY1, TRY2 e TRY3

A (GIETZ; SUGINO, 1988); B (YANISCH-PERRON et al., 1985); C (KOERNER et al., 1991)

As regiões sublinhadas referem-se aos sítios de restrição.

Apêndice B - Estratégias para construção dos mutantes nulos

Estratégia A

Estratégia B

Após a clonagem dos genes, foram utilizadas duas estratégias: na primeira, a região central do gene a ser interrompido foi removida com auxílio de enzimas de restrição e a marca de seleção foi inserida no lugar da sequência retirada. Na segunda, a ORF foi transferida para um vetor menor, amplificada com iniciadores que continham sítios de restrição e que foram desenhados de forma que apenas uma pequena porção das extremidades da ORF fosse mantida. Em seguida a marca de seleção foi inserida. Prosseguiu-se com a retirada do cassete e transformação da levedura. O eficiente sistema de recombinação homóloga da levedura fez a substituição do gene selvagem pelo gene interrompido (ORRWEAVER; SZOSTAK, 1983).

Apêndice C - Estratégia para construção de mutantes de ponto em *YDR115w*

Foram utilizados 2 pares de iniciadores, sendo que um deles carrega a alteração de um ou mais nucleotídeos responsáveis pela alteração do aminoácido (traço vermelho). Após as duas reações de PCR independentes, prosseguiu-se com a digestão dos fragmentos e do vetor integrativo (as enzimas de restrição estão representadas pelas cores azul, verde e laranja). Os dois fragmentos e o vetor passaram por uma reação de ligação e posteriormente foram transformados em *E.coli*. Após a retirada do plasmídeo contendo a construção correta da bactéria, fez-se a transformação na linhagem mutante diplóide heterozigota. A levedura foi induzida à esporulação e após a micromanipulação de tétrades, foi testada a capacidade respiratória do esporo selecionado.

Apêndice D - Propriedades de crescimento dos mutantes *Δydl119c* e *Δyor022c*

Através do teste de diluição seriada, após três dias, é possível observar que os mutantes nulos apresentam crescimento igual à linhagem selvagem.