BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo
1994

Universidade de São Paulo Instituto de Química

COMUNICAÇÃO ENTRE MITOCÔNDRIA E NÚCLEO CONTROLA A TRANSCRIÇÃO DO GENE *GAL1* DE *Saccharomyces cerevisiae*

JOSÉ RIBAMAR DOS SANTOS FERREIRA JÚNIOR
TESE DE DOUTORADO

Orientador: Prof. Dr. Hamza El-Dorry

T
574.88
F383c

São Paulo
10/09/2001

DEDALUS - Acervo - CQ

30100004455

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

F383c Ferreira Júnior, José Ribamar dos Santos
Comunicação entre mitocôndria e núcleo controla a
transcrição do gene GAL1 de *Saccharomyces cerevisiae* /
José Ribamar dos Santos Ferreira Júnior. -- São Paulo,
2001.
99p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : El-Dorry, Hamza Fahmi Ali

1. Biologia molecular 2. Controle da expressão gênica I. T.
II. El-Dorry, Hamza Fahmi Ali, orientador.

574.88 CDD

**“Comunicação entre Mitocôndria e Núcleo
Controla a Transcrição do Gene GAL1 de
Saccharomyces cerevisiae”**

*JOSÉ RIBAMAR DOS SANTOS
FERREIRA JÚNIOR*

*Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à
obtenção do grau de Doutor em Ciências - Área: Bioquímica.*

Aprovada por:

Prof. Dr. HAMZA FAHMI ALI EL DORRY
IQ – USP
(Orientador e Presidente)

Profa. Dra. GLÁUCIA MENDES SOUZA
IQ – USP

Profa. Dra. ALICIA JULIANA KOWALTOWSKI
IQ – USP

Prof. Dr. LUIS EDUARDO SOARES NETO
IB – USP

Prof. Dr. FRANCISCO GORGONIO DA NÓBREGA
UNIVAP

**SÃO PAULO
10 DE SETEMBRO 2001.**

Num lar de Guarulhos, durante o recenseamento de 1980:

— E o que você quer ser quando crescer? Perguntou a pesquisadora.

— Cientista! Eu quero ser cientista!

A pesquisadora espantou-se e a mãe sorriu, diante da resposta do filho de 10 anos.

Dedico essa tese, com todo carinho, à você mãe, por lembrar-me sempre desta história e ao meu pai, pelo microscópio que ganhei na infância e que lhe custou muito trabalho.

“Quem deixa para depois o que pode fazer logo,
perde o que nunca mais encontrará: o tempo”.
(Coelho Neto)

Agradecimentos

A Deus, que conduz a minha vida com a diligência que não tenho, porque me ama incondicionalmente.

Ao Prof. Dorry, meu orientador e amigo. Com quem desenvolvi meu senso crítico e por colocar-me diante de um tema atual e importante, no qual trabalhei com muito gosto. Aprendemos muito juntos.

Aos meus pais Ribamar e Maria, ao meu irmão Joles e à minha tia Rita. Vocês são maravilhosos. Agradeço por sempre apoiarem meus sonhos. Todos eles!!

Aos meus irmãos Ramones e Burgert-Brother. Pela amizade e felicidade que sempre experimento com vocês, por acreditarem em meu sonho e fazerem parte dele. “Onde nós pomos a mão, MUDA!” Longa vida ao Triunvirato 209!

À amiga Lia K. Muschellack, que contribuiu muito para esse trabalho. Jamais esquecerei do seu jeitinho mágico de realizar as coisas. Essa magia está em cada resultado desta tese, que também é sua!

À minha namorada Márcia, que com todo seu carinho e apoio, durante esses anos, mostrou-me que mulheres de temperamento calmo são encantadoras e virtuosas.

Ao amigo Junji, que me reaproximou de algo que adoro: a cultura japonesa!!

Ao Dr. Francisco G. Nóbrega, pelas linhagens W303-1A selvagem, *Δcox10* e por toda ajuda que recebi de seu laboratório. Mais que isso, agradeço por sua amizade sincera e valiosa, que inspirou grandes valores em meu caráter.

Ao Dr. Hans Ronne, da Universidade de Upsalla, por ceder a cepa W303-1A *Δmig1* e à Dra. Joan McEwen, do Beckman Research Institute, pelo plasmídeo pGUS1.

Ao Dr. Piotr Slonimski e à Dra. Nathalie Glab, da Université Pierre et Marie Curie, pelos vetores pC1 e pTW, que utilizei nos experimentos com a proteína URF13.

Ao Dr. Ivan Schumacher, com quem fiz os experimentos de citometria em fluxo, pelas boas risadas e amizade.

Aos amigos da secretaria do departamento de bioquímica, Fábio, Laura, Viviane e Simone, pela amizade e ajuda inestimáveis.

Ao Temjin, Apharnd, Belgdor, ViperII, Dorkas, Fei-Yen, Bal-Bas-Bow e Raiden, meus queridos virtuaroids!! “WARNING! THIS IS NOT A SIMULATORY SYSTEM. ALL REGISTERED USER DATA WILL BE TRANSFERED TO THE DEPLOYED VIRTUAROID SYSTEM MEMORY BANK.”

Aos colegas do laboratório, Augusto, Ari, Dra. Carla, Daniela, Eric, Felipe, Fernando, Juan, Dra. Nathalie, Zilda, Wilton e Silvia (uma das pessoas mais meigas que já conheci) e a todos os amigos dos laboratórios do IQ-USP, que sempre me receberam, ajudaram e fizeram parte de minha vida profissional.

Ao CNPq, pela bolsa de doutorado concedida.

Índice

Resumo.....	ix
Summary.....	x
Abreviaturas.....	xi
Introdução.....	1
O Sistema <i>GAL</i> e o catabolismo de galactose.....	2
Indução da transcrição por galactose.....	4
Gal4p.....	4
Gal80p.....	5
Gal3p.....	5
O complexo Gal3p-Gal4p-Gal80p.....	7
Repressão por glicose em <i>S. cerevisiae</i>	9
Mig1p.....	10
Snf1p.....	12
Repressão por Glicose no sistema <i>GAL</i>	13
Organização, estrutura e origem da mitocôndria.....	15
Mitocôndria e doença.....	16
Comunicação entre mitocôndria e núcleo.....	18
Linhagens <i>petite</i>	21
Ação de Inibidores sobre a atividade da mitocôndria.....	22
Alguns aspectos do gene <i>T-urf13</i> de milho.....	25
Objetivos.....	29
Resultados.....	30
Diferenças entre as cinéticas de indução de <i>GAL1</i> por galactose.....	30
Cinética de repressão por glicose e sua relação com a atividade mitocondrial.....	32
Indução de <i>GAL1</i> em linhagens <i>petite</i>	35
Efeito de inibidores de respiração sobre a indução de <i>GAL1</i>	39
Associação do metomil ao oligômero URF13 diminui a atividade mitocondrial.....	44
O Oligômero URF13 associado ao metomil afeta a indução de <i>GAL1</i>	50
Efeito de inibidores de respiração sobre o promotor <i>GAL1</i>	57
Envolvimento do repressor Mig1p no controle da indução de <i>GAL1</i>	
dependente da função mitocondrial.....	60
Discussão.....	63
A atividade mitocondrial é necessária para a indução.....	64

A proteína URF13 de milho causa disfunção mitocondrial que inibe a indução de <i>GAL1</i> ..69	
Inibindo-se a mitocôndria, Mig1p controla a indução de <i>GAL1</i> a nível transcricional.....73	
O segundo mensageiro da comunicação entre mitocôndria e núcleo.....75	
Conclusões.....78	
Material e métodos.....81	
Linhagens e meio de cultura.....81	
Obtenção do petite citoplasmático ρ^-81	
Recristalização do metomil à partir do Lannate.....82	
Plasmídios e transformação de levedura.....82	
Crescimento da cultura em meio líquido.....83	
Extração do RNA total.....83	
Northern blots.....84	
Amplificação dos genes <i>GAL1</i> , <i>ACT1</i> e <i>gusA</i>85	
Procedimento para corar as células com rodamina 123.....86	
Análise da atividade mitocondrial por citometria em fluxo.....86	
Experimentos de viabilidade.....86	
Referências.....88	
Curriculum vitae.....99	

Resumo

O gene nuclear *GAL1* de *Saccharomyces cerevisiae* codifica uma galactoquinase induzida por galactose e reprimida por glicose. Três evidências indicam que a transcrição de *GAL1* é dependente da atividade mitocondrial. Linhagens *petite*, com deleção no DNA da organela (ρ^-) ou rompimento em gene nuclear, que codifica a farnesil transferase mitocondrial, são incapazes de induzir *GAL1*. Os inibidores de respiração antimicina-A e azoteto de sódio (NaN_3), que atuam, respectivamente, nos complexos III e IV da cadeia de transporte de elétrons, impedem a indução de *GAL1*. Em células crescidas em glicose ou glicerol, o oligômero formado pela proteína URF13, na presença de metomil, produz um poro na membrana mitocondrial interna que reduz o potencial de membrana $\Delta\Psi$ e os níveis do mRNA de *GAL1*. A regulação dependente da atividade da mitocôndria ocorre a nível transcricional, pois o gene repórter *GUS*, sob controle de *GAL1*, não é induzido na presença de galactose, após tratamento prévio das células com antimicina-A ou NaN_3 . Mig1p é um repressor que atua diretamente no promotor de *GAL1* e inibe a transcrição da galactoquinase. Os resultados obtidos indicam que Mig1p media a repressão da indução de *GAL1*, na presença do inibidor da cadeia respiratória antimicina-A.

Summary

The nuclear gene *GAL1* of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a galactokinase induced by galactose and repressed by glucose. Three lines of evidence indicate that expression of *GAL1* transcript is dependent on mitochondrial activity. Petite strains in which mitochondrial DNA was partially deleted (ρ^-) or cells containing a disruption in the nuclear gene *COX10*, which encodes the mitochondrial farnesyl transferase, are unable to induce *GAL1*. Respiratory inhibitors such as antimycin-A or sodium azide (NaN_3), that inhibit complexes III and IV of the electron transport chain, respectively, affect *GAL1* induction. Functional expression of the maize protein URF13, which is translocated to the mitochondrial inner membrane, forming a pore that leads to a reduction of the mitochondrial membrane potential $\Delta\Psi$ and reduces the levels of *GAL1* transcripts. Experiments using a heterologous gene fusion showed that the inhibition of *GAL1* expression, by treatment of cells with antimycin-A or NaN_3 , controls the expression of *GAL1* at the transcriptional level. Mig1p is a repressor that binds *GAL1* promoter. Our results indicate that Mig1p mediates the repression of *GAL1* induction, observed in the presence of the mitochondrial inhibitor antimycin-A.

Abreviaturas

$\Delta\Psi$ – potencial da membrana interna mitocondrial

ADP – adenosina difosfato

AMP – adenosina monofosfato

AMPK – proteína quinase ativada por AMP

ATP – adenosina trifosfato

bHLH-Zip – zíper de leucina básico tipo alça-hélice-alça

CCCP – 3-clorofenilhidrazona carbamoilcianeto

CoA – acetil coenzima A

DiOC₆(3) – iodeto de 3,3'-dihexiloxacarbocianina

DNA – ácido desoxirribonucleico

DNP – 2,4-dinitrofenol

FADH₂, FAD – formas reduzida e oxidada da flavina adenina dinucleotídeo

mRNA – RNA mensageiro

mtDNA – DNA mitocondrial

NADH, NAD⁺ – formas reduzida e oxidada da nicotinamida adenina dinucleotídeo

RNA – ácido ribonucleico

ROS – espécies reativas de oxigênio

rRNA – RNA ribossomal

TNF – fator de necrose tumoral

tRNA – RNA transportador

UAS – upstream activating sequence

UASr – UAS das proteínas Rtg, ativadoras da expressão de *CIT2*

UDP – uridina difosfato

URS – upstream repressing sequence

Introdução

A mitocôndria, organela presente em células eucarióticas, possui papel importante, dentro do controle metabólico celular. Sua membrana externa produz fosfolípidos e ácidos graxos; nas cristas da membrana interna localizam-se os complexos da cadeia de transporte de elétrons e a ATP sintase, e no gel da matriz mitocondrial encontram-se o complexo piruvato desidrogenase, enzimas dos ciclos do ácido cítrico e da uréia, gliconeogênicas e da β -oxidação de ácidos graxos.

Nos últimos dez anos, o número crescente de publicações sobre doenças relacionadas a disfunções mitocondriais (Scheffler, 2000) (surdez, diabetes, doenças neurológicas, envelhecimento (Raha e Robinson, 2000) etc, as quais recebem atenção especial da biomedicina) e o entendimento do mecanismo das caspases (proteases efetoras da morte celular programada, denominada apoptose) (Green e Reed, 1998), trouxeram mais evidências de que a mitocôndria possui papel central para a célula.

Muito recentemente, um trabalho sobre evolução sugeriu que a mitocôndria permitiu que os organismos heterótrofos primitivos conquistassem a multicelularidade, aproveitando o alto rendimento da produção de ATP na respiração, agregando-se no meio (Pfeiffer et al., 2001).

Essas trabalhos mostram que a mitocôndria tem atraído um grande interesse para pesquisas relacionadas ao seu papel na célula e à descoberta de novas abordagens de estudo e inserção em temas de grande impacto como doenças, evolução e morte celular.

Uma abordagem que surgiu nesta última década é o estudo da regulação retrógrada, termo dado à comunicação entre mitocôndria e núcleo, isto é, quando a

função mitocondrial determina padrões de expressão gênica nuclear (Sekito et al., 2000). Esta tese, portanto, está inserida no cenário atual, pois trata da regulação transcricional de *GAL1* (um gene muito estudado em levedura) quando a célula sofre uma perturbação na função mitocondrial, obtendo-se resultados que indicam que um dos grandes paradigmas do controle transcricional de levedura pode sofrer regulação retrógrada.

O Sistema GAL e o catabolismo de galactose

Em *Saccharomyces cerevisiae*, os genes responsáveis pelo catabolismo de galactose e do dissacarídeo melibiose (*O*- α -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glicopirranose) correspondem ao sistema *GAL* (revisto em Melcher, 1997); um conjunto de enzimas cuja expressão gênica é altamente regulada.

A melibiose, no meio extracelular, é hidrolisada por uma enzima chamada melibiase, uma α -D-galactosídeo galactohidrolase, codificada pelo gene *MEL1*, que hidrolisa a ligação (α 1 $\rightarrow$ 6) do dissacarídeo, originando galactose e glicose (Figura 1). Através do transportador galactose permease, codificado pelo gene *GAL2*, a galactose entra na célula e sofre fosforilação dependente de ATP, pela ação da galactoquinase, produto do gene *GAL1*. O gene *GAL7* codifica a galactose-1-fosfato uridiltransferase, que transforma a galactose-1-fosfato e UDP-glicose em UDP-galactose e glicose-1-fosfato. Regenera-se a molécula de UDP-glicose, à partir de UDP-galactose, na reação catalizada pela UDP-galactose epimerase, codificada pelo gene *GAL10*. Finalmente, a UDP-glicose pirofosforilase converte UDP-glicose em glicose-1-fosfato que, na presença da fosfoglicomutase, produto do gene *GAL5*, gera glicose-6-fosfato, o qual prossegue pela via glicolítica.

Fig. 1. Metabolismo de galactose e do dissacarídeo melibiose. A galactose entra na célula através do transportador Gal2p. Em seguida, é metabolizada até glucose-6-fosfato, e segue pela via glicolítica. As enzimas codificadas pelos genes *GAL1*, *GAL7* e *GAL10* correspondem à via de Leloir.

As reações catalisadas pelos produtos de *GAL1*, *GAL7* e *GAL10* correspondem à via de Leloir (Melcher, 1997). Esses genes atingem níveis de indução de 1000 vezes, quando o crescimento ocorre em galactose, não sendo transcritos em outras fontes de carbono como glicerol ou glicose. E a glicose é capaz de reprimir fortemente o sistema *GAL* (Gancedo, 1998).

Indução da transcrição por galactose

A indução por galactose é controlada por três proteínas: Gal4p, Gal80p e Gal3p. Na ausência de galactose, a proteína Gal80p bloqueia a ação do ativador Gal4p, impedindo a ativação transcricional (Figura 2B). Na presença de galactose, Gal3p liga-se a Gal80p aliviando a repressão sobre a proteína Gal4p, que se liga aos promotores dos genes do sistema *GAL* e ativa a transcrição (Figura 2A) (revisto em Melcher, 1997).

Gal4p

A transcrição dos genes *GAL1*, *GAL2*, *GAL7*, *GAL10* e *MEL1*, envolvidos no catabolismo de galactose e melibiose, é ativada pela proteína Gal4p.

Gal4p possui um domínio de ligação ao DNA do tipo “zinc finger” C₂C₂ em sua porção N-terminal (Johnston, 1987). Por causa disso, o ativador reconhece a sequência consenso CGGA(G/C)GACAGTC(C/G)TCCG (Giniger et al., 1985), presente de uma a quatro cópias no elemento UAS (“upstream activating sequence”) dos promotores do sistema *GAL*. Ao se ligar ao DNA, Gal4p forma um dímero, pois possui um domínio de dimerização interno, entre os aminoácidos 50 a 100 (Carey et al., 1989). Duas regiões de ativação acídicas; uma na porção C-terminal e outra próxima ao “zinc

finger”, conferem o poder transativador (Ma e Ptashne, 1987), pois interagem com o complexo básico de transcrição basal.

A atividade de Gal4p é regulada pelo produto do gene *GAL80* e por fosforilação (Mylin et al., 1989). Observou-se que a fosforilação, especialmente na Ser-699, é necessária para a ativação máxima da transcrição (Sadowski et al., 1996), ocorrendo após Gal4p estimular a montagem do complexo transcricional (Melcher, 1997).

Gal80p

O regulador negativo Gal80p impede a ação ativadora de Gal4p. Na ausência de galactose, o produto do gene *GAL80* associa-se aos 30 aminoácidos da porção C-terminal de Gal4p, forma um complexo (Ma e Ptashne, 1987) e impede a transcrição (Giniger et al., 1985). Descobriu-se, muito recentemente, que Gal80p dimeriza-se, estabilizando a ligação Gal4p-Gal80p e, indiretamente, a ligação Gal4p-DNA. Os dímeros Gal80p-Gal80p formam multímeros, uns com os outros, transitoriamente; e a interação estável entre eles aumenta a repressão nos promotores (Figura 2C), reduzindo a acessibilidade residual de Gal4p-Gal80p a Gal3p ou à maquinaria transcricional (Melcher e Xu, 2001). Em virtude disso, cepas *GAL80* necessitam de galactose para induzir os genes do sistema *GAL*. Nas linhagens *gal80*, deficientes no regulador, *GAL4* é expresso em seu nível máximo, e o ativador liga-se aos seus promotores-alvo, estimulando a transcrição.

Gal3p

O papel de *GAL3* é essencial no mecanismo de indução dos genes do sistema *GAL*. Acreditava-se que Gal3p, cataliticamente, produzisse um indutor ou co-indutor, o qual provavelmente deslocaria Gal80p ou mudaria a conformação desta proteína,

Fig. 2. Controle transcricional do genes *GAL1*, *GAL7* e *GAL10*. **A** – indução por galactose: o ativador Gal4p liga-se aos UAS dos promotores do sistema *GAL* e ativa a transcrição, após Gal3p, na presença de galactose e ATP, atuar sobre Gal80p; **B** – repressão na ausência de galactose: Gal80p liga-se ao C-terminal de Gal4p e inibe a transcrição e **C** – repressão completa por ação dos dímeros Gal80p-Gal80p: os dímeros de Gal80p formam multímeros que reduzem a acessibilidade residual de Gal4-Gal80p à maquinaria transcritcional ou a Gal3p, que poderia passar pelo requerimento de galactose e ATP.

liberando ou desimpedindo Gal4p, de modo a permitir a indução (Tsuyumu e Adams, 1974; Broach, 1979). Porém, não se encontrou a molécula capaz de disparar a indução por galactose, tampouco uma atividade catalítica em Gal3p responsável pela indução.

Gal3p possui 520 resíduos de aminoácidos e 70-80% de similaridade com galactoquinase (Vollenbroich et al., 1999; Platt et al., 2000). Embora similar a Gal1p, o produto do gene *GAL3* não é capaz de fosforilar galactose na presença de ATP (Bajwa et al., 1988). Entretanto, recentemente, mostrou-se que a inserção de serina e alanina na posição 164 de Gal3p converte a proteína numa galatoquinase ativa (Platt et al., 2000).

Explorando-se a similaridade, descobriu-se que a expressão de alto número de cópias de *GAL1* suprime a mutação *gal3*, sugerindo que as duas proteínas possuem mesma função (Bhat et al., 1990). Essa semelhança funcional está presente na região altamente conservada das galactoquinases entre as espécies, que constitui na sequência “assinatura” PGRVNLIGEHDY (Kalaydjieva et al., 1999). Porém, Murthy e Bhat (2000) removeram a “assinatura” de galactoquinase presente em Gal3p e verificaram que essa deleção não leva à perda da sinalização da indução por galactose.

Em resumo: Gal3p (similar a Gal1p) não fosforila galactose, sua sequência assinatura de galactoquinase não é necessária para a função de indutor transcricional e nenhuma atividade catalítica, capaz de gerar moléculas indutoras, foi encontrada. Contudo, Bhat e Hopper (1991) propuseram um modelo simples, não catalítico, para a indução: Gal3p ligar-se-ia ao complexo Gal4p-Gal80p, provocando uma transição para uma forma capaz de ativar a transcrição.

O complexo Gal3p-Gal4p-Gal80p

Gal3p responde ao sinal da galactose que induz o sistema *GAL*. Mostrou-se em *Kluyveromyces lactis* (Zenke et al., 1996) e em *S. cerevisiae* (Suzuki-Fujimoto et al., 1996) a interação entre Gal80p e Gal3p, relacionando-se à resposta de indução. Na presença de galactose e ATP, Gal3p liga-se a Gal80p e induz uma mudança conformacional no complexo Gal4p-Gal80p, de modo a permitir a ativação transcricional (Zenke et al., 1996; Blank et al., 1997).

A proteína Gal80p inibe a interação de Gal4p com a TBP (TATA binding protein) (Ansari et al., 1998), impedindo o recrutamento da RNA polimerase II pelo ativador. A ligação de Gal3p com Gal80p desestabiliza o complexo Gal4p-Gal80p; Gal80p reposiciona-se na porção média de Gal4p, permanecendo associado ao ativador, o qual recruta a maquinaria transcricional (Sil et al., 1999). Platt e Reece (1998) propõem um modelo similar e mostram a formação do complexo ternário Gal3p-Gal4-Gal80p *in vitro*.

Outro aspecto estudado desse mecanismo é a localização celular das proteínas Gal80p e Gal3p. Acredita-se que a interação entre essas proteínas ocorra no núcleo (Platt e Reece, 1998; Suzuki-Fujimoto et al., 1996; Yano e Fukasawa, 1997). Todavia, descobriu-se que Gal3p localiza-se no citoplasma (e está aparentemente excluída do núcleo), enquanto que Gal80p pode ser citoplasmática ou nuclear (Peng e Hopper, 2000).

O conjunto desses dados permite elaborar o seguinte mecanismo: Gal3p, provavelmente no citoplasma, promove a indução dos genes do sistema *GAL* alterando a conformação do complexo Gal4p-Gal80p, na presença de galactose e ATP (Figura

2A). Gal80p desloca-se do C-terminal para a região central de Gal4p (compare as figuras 2A e 2B) (Sil et al., 1999), permitindo a interação do domínio ativador com os fatores gerais de transcrição (Platt e Reece, 1998; Yano e Fukasawa, 1997).

Além da indução altamente regulada pelo complexo ternário Gal3p-Gal4p-Gal80p, o sistema *GAL* sofre repressão por glicose: um mecanismo geral que permite as células de levedura optar pela fonte de carbono de metabolismo mais simples.

Repressão por glicose em *S. cerevisiae*

Quando a glicose está presente, os genes que codificam as enzimas do metabolismo de fontes alternativas de carbono sofrem repressão (revisto em Gancedo, 1998). O açúcar dispara um sinal, o qual é transmitido aos genes pelos ativadores e repressores, controlando a transcrição, e às proteínas, que sofrem inativação/proteólise (Holzer, 1976).

A glicose entra na célula por difusão facilitada. Os genes da família *HXT* são responsáveis pelo transporte (Boles e Hollenberg, 1997) e, em particular, Rgt2p e Snf3p atuam como sensores dos níveis altos e baixos do carboidrato, respectivamente (Özcan et al., 1996; Özcan et al., 1998). Em seguida, a glicose é fosforilada e metabolizada. A fosforilação é reconhecida como um sinal intracelular importante da presença deste açúcar. A proteína Hxk2p (hexoquinase 2), provavelmente, está envolvida na sinalização, pois mutantes *hvk2* são resistentes à repressão (Zimmermann e Scheel, 1977).

Fosforilações e desfosforilações transmitem o sinal até os ativadores e repressores transcricionais. Os elementos intermediários mais importantes da repressão por glicose, envolvidos nessas reações, são a quinase Snf1p (Carlson, 1981; Cyraci,

1977; Zimmermann et al., 1977) e a fosfatase Glc7p (Feng et al., 1991), a qual interage fortemente com o produto do gene *REG1* (Tu e Carlson, 1995). Finalmente, fatores nucleares reprimem os genes de maneira efetiva. Dentre esses fatores, destaca-se o repressor Mig1p, que reprime o sistema *GAL* atuando diretamente nos promotores. A Figura 3 é a representação esquemática da via de sinalização da repressão por glicose descrita acima.

Mig1p

A proteína Mig1p (“zinc finger” C₂H₂) é um repressor que se liga ao elemento GC de sequência consenso (G/C)(C/T)GGGG, localizado no URS (upstream repressing sequence) dos promotores de vários genes reprimidos por glicose (Nehlin e Rone, 1990). Sua ligação requer uma região rica em AT a 5’ do elemento GC, que provavelmente permitiria uma dobra do DNA e facilitaria a interação DNA-proteína (Lundin et al., 1994).

Mig1p é capaz de recrutar o complexo Tup1p-Ssn6p, que, por sua vez, exerceria seu poder repressor na maquinaria de transcrição (Treitel e Carlson, 1995; Tzamarias e Struhl, 1994). Tup1p possui um domínio responsável pela repressão rico em alaninas e quase sem aminoácidos com carga (Tzamarias e Struhl, 1994). Ssn6p e Tup1p formam um complexo (Williams e Trumbly, 1991) capaz de reprimir diversas classes de genes, dependendo da proteína que se liga ao DNA a eles associada (Keleher et al., 1992). Acredita-se que o complexo Tup1p-Ssn6p exerce controle transcricional de repressão ou alterando a estrutura da cromatina (Cooper et al. 1994) ou acessando a maquinaria de transcrição (Reed et al., 1996).

Fig. 3. Representação esquemática da via de sinalização da repressão por glicose. A glicose entra na célula através dos transportadores Hxt_p. Em seguida, o sinal da fosforilação do carboidrato ativa a fosfatase Glc7_p, que impede a ação da quinase Snf1_p, permitindo que o repressor Mig1_p migre para o núcleo. Mig1_p recruta o complexo formado por Tup1_p-Ssn6_p, que, efetivamente, reprime a transcrição atuando diretamente no aparelho transcripcional. Setas indicam regulação positiva; setas interrompidas, regulação negativa.

A glicose reprime a transcrição nos promotores através de Mig1p: o repressor recruta o complexo Tup1p-Ssn6p que interage com a maquinaria transcricional. Entretanto, a quinase Snf1p é capaz de regular Mig1p, fosforilando a proteína (Treitel e Carlson, 1995). Assim, após remoção da glicose do meio, Mig1p é fosforilada e transportada para o citoplasma (DeVit et al., 1997).

Snf1p

O gene *SNF1* codifica uma proteína quinase completamente necessária para a desrepressão dos genes controlados por glicose (revisão em Carlson, 1999). Snf1p fosforila resíduos de serina e treonina (Celenza e Carlson, 1986) e possui um homólogo em mamífero, o qual corresponde à subunidade α da AMPK (proteína quinase ativada por AMP) (Carling et al, 1994; Mitchelhill et al., 1994; Woods et al., 1994).

O produto de *SNF1* encontra-se associado às proteínas Snf4p, Sip1p, Sip2p e Gal83p (Celenza e Carlson, 1989; Celenza et al. 1989; Yang et al., 1992, Yang et al., 1994). Mutantes *snf4* são incapazes de desreprimir os genes controlados por glicose (Entian e Zimmerman, 1982, Nigernborn e Carlson, 1984), indicando que Snf4p possui um papel importante na desrepressão, enquanto que o triplo mutante *sip1p sip2p gal83* não possui efeito na repressão do gene *GAL1* (Erickson e Johnson, 1993). Sugere-se que, em baixas concentrações de glicose, as proteínas Sip1p, Sip2p e Gal83p atuem como pontes entre Snf1p e Snf4p, formando um complexo (Jiang e Carlson, 1996).

Acredita-se que a proteína codificada por *SNF1* é regulada por fosforilação, pois extratos de células desreprimidas são capazes de ativar Snf1p; porém, se tratados previamente com proteínas fosfatases, a atividade da quinase Snf1p desaparece

(Wilson et al., 1996). No modelo provisório para a regulação de Snf1p, a desfosforilação, que ocorre na presença de glicose, provavelmente por causa da ação de Glc7p, enfraqueceria a interação entre Snf1p e Snf4p, permitindo que o sinal da repressão prosseguisse até os fatores nucleares.

Dentre os fatores nucleares importantes, Mig1p é um repressor transcricional cuja atividade é controlada pela quinase Snf1p (Östling e Ronne, 1998; DeVit et al., 1997). Por sua vez, o produto do gene *MIG1* atua nos promotores do sistema *GAL* na presença de glicose. Assim, a regulação da repressão/desrepressão dos genes do catabolismo de galactose seria da seguinte maneira: na ausência de glicose, Snf1p fosforilaria Mig1p e não ocorreria repressão, pois o repressor não se ligaria aos promotores. Na presença de glicose, o sinal do carboidrato ativaria uma fosfatase (provavelmente Glc7p) que inativaria Snf1p, permitindo a migração de Mig1p para o núcleo, havendo repressão — há evidências de que Mig1p seria fosforilada por Snf1p e defosforilada por Glc7p (DeVit et al., 1997). Nas linhagens *mig1*, os genes do sistema *GAL* não são mais reprimidos e não há necessidade de Snf1p para a desrepressão.

Repressão por Glicose no sistema GAL

A transcrição dos genes do sistema *GAL* é reprimida por glicose, mesmo na presença de galactose (Melcher, 1997; Gancedo, 1998). Nesse mecanismo de repressão (Figura 3), Mig1p é o fator nuclear mais importante, por causa de sua ação direta nos promotores (Nehlin e Ronne, 1990).

A proteína codificada por *MIG1* liga-se ao promotor de *GAL4*, reprimindo a síntese do ativador (Nehlin et al., 1991), e, além disso, reprime também a transcrição

dos genes *GAL1*, *GAL7* e *GAL10*, que pertencem à via catabólica de galactose. Ocorre repressão porque, ao se ligar ao DNA, o repressor Mig1p recruta o complexo Tup1p-Ssn6p, que atua diretamente nos fatores gerais de transcrição (Figura 3) (Gancedo, 1998).

Mig1p é regulada por fosforilação. Na presença de glicose, a fosfatase Glc7p inativa Snf1p e desfosforila o repressor, que migra para o núcleo e reprime os promotores (DeVit et al., 1997). Assim que a glicose se exaure, o produto de *SNF1* fosforila Mig1p, mantendo a proteína no citoplasma, o que permite a transcrição dos genes do sistema *GAL*.

Além de atuar nos promotores, a glicose interfere no mecanismo de indução, pois reprime a transcrição de *GAL2* e *GAL3*; respectivamente, o gene que codifica a permease e o indutor transcricional do sistema.

GAL2 é reprimido por glicose (Bram et al., 1986; Tschopp et al., 1986) e o seu produto, Gal2p, sofre proteólise (Lagunas, 1993). Dessa forma, impede-se o transporte de galactose nos transportadores existentes e a síntese de novas proteínas. Como Gal3p necessita dos moduladores alostéricos galactose e ATP, para interagir com o complexo Gal80p-Gal4p (Zenke et al., 1996; Blank et al., 1997), a indução é reduzida. Essa redução também ocorre porque o promotor de *GAL3* é reprimido por glicose (Johnston et al., 1994), diminuindo o número de proteínas Gal3p que poderiam passar pelo requerimento de ATP e galactose.

A glicose reprime também a mitocôndria (Ulery et al., 1994) e mutantes com deficiência no DNA mitocondrial induzem *GAL1* apenas após 5 dias (Bhat e Hopper, 1991), comparados com os poucos minutos da cepa selvagem. Acredita-se que a

mitocôndria tenha um papel importante na indução e, provavelmente, participe também da sinalização da repressão.

Organização, estrutura e origem da mitocôndria

Organela característica de eucariotos, a mitocôndria possui estrutura interna, genética, expressão gênica, evolução e biossíntese muito estudadas.

A estrutura da mitocôndria pode ser dividida em três componentes principais: matriz, membrana interna e membrana externa (Voet e Voet, 1995). A matriz é um gel onde se encontram o complexo piruvato desidrogenase, enzimas do ciclo do ácido cítrico, do ciclo da uréia, gliconeogênicas e para a β -oxidação de ácidos graxos. RNA e DNA polimerases estão presentes para a transcrição das proteínas codificadas no genoma mitocondrial e para a replicação da organela. Dobramentos denominados cristas constituem a membrana mitocondrial interna, onde se localizam os complexos da cadeia de transporte de elétrons e a ATP sintase. Um trabalho recente sugere a formação de supercomplexos denominados “respirassomos” (Schagger e Pfeiffer, 2000), abandonando a hipótese de que os complexos flutuem independentes na bicamada lipídica. A membrana externa é lisa, envolvendo completamente a organela. Produz fosfolipídeos, sintetiza ácidos graxos e possui vários sistemas de transporte, responsáveis pela entrada de piruvato, ADP, fosfato e saída de ATP.

O DNA mitocondrial (mtDNA) de diversos organismos foi seqüenciado. Todos apresentaram conjuntos similares de rRNAs, tRNAs e genes que codificam proteínas essenciais. Seu tamanho varia de 16 kb em humanos, 80 kb em leveduras, a 200 kb em plantas superiores.

O genoma mitocondrial não codifica todas as proteínas da organela. A maior parte dos genes cujos produtos são proteínas mitocondriais encontram-se no núcleo. Por exemplo, o complexo IV de *S. cerevisiae* contém três produtos do mtDNA e de 6 a 8 no DNA nuclear (Poyton e McEwen, 1996). A maioria desses genes, em condições anaeróbias ou crescimento em glicose, sofre repressão, e a atividade mitocondrial é mínima (Ulery et al., 1994).

Toda complexidade das membranas, enzimas e ácidos nucleicos mitocondriais reside numa estrutura cujo tamanho é, aproximadamente, o de uma célula bacteriana. Essa semelhança com procarioto permitiu elaborar a hipótese endossimbionte para a origem da mitocôndria (Margulis, 1981). Uma célula primitiva, ancestral da célula eucariótica, com prematuro núcleo diferenciado e obtendo energia exclusivamente da via glicolítica, teria englobado, por endocitose, uma protobactéria, capaz de utilizar o oxigênio de uma atmosfera em que este gás começava a ser abundante. A conjugação manteve-se em virtude da simbiose entre os dois organismos, originando, bilhões de anos após, a moderna célula eucariótica. Porém, ainda no atual curso evolutivo, observam-se consequências catastróficas dessa aliança.

Mitocôndria e doença

A mitocôndria está associada a doenças neurodegenerativas, diabetes, envelhecimento e apoptose.

As principais desordens neurológicas, que envolvem disfunção mitocondrial, são as doenças de Alzheimer, Huntington e Parkinson. A primeira, uma forma progressivamente insidiosa de demência, está associada a mutações no complexo IV da cadeia respiratória (Davis et al., 1997). A segunda, uma deterioração

neurobiológica inevitavelmente fatal, cujos sintomas aparecem aos 40anos, tem ligação com mutações no DNA mitocondrial e com disfunções no transporte de elétrons (Hanna e Nelson, 1999). E a terceira, que causa a incapacidade de parar a agitação nervosa involuntária dos movimentos corporais, possui suas origens em defeitos no complexo I (Swerdlow et al., 1996).

Células pancreáticas em cultura, tratadas com brometo de etídio por 6 dias, sofrem redução da transcrição mitocondrial e não secretam insulina, na presença de glicose 20 mM (Hayakawa et al., 1998). Essa evidência e o fato de mutação mitocondrial estar associada ao diabetes herdado maternalmente (Kadowaki et al., 1994) mostram a importância da mitocôndria funcional nesse tipo de doença.

Deficiências na função mitocondrial possuem participação no mecanismo de envelhecimento e morte celular programada, que recebe a denominação de apoptose. Em pacientes com progeria, uma doença rara, caracterizada pelo rápido e prematuro envelhecimento, resultando na morte da criança portadora, os telômeros são encurtados violentamente. O encurtamento dos telômeros determina o número máximo de divisões de uma célula (von Zglinicki et al., 2000), que ocorre até o limite estabelecido pelo número de repetições TTAGGG em tandem, presentes na sua estrutura e necessárias para a replicação. Esse encurtamento é, provavelmente, causado por espécies reativas de oxigênio (ROS), geradas nos complexos mitocôndriais (Raha e Robinson, 2000). As espécies reativas de oxigênio também participam do processo de morte celular programada. De fato, na mitocôndria ocorrem vários eventos como liberação de ativadores de caspases (citocromo c), redução do potencial

transmembranar $\Delta\Psi$, rompimento do transporte de elétrons e diminuição na produção de ATP (Green e Reed, 1998) relacionados às vias de sinalização para apoptose.

O conjunto desses fatos sugere que a cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria, capaz de gerar ROS, está envolvida num tipo de sinalização cuja deficiência leva à doença.

Comunicação entre mitocôndria e núcleo

Evidências encontradas em diversos organismos indicam uma via de sinalização da mitocôndria para o núcleo. Aparentemente, os complexos da cadeia de transporte de elétrons estão envolvidos nessa comunicação em fungos (*Trichoderma reesei* e *S. cerevisiae*) e em grande variedade de células de mamífero.

No fungo de solo *T. reesei*, que utiliza celulose como fonte de energia, a expressão do gene nuclear *cbh1*, que codifica a celobiohidrolase I do sistema celulolítico, é induzida por celulose e reprimida por glicose (Carle-Urioste et al., 1997; el-Gogary et al., 1989). Em baixa tensão de oxigênio e na presença de inibidores da atividade mitocondrial, como KCN (inibidor do complexo IV) e DNP (2,4-dinitrofenol, que desacopla o transporte de elétrons da síntese de ATP), a expressão dos mRNAs de *cbh1* é reprimida a nível transcricional (Abrahao-Neto et al., 1995). Em *S. cerevisiae*, o promotor de *cbh1*, controlando o repórter *LacZ*, sofre repressão por glicose, requerendo os produtos dos genes *SNF1* e *SSN6*, que regulam os genes de levedura reprimidos pelo carboidrato (Carraro et al., 1998). Além disso, observou-se que sua regulação é dependente da atividade mitocondrial, sugerindo a existência de mecanismo semelhante entre os dois organismos. É provável que fatores nucleares

estejam envolvidos na sinalização da mitocôndria para o núcleo em *T. reesei*, possuindo análogos em *S. cerevisiae*.

A transcrição de diversos genes nucleares aumenta em cepas de levedura mit^- , ρ^- e ρ^0 , deficientes na função mitocondrial por causa de mutação no genoma da organela (Parikh et al., 1987), um fenômeno conhecido com regulação retrógrada. Os genes *YHB1* e, principalmente, *CIT2* possuem as bases moleculares dessa regulação bem caracterizadas.

A flavohemoglobina de *S. cerevisiae* é codificada no gene *YHB1*, cuja regulação é dependente da atividade mitocondrial. A transcrição de *YHB1* aumenta em células ρ^0 e em mutantes nucleares *pet*, deficientes do citocromo c oxidase (*pet* - mutantes respiratório-deficientes cuja lesão localiza-se no DNA nuclear) (Zhao et al., 1996). Os transcritos de *YHB1* também aumentam em células ρ^+ tratadas com antimicina A ou CN^- (Poyton e McEwen, 1996).

O gene *CIT2* codifica a citrato sintase peroxissomal, que cataliza o primeiro passo do ciclo do glioxilato (Liao et al., 1991). Em células selvagens, respiratório-competentes (ρ^+), a expressão de *CIT2* é basal. Porém, nas células com deleção total do mtDNA (*petites* ρ^0), a expressão de *CIT2* aumenta de 30 a 40 vezes. Tanto no mutante *cit1* (rompimento da isoforma mitocondrial da citrato sintase) quanto em células ρ^+ tratadas com antimicina A, a expressão de *CIT2* também aumenta, em relação à basal (Liao et al., 1991). Esses fatos sugerem fortemente que a expressão de *CIT2* é controlada pela atividade da mitocôndria. Utilizando-se a construção *CIT2-LacZ*, descobriu-se que a regulação ocorre a nível transcricional, pois o promotor de *CIT2* é regulado da mesma forma em células ρ^0 (Liao et al., 1991). Identificaram-se

dois elementos cis-atuantes de 76pb, denominados UASr, presentes no promotor de *CIT2*, aos quais se ligam as proteínas responsáveis pela expressão basal e elevada. *RTG1* e *RTG3* codificam fatores de transcrição do tipo zíper de leucina básico hélice-alça-hélice (bHLH-Zip) (Liao e Butow, 1993; Jia et al., 1997) que reconhecem o sítio GTCAC desses elementos. As proteínas Rtg1p e Rtg3p formam um heterodímero capaz de ativar a transcrição, pois possuem resíduos de aminoácidos básicos (e.g. histidina, ácido glutâmico e arginina) conservados nessa classe de ativadores (Jia et al., 1997). Sugere-se que Rtg1p facilite a ligação de Rtg3p ao UASr, através de interação direta com Rtg3p (Jia et al., 1997; Rothermel et al., 1997). A proteína Rtg2p também é necessária para a ativação da transcrição e possui um domínio de ligação ao ATP (Sekito et al., 2000), mas sua função é desconhecida.

Em grande variedade de células de mamífero, o fator de transcrição NF- κ B, relacionado aos eventos da sinalização das respostas inflamatória e imune, encontra-se inativo no citoplasma, formando um complexo com seu inibidor I κ B (Pahl e Baeuerle, 1997). Após estímulo com citocinas pró-inflamatórias, antígeno, infecção bacteriana ou viral, a atividade de NF- κ B é induzida por fosforilação, ocorrendo subsequente degradação proteolítica de I κ B. Livre do inibidor, o dímero de NF- κ B migra para o núcleo, onde ativa a transcrição dos genes da resposta inflamatória e imune (Baeuerle e Henkel, 1994). O ativador, provavelmente, protege a célula do mecanismo de apoptose, pois células deficientes em RelA (uma subunidade de NF- κ B) tratadas com fator de necrose tumoral (TNF) morrem, enquanto células controle, que induzem a resposta à citocina, permanecem viáveis. É provável que o mecanismo de ativação seja através de sinalização da mitocôndria para o núcleo, porque em células p^0 não ocorre

ativação de NF- κ B induzida por TNF (Schulze-Osthoff, 1992). Além disso, células ρ^+ , tratadas com inibidores que atuam nos complexos I e II da cadeia respiratória, sofrem diminuição na ativação de NF- κ B por TNF, enquanto que antimicina A (que atua no complexo III) potencializa o efeito (Poyton e McEwen, 1996).

Baseando-se nesses trabalhos, pode-se estudar a provável comunicação entre mitocôndria e núcleo de um gene qualquer, empregando-se cepas *petite* ρ^- ou ρ^0 , que sofreram, respectivamente, deleção parcial e total no mtDNA, ou utilizando-se inibidores dos complexos III (antimicina A) e IV (CN^- e N_3^-) da cadeia de transporte de elétrons, localizada na membrana mitocondrial interna.

Linhagens petite

Em *S. cerevisiae*, estuda-se a sinalização da mitocôndria para o núcleo empregando-se linhagens *petite* citoplasmáticas (ρ^- e ρ^0 – que sofreram mutação no DNA mitocondrial) ou nucleares (*pet* – mutante em gene nuclear que codifica para uma proteína mitocondrial) (Poyton e McEwen, 1996).

As cepas respiratório-deficientes ρ^- , cuja deleção parcial no mtDNA causa perda da síntese proteica da mitocôndria, e ρ^0 , que não possuem genoma mitocondrial, foram descobertas por Ephrussi, após tratamento de linhagens selvagens com acriflavina (Chen e Clark-Walker, 2000). O mesmo tipo de mutagênese é obtido utilizando-se brometo de etídio; poderoso agente mutagênico que se intercala entre as bases do mtDNA, causando mutação apenas na mitocôndria, sem afetar o genoma nuclear (Ferguson e von Borstel, 1992). Chamadas *petite*, em virtude do tamanho menor das colônias em relação ao tipo selvagem, as leveduras ρ^- e ρ^0 são incapazes de crescer em substratos não-fermentáveis como etanol e glicerol.

Mutantes *pet* possuem lesão no DNA nuclear e são incapazes de crescer em fontes de carbono não-fermentáveis. Um exemplo desse tipo de *petite* é a linhagem $\Delta cox10$. O produto do gene nuclear *COX10* é uma proteína necessária para a farnesilação do carbono 2 no grupo vinil da protoheme b, precursora da heme A, essencial para o complexo citocromo oxidase (Tzagoloff et al., 1993).

Esses dois tipos de linhagens *petite* permitem analisar diretamente os genes nucleares cuja expressão, provavelmente, depende da atividade mitocondrial, e comparar as contribuições das fisiologias complexas dos mutantes do mtDNA (ρ^- ou ρ^0) e do DNA nuclear ($\Delta cox10$), na comunicação entre organela e núcleo.

Inibidores da cadeia respiratória e outros inibidores da função mitocondrial também podem ser utilizados em condições tais que arremedem os efeitos observados nas linhagens *petite*.

Ação de Inibidores sobre a atividade da mitocôndria

Dentre todos os fenômenos importantes que ocorrem na membrana mitocondrial interna, o transporte de elétrons da cadeia respiratória acoplado à síntese de ATP é assunto dos mais estudados (Tzagoloff, 1982).

A cadeia respiratória, presente na membrana mitocondrial interna, inicia-se com a oxidação das espécies NADH (no complexo I) e FADH₂ (no complexo II), gerando NAD⁺, FAD e prótons (H⁺) na matriz mitocondrial (Figura 4). Elétrons são transferidos dos complexos I e II para a coenzima Q, seguem pelo complexo III, passam pelo citocromo c e, finalmente, reduzem o oxigênio no complexo IV, produzindo H₂O. Paralelamente ao fluxo de elétrons, prótons são bombeados da matriz

Fig. 4. Localização dos pontos de ação de inibidores de respiração (hexágonos vermelhos). **1.** Rotenona: inibe o Complexo I (NADH-quinona-oxiredutase); contudo, o complexo I de *S. cerevisiae* é insensível à da rotenona; **2.** Antimicina-A: atua inibindo o complexo III; **3.** DNP (2,4-dinitrofenol): desacopla o transporte de elétrons da síntese de ATP, sequestrando prótons do gradiente gerado na membrana interna mitocondrial; **4.** azoteto de sódio (NaN₃): inibe o complexo IV (citocromo oxidase); **5** Oligomicina : um antibiótico produzido por *Streptomyces* que inibe a ATP sintase, ligando-se à subunidade F₀. Setas amarelas indicam o fluxo de elétrons.

para o espaço intermembranar, sendo utilizados pela ATP sintase, que os repõe novamente no compartimento anterior.

Conhecem-se vários inibidores e seus pontos de atuação na cadeia respiratória, além de outros que atuam no gradiente de prótons da membrana interna mitocondrial e na ATP sintase. Por exemplo, o DNP (2,4-dinitrofenol) é capaz de desacoplar a fosforilação oxidativa, seqüestrando prótons do gradiente gerado na membrana interna mitocondrial. Outro inibidor, a oligomicina, é um antibiótico produzido por *Streptomyces* e inibe a ATP sintase, ligando-se à subunidade F_0 . A rotenona é capaz de inibir o Complexo I (NADH-quinona-oxiredutase); entretanto, o complexo I de *S. cerevisiae* não sofre o efeito da rotenona (Seo et al., 1998; Kitajima-Ihara e Yagi, 1998). Antimicina-A atua inibindo o complexo III, impedindo a oxidação do citocromo b, e o azoteto de sódio (NaN_3) inibe o complexo IV, onde se localiza a citocromo oxidase. Um esquema indicando os pontos de atuação dessas drogas nos complexos da cadeia de transporte de elétrons e na ATP sintase encontra-se na Figura 4. Empregando-se inibidores específicos da atividade mitocondrial, pode-se localizar o(s) componente(s) envolvido(s) na regulação da expressão gênica nuclear.

Entretanto, o DNP, que dissipa o gradiente de prótons da membrana interna da mitocôndria, associa-se também a quaisquer prótons disponíveis no interior da célula, por exemplo, os da membrana nuclear. Logo, a inibição do 2,4-dinitrofenol é inespecífica, o que comprometeria argumentos baseados em resultados obtidos com essa droga.

Assim, inibidores da atividade mitocondrial altamente específicos, que atuem no gradiente de prótons, são necessários para analisar o efeito dessa perturbação na

expressão dos genes nucleares de interesse. Uma abordagem que, aparentemente, preenche este requisito é utilizar o produto do gene mitocondrial de milho *T-urf13*, na presença de toxinas de fungos patogênicos do milho ou do inseticida metomil.

Alguns aspectos do gene T-urf13 de milho

O milho é uma planta capaz de auto-fecundação, e suas melhores espécies são obtidas através de híbridos; logo, há necessidade de um controle na sua reprodução. Um método para o controle da auto-fecundação do milho é a remoção do pendão da planta (técnica muito dispendiosa). Todavia, a esterilidade citoplasmática do milho macho (inabilidade de produzir pólen funcional causada por disfunção na mitocôndria), herdada maternalmente, permite que a remoção do pendão seja eliminada. Portanto, a descoberta de plantas sem pólen foi de muita importância para a genética do milho (Levings, 1996).

Entre 1969-1970 ocorreu uma epidemia nos Estados Unidos que dizimou 85% dos híbridos de milho norte-americanos. Este incidente impulsionou o estudo da macho-esterilidade da cepa de milho que contém o citoplasma Texas (T) [*cmsT* (cytoplasm male sterility-T)] a nível molecular.

As toxinas dos fungos *Bipolaris maydis* raça T (BmT) e *Phyllosticta maydis* (PmT) possuem estrutura similar e afetam, especificamente, as mitocôndrias da linhagem de milho *cmsT* (Huang et al., 1990). Essa sensibilidade está associada à macho-esterilidade, pois cepas com citoplasma normal, ou que contém outro tipo de citoplasma macho-estéril, não morrem (Levings, 1996) — há três tipos de esterilidade descritas para o milho: C, S e T, mas a última é a mais caracterizada (Glab et al., 1990).

Fig. 5. A- Estrutura do gene *T-urf13*. Sequências da região 3' do gene *rrn26* e de parte da sua porção codificadora, separados por uma sequência de DNA desconhecida (indicada por ?), codificam a proteína URF13. Através de rearranjos entre essas sequências e o promotor do gene *atp6*, formou-se o gene mitocondrial de milho *T-urf13*. **B-** O oligômero URF13, associado ao metomil, abre um poro na membrana mitocondrial interna. Atuando como um receptor para o inseticida carbamato metomil, o polipeptídeo URF13, que forma oligômeros na membrana mitocondrial interna, produz um poro e reduz o potencial de membrana $\Delta \Psi$, causando o desacomplamento da fosforilação oxidativa e o escape de moléculas pequenas como NAD^+ , CoA e íons Ca^{2+} .

A planta *cmsT* é estéril por causa da expressão do gene mitocondrial *T-urf13*, o qual codifica uma proteína de 115 aminoácidos (13 kD), que forma um oligômero na membrana mitocondrial interna (Levings, 1996; Rhoads et al., 1998). Quando as toxinas-T, produzidas pelos fungos patogênicos do milho, ligam-se à proteína URF13, os oligômeros URF13 abrem grandes poros hidrofílicos na membrana, resultando na dissipação do gradiente de prótons, desacoplamento da fosforilação oxidativa e vazamento inespecífico de moléculas pequenas como NAD^+ , CoA e íons Ca^{2+} (Glab et al., 1990). Metomil é um inseticida carbamato, análogo funcional das toxinas-T, que também se associa-se à proteína receptora URF13, causando a mesma disfunção mitocondrial, que leva à morte celular (Figura 5B) (Glab et al., 1990; Huang et al., 1990).

O gene *T-urf13* originou-se de rearranjos entre 2 genes mitocondriais (*atp6* e *rrn26*) e um do cloroplasto (tRNA^{Arg}) de milho. Seu promotor é a região 5' da subunidade 6 da ATPase. Em seguida, há uma região que codifica 88 aminoácidos, proveniente da porção 3' flanqueadora do gene que codifica o rRNA 26S. Esta região está separada, por uma sequência desconhecida, que codifica 9 aminoácidos, seguida de parte da sequência codificadora do gene *rrn26*, que codifica 18 aminoácidos e fornece o terminador da proteína quimérica (Figura 5A). Embora sequências de *atp6* e *rrn26* estejam presentes no *T-urf13*, suas cópias funcionais e completas estão presentes no genoma mitocondrial do milho *cmsT*.

Em *E. coli*, levedura, insetos e no tabaco, transformados com o gene *T-urf13*, a proteína URF13 conferiu sensibilidade às toxinas BmT, PmT e ao inseticida metomil (Dewey et al., 1988; Chaumont et al., 1995; Huang et al., 1990; Glab et al., 1990;

Korth e Levings, 1993). Em particular, as toxinas-T e o metomil não apresentaram toxicidade para as leveduras não transformadas com o T-*urf13*, enquanto que a expressão heteróloga do mesmo gene produz efeitos que arremedam os observados no milho (Huang et al., 1990; Glab et al., 1990). Um desses efeitos foi medido por citometria em fluxo, utilizando-se DiOC₆(3) (iodeto de 3,3'-dihexiloxacarbocianina) como sonda fluorescente para o potencial de membrana $\Delta\Psi$. Células de *S. cerevisiae*, transformadas com o vetor que expressa a proteína URF13, possuem fluorescência (que é proporcional ao $\Delta\Psi$) menor, na presença de metomil, comparada com a da cepa controle (Glab et al., 1993). A intensidade de fluorescência da cepa transformante, na presença de metomil, aproxima-se do valor obtido para células normais tratadas com o forte agente desacoplador CCCP (3-clorofenilhidrazona carbamoilcianeto), indicando que a abertura do poro na membrana mitocondrial interna reduz o potencial de membrana $\Delta\Psi$ (Glab et al., 1993).

Assim, a proteína URF13, expressa em *S. cerevisiae*, torna a levedura sensível ao metomil de maneira específica, atuando apenas no gradiente de prótons da membrana mitocondrial interna. Pode-se medir a alteração do potencial $\Delta\Psi$ por citometria em fluxo, acompanhando-se, dessa forma, o progresso da disfunção mitocondrial. Finalmente, empregando-se essas ferramentas, é possível verificar se a expressão de um gene nuclear é dependente do gradiente eletroquímico da mitocôndria.

Objetivos

O principal objetivo do presente estudo é verificar se a indução transcricional do gene *GAL1* de *S. cerevisiae* é controlada pela atividade mitocondrial. Utilizaram-se três abordagens diferentes para verificar essa hipótese:

1. células petite ρ^- (com deleção parcial no mtDNA) e $\Delta cox10$ (com mutação em gene nuclear que codifica uma proteína mitocondrial), deficientes na função respiratória e incapazes de crescer em substratos não fermentáveis como etanol e glicerol;
2. inibidores de respiração como antimicina-A, NaN_3 e rotenona, que atuam em complexos específicos da cadeia respiratória, oligomicina, que inibe a ATP sintase e DNP, capaz de desacoplar da fosforilação oxidativa;
3. expressão da proteína de milho URF13, que abre poro na membrana mitocondrial interna, quando se liga ao inseticida carbamato metomil, desacoplando a fosforilação oxidativa e dissipando o potencial transmembranar $\Delta\Psi$.

Empregando-se o vetor pGAL1-GUS, uma construção heteróloga, que contém o promotor *GAL1* controlando o gene bacteriano *gusA* (que codifica a β -glicoronidase), verificou-se se o controle negativo da indução de *GAL1*, na presença de NaN_3 e antimicina-A, ocorre a nível transcricional. Finalmente, analisou-se o envolvimento do repressor Mig1p (que atua diretamente no promotor de *GAL1*) no mecanismo que modula a transcrição dependente da atividade da mitocôndria, utilizando-se a linhagem $\Delta mig1$, cujo gene *MIG1* foi rompido.

Resultados

Diferenças entre cinéticas de indução da expressão de GAL1 por galactose

Em *S. cerevisiae*, estrutura e número de mitocôndrias alteram em função das condições nutricionais. Células crescidas em glicerol apresentam 8 ± 3 organelas ativas, com alta capacidade de respiração, morfologia alongada e presença de cristas proeminentes. Leveduras crescidas em glicose apresentam organelas com estrutura dramaticamente modificada: possuem 2 ± 1 mitocôndrias cuja morfologia é sinuosa, ou de pequenas esferas e com poucas cristas (Stevens, 1981).

As diferenças de estrutura mitocondrial, que se alteram em função das condições de cultura, podem ser utilizadas para verificar se a morfologia da organela está relacionada com a indução de um gene nuclear.

O gene nuclear *GAL1* codifica a enzima (galactoquinase) que catalisa o primeiro passo do catabolismo de galactose em *S. cerevisiae* (Melcher, 1997). Na presença de galactose a transcrição de *GAL1* é induzida 1000 vezes. A fim de verificar se há diferenças na indução de *GAL1*, dependente das condições nutricionais, cresceram-se células da cepa W303-1A em meio contendo glicose (concentração final 2%) ou glicerol (concentração final 5%). Removeu-se o meio de cultura e ressuspenderam-se as células em YPGal, coletando-se amostras para a análise da expressão da galactoquinase.

Dependendo da fonte de carbono em que as leveduras crescem, há diferenças entre as cinéticas de indução. Células crescidas em glicerol induzem a transcrição de *GAL1* rapidamente, 20 min após adição de galactose (Figura 6A), enquanto que

A **B**

Fig. 6. Cinética de indução de *GAL1*, após pré-cultura em glicose ou glicerol. Cresceram as leveduras da cepa W303-1A selvagem em YPGly ou YPD, conforme descrito no Material e Métodos. Lavaram-se as células e ressuspenderam-se em meio YPGal, coletando-se alíquotas das culturas nos tempos indicados, para a extração do RNA total. Realizaram-se Northern Blots (**Painel A**) que foram hibridizados com sondas de DNA dos genes *GAL1* (galactokinase) e *ACT1* (actina), marcadas com [α - 32 P] dCTP. Aplicaram-se em cada canaleta 10 μ g de RNA total. **Painel B:** normalização dos dados obtidos na cinética de A.

células, cuja pré-cultura ocorreu na presença de glicose, atingem o patamar de indução após 3 h de cultivo em YPGal (Figuras 6A e 6B). Em seguida, os níveis dos mRNAs de *GAL1* estabilizam-se. A transcrição do gene controle ACT1 (actina) permaneceu inalterada no intervalo de tempo observado. Resultados similares foram obtidos por Johnston et al. (1994), entretanto, medindo-se a expressão da fusão GAL1-LacZ.

A atividade da mitocôndria é mínima quando as células crescem na presença de glicose, alterando, inclusive, a morfologia da organela (Stevens, 1981; Ulery et al., 1994). Logo, os resultados da cinética de indução de *GAL1*, após pré-cultura em glicose ou glicerol, sugerem que a atividade mitocondrial seja um componente importante do mecanismo de indução.

Cinética de repressão por glicose e sua relação com a atividade mitocondrial

A repressão por glicose é um mecanismo geral que permite a levedura optar pela fonte de carbono de metabolismo mais simples. O gene *GAL1* sofre repressão por glicose, mesmo na presença de galactose, e as bases moleculares deste controle estão bem caracterizadas. A glicose atua reduzindo o número de transportadores de galactose, codificados pelo gene *GAL2*, através de proteólise, reprime a transcrição de *GAL3*, que codifica o indutor transcricional do sistema, e dispara o sinal que permite a repressão direta no promotor de *GAL1*, através de Mig1p, que também reprime a transcrição do ativador codificado por *GAL4* (Nehlin et al., 1991; Gancedo, 1998).

A fim de verificar se a repressão transcricional de *GAL1* ocorre com simultânea diminuição da atividade mitocondrial, realizou-se uma cinética de repressão da expressão da galactoquinase e mediu-se o potencial de membrana mitocondrial $\Delta\Psi$.

Células da cepa W303-1A, crescidas em glicerol, uma fonte de carbono que não reprime a atividade das mitocôndrias, induziram o gene *GAL1*, após lavagens e crescimento em YPGal. Adicionou-se glicose (final 2 %) e coletaram-se alíquotas para a cinética de repressão.

A repressão de *GAL1* por glicose é rapidamente estabelecida, atingindo o seu nível máximo 30 min após a adição do carboidrato (Figura 7A). Os resultados confirmam os dados de Johnston et al. (1994), para o mecanismo de repressão por glicose mediado pelo URS (upstream repressing sequence) do promotor *GAL1*. A expressão do controle interno, actina, não sofre o efeito da repressão no intervalo de tempo observado.

Mediu-se o potencial de membrana mitocondrial, empregando-se citometria em fluxo e o fluorocromo catiônico lipofílico rodamina 123, que é sequestrado pela mitocôndria ativa e acumula na organela em proporção ao $\Delta\Psi$ (Skowroneck et al., 1990).

Leveduras selvagens ρ^+ , crescidas em glicerol, possuem um número elevado de mitocôndrias completamente ativas (Stevens, 1981). Essas células apresentam valores altos de fluorescência, quando coradas com rodamina 123 (Figura 7B, histograma vermelho). Após adição de NaN_3 , um inibidor do complexo IV da cadeia de transporte de elétrons (Figura 5), observa-se uma redução significativa da fluorescência (Figura 7B, histograma preto), o que indica baixa atividade mitocondrial na presença da droga. Adicionando-se glicose às células crescidas em glicerol produz-se resultado similar ao obtido com o inibidor de respiração (figura 7B, histograma verde).

A

0 5 10 15 20 30 Tempo (min)

B

Fig. 7. Cinética de repressão de *GAL1* e simultânea diminuição da atividade mitocondrial. Cresceram as leveduras da cepa W303-1A selvagem em YPGly, conforme descrito no Material e Métodos. Lavaram-se as células e ressuspenderam-se em YPGal. Após 1 h de indução, adicionou-se glicose, concentração final 2 %. Coletaram-se alíquotas das culturas nos tempos indicados para a extração do RNA total. Realizaram-se Northern Blots (**Painel A**) que foram hibridizados com sondas de DNA dos genes *GAL1* (galactosquinase) e *ACT1* (actina), marcadas com [α - 32 P] dCTP. Aplicaram-se em cada canaleta 10 μ g de RNA total. **Painel B:** Análise da atividade mitocondrial por citometria em fluxo empregando o corante rodamina 123 (concentração final 10 μ g/mL). Histogramas: **vermelho**: células crescidas em glicerol; **preto**: células na presença de NaN₃ (65 μ g/mL); **verde**: células na presença de glicose (final 2%). Os números indicados correspondem aos valores médios das fluorescências.

A redução do potencial de membrana $\Delta\Psi$, na presença de glicose, sugere que o carboidrato reprime a atividade da mitocôndria. Assim, a repressão de *GAL1* ocorre com simultânea diminuição da atividade da organela, indicando que ambos os fenômenos podem estar acoplados, senão, compartilham dos mesmos mecanismos reguladores.

Indução de GAL1 em linhagens petite

A biossíntese das mitocôndrias em *S. cerevisiae* é produto da interação complexa entre os genomas nuclear e mitocondrial. Separam-se as contribuições desses genomas utilizando-se linhagens *petite*: mutantes com deficiência na função respiratória, incapazes de crescer em substratos não fermentáveis como etanol e glicerol (Tzagoloff, 1982).

Cepas ρ^- são chamadas *petites* mitocondriais, pois possuem deleção parcial do genoma da organela, enquanto que cepas *pet* são mutantes cuja deleção de um gene nuclear, que codifica uma proteína mitocondrial, causa disfunção na atividade respiratória (Tzagoloff, 1982). Um exemplo de mutante *pet* é a cepa W303-1A Δcox10 , a qual não possui a farnesil transferase requerida para a biossíntese da heme A do citocromo c oxidase (Tzagoloff et al, 1983; Poyton e McEwen, 1996).

Os mutantes respiratório-deficientes ρ^- e Δcox10 , portanto, são úteis para se estudar o efeito de deleções nos genomas nucleares e mitocondriais sobre a indução de *GAL1*, que, por hipótese, depende da função mitocondrial.

Cresceram-se células da cepa W303-1A selvagem e *petites* ρ^- e Δcox10 , isogênicas, na presença de glicose. Lavaram-se as leveduras e ressuspenderam-se em

YPGal, analisando-se a transcrição de *GAL1* nas amostras coletadas após 3 e 6 h de crescimento em galactose.

Na cepa selvagem, o gene *GAL1* apresenta-se induzido, 3 h após adição de galactose (Figura 8), e os mRNAs estão também presentes depois de 6 h de indução. Nas cepas *petite* ρ^- e Δcox10 não se observa indução de *GAL1*, mesmo após 6 h de cultivo em galactose 2 %. A transcrição do gene actina não foi afetada nas três linhagens utilizadas.

Nenhuma das cepas *petite* induziu *GAL1* na presença de galactose, no intervalo de tempo observado. Como ambas são respiratório-deficientes, sugere-se que a função mitocondrial é necessária para a rápida indução transcricional da galactoquinase. Contudo, o crescimento de cepas *petites* em fontes de carbono não-fermentáveis como galactose, glicerol ou etanol, pode causar uma diminuição do número de células viáveis, comprometendo o resultado obtido na Figura 8.

Realizou-se o ensaio de viabilidade das cepas isogênicas W303-1A selvagem e *petites* ρ^- e Δcox10 , crescendo-as em glicose até a fase mid-log. Lavaram-se as células e ressuspenderam-se em YPGal, incubando-se por 6h. Plaqueram-se, aproximadamente, 100 células em meio sólido YPD e contaram-se as colônias após 3 dias de incubação a 30 °C (Figura 9). Na cepa selvagem não houve comprometimento com a viabilidade, quando as células cresceram em YPGal. As células *petite* ρ^- e Δcox10 apresentaram formação de colônias com eficiência aproximada de 70 a 80 %.

Assim, como o gene *GAL1* sofre indução de 1000 vezes na presença de galactose e a viabilidade das células *petite* é suficientemente alta, após 6 h de cultivo

Fig. 8. Indução de *GAL1* em linhagens petite. Cresceram as células em YPD, conforme descrito no Material e Métodos. Lavaram-se as células e ressuspenderam-se em YPGal, coletando-se alíquotas das culturas nos tempos indicados, para a extração do RNA total. Realizaram-se Northern Blots que foram hibridizados com sondas de DNA dos genes *GAL1* (galactokinase) e *ACT1* (actina), marcadas com [α - 32 P] dCTP. Aplicaram-se em cada canaleta 10 μ g de RNA total. As linhagens ρ^- e $\Delta cox10$ são, respectivamente, petite citoplasmático e nuclear, isogênicos, da cepa selvagem W303-1A.

Fig. 9. Ensaio de viabilidade para células W303-1A selvagem e petites, isogênicas, ρ^- e $\Delta cox10$. Cresceram-se as leveduras em YPD até $OD_{600} = 1$. Lavaram-se as células e, em seguida, cresceram-se YPGal, coletando-se amostras nos tempos indicados. Estabeleceu-se a concentração das células em 10^3 células/mL, utilizando-se um hemocítômetro, e plaquearam-se 100 μ L em YPD. Incubaram-se as placas por 3 dias a 30 °C e contaram-se as colônias obtidas. Os resultados apresentados são percentuais do número de colônias da respectiva cepa em $t = 0$ h.

na presença do carboidrato, esperava-se que houvesse indução da galactoquinase. Os dados apresentados, portanto, sugerem que a perda da indução de *GAL1* é consequência da deficiência respiratória dos mutantes *petite*.

Uma abordagem empregando inibidores de respiração, que arremedam os efeitos observados nas linhagens ρ^- e Δcox10 , permite estender as conclusões desses resultados e localizar as atividades mitocondriais envolvidas na indução dos mRNAs de *GAL1*.

Efeito de inibidores de respiração sobre a indução de GAL1

Na membrana mitocondrial interna encontram-se a cadeia de transporte de elétrons e a ATP sintase (Voet e Voet, 1995); complexos de proteínas cujas reações acopladas permitem a síntese de ATP (Figura 5).

Conhecem-se vários inibidores de respiração que atuam em complexos específicos da cadeia respiratória, no gradiente de prótons da membrana e na ATP sintase. Esses inibidores possibilitam investigar qual atividade mitocondrial, envolvida na respiração, relaciona-se com a indução de *GAL1*.

Cresceram-se células da cepa W303-1A selvagem em glicerol (garantindo-se um número elevado de mitocôndrias ativas) e incubaram-se as leveduras na presença de inibidores de respiração. Então, induziu-se *GAL1* adicionando-se galactose (final 2 %), analisando-se a expressão por “northern blots” (Figura 10).

Incubando-se as células previamente por 30 min, na presença de antimicina-A, inibidor do complexo III, que impede a oxidação do citocromo b, observa-se que o mRNA de *GAL1* não é mais transcrito (Figura 10). Incubações em tempos maiores

apresentam o mesmo efeito. Isso sugere que a atividade do complexo III é necessária para a indução.

Azoteto de sódio (NaN_3) é uma droga que atua no complexo IV, inibindo o citocromo oxidase. A transcrição de *GALI* não é induzida em células tratadas com NaN_3 por 30 min, indicando que o complexo IV possui um papel importante na indução de *GALI* (Figura 10). Prolongando-se o tempo de incubação com o inibidor, obteve-se o mesmo resultado.

Outras drogas como a rotenona, capaz de inibir o complexo I (NADH-quinona-oxiredutase), a oligomicina, um antibiótico produzido por *Streptomyces*, que inibe a ATP sintase, ligando-se à subunidade F_0 , e o 2,4-dinitrofenol (DNP), que desacopla a fosforilação oxidativa, seqüestrando prótons do gradiente gerado na membrana mitocondrial interna, não inibiram a indução de *GALI*, mesmo após 2 h de incubação (Figura 10). Entretanto, esperava-se o resultado obtido com a rotenona, porque o complexo I de *S. cerevisiae* não sofre o efeito dessa droga (Seo et al., 1998; Kitajima-Ihara e Yagi, 1998).

Logo, apenas a antimicina-A e o NaN_3 inibem a indução da transcrição de *GALI*, sugerindo que os complexos III e IV possuem atividade essencial para a indução. A expressão do gene controle actina sofreu uma leve redução na presença de antimicina-A e NaN_3 , porém, manteve-se, praticamente, inalterada, na presença de oligomicina e rotenona.

Em um segundo experimento, realizou-se um ensaio de viabilidade celular, para as células crescidas em antimicina-A e NaN_3 , nas mesmas condições do experimento anterior. Plaquearam-se, aproximadamente, 100 células em meio sólido YPD,

Fig. 10

Fig. 10. Continuação. Efeito de inibidores de respiração sobre a indução de *GAL1*. Cresceram as células em YPGly, conforme descrito no Material e Métodos. Adicionaram-se os inibidores nas seguintes concentrações finais: antimicina-A 10 µg/mL, NaN₃ 65 µg/mL, rotenona 100 µg/mL, oligomicina 2,5 µg/mL e 2,4-dinitrofenol (DNP) 1mM, incubando-se as células nos tempos indicados. Em seguida, induziu-se *GAL1* com galactose, concentração final 2%, e coletaram-se alíquotas das culturas após 1h de indução, para a extração do RNA total. Realizaram-se Northern Blots que foram hibridizados com sondas de DNA dos genes *GAL1* (galactoquinase) e *ACT1* (actina), marcadas com [α -³²P] dCTP. Aplicaram-se em cada canaleta 10 µg de RNA total.

Fig. 11. Ensaio de viabilidade para células crescidas em NaN₃ (65 µg/mL) e Antimicina-A (10 µg/mL). Cresceram-se as leveduras W303-1A selvagem em YPGly até OD₆₀₀ = 1. Adicionaram-se as drogas, incubando-se pelos tempos indicados. Estabeleceu-se a concentração das células em 10³ células/mL, utilizando-se um hemocitômetro, e plaquearam-se 100 µL em YPD. Incubaram-se as placas por 3 dias e contaram-se as colônias obtidas. Os resultados apresentados são percentuais do número de colônias que cresceram na ausência das drogas.

contando-se as colônias que surgiram após 3 dias de incubação a 30 °C (Figura 11). A viabilidade das células tratadas com antimicina-A por 30 min é, aproximadamente, igual à das células crescidas na ausência da droga. Incubação por tempos maiores diminuem violentamente a eficiência de formação de colônias, na presença desse inibidor (Figura 11, painel superior).

Células crescidas por 30 min em meio de cultura contendo NaN_3 sofrem redução de, aproximadamente, 20 % em sua viabilidade (Figura 11, painel inferior). Diminuiu-se a formação de colônias progressivamente, incubando-se as leveduras por tempos maiores, chegando a menos de 40 %, após 120 min na presença da droga.

Logo, adicionando-se antimicina-A ou NaN_3 às células, incubando-se por apenas 30 min, não se observa uma redução forte da eficiência de formação de colônias. Como *GAL1* induz 1000 vezes na presença de galactose, 80 % de células viáveis seriam suficientes para se observar os transcritos. Mas, após 30 min na presença de galactose, não se encontram os mRNAs de *GAL1*. Sugere-se, portanto, que a indução da galactoquinase requer a atividade dos complexos III e IV da membrana interna mitocondrial. Resultados similares foram obtidos reprimindo-se a expressão do gene *cbh1* (que codifica a celobiohidrolase I do sistema celulolítico de *T. reesei*) com as drogas KCN e DNP (Abrahao-Neto et al., 1995).

Associação de metomil ao oligômero URF13 diminui a atividade mitocondrial

A proteína URF13 forma um oligômero na membrana mitocondrial interna da cepa de milho cmsT (planta macho-estéril, incapaz de produzir pólen fértil) (Levings, 1996). Esse oligômero torna a planta sensível às toxinas dos fungos *Bipolaris maydis* (BmT), *Phyllosticta maydis* (PmT) e ao inseticida carbamato metomil. Quando as

toxinas-T ou o metomil se ligam ao oligômero, abre-se um poro na membrana mitocondrial interna que desacopla a fosforilação oxidativa, dissipa o potencial de membrana $\Delta\Psi$ e permite o escape de moléculas pequenas como NAD^+ , CoA e íons Ca^{2+} (Figura 5).

A expressão da proteína URF13 em *S. cerevisiae* produz efeitos similares ao observados no milho, isto é, confere sensibilidade ao metomil e às toxinas-T. Para expressar URF13 em levedura Glab et al. (1990) realizaram três modificações necessárias à tradução, endereçamento e síntese no sistema heterólogo: (i) o código genético mitocondrial de plantas superiores é diferente do utilizado no genoma nuclear de *S. cerevisiae*. O códon CGG, que em levedura é traduzido para arginina, no milho codifica o triptofano. Logo, fez-se uma mutagênese sítio dirigida na sequência do gene *T-urf13*, trocando-se o CGG da posição 87 por TGG. Assim, o mesmo aminoácido estará presente na proteína. (ii) Para endereçar a proteína URF13 à mitocôndria, colocou-se um peptídeo sinal da subunidade 9 da ATPase de *Neurospora crassa* (Banroques et al., 1986). (iii) Finalmente, adicionou-se um promotor constitutivo e um terminador de um gene de levedura: as extremidades 5' e 3' do gene da fosfoglicerato quiinase, flanqueando a fusão do gene *T-urf13* com a sequência endereçadora.

A expressão do gene na levedura, neste sistema eucariótico heterólogo, resultou em um polipeptídeo que foi translocado para a membrana interna da mitocôndria (Glab et al., 1990).

Verificou-se o efeito da expressão do gene *T-urf13* sobre a atividade mitocondrial, transformando-se leveduras da cepa W303-1A com vetores que endereçavam a proteína para a mitocôndria ou para o citoplasma.

A descrição dos plasmídios utilizados encontra-se na Figura 12. O vetor pC1 é um controle, pois sem a sequência endereçadora a proteína URF13 permanece no citoplasma (Figura 12B), enquanto o plasmídio pTW possui o gene quimérico, contendo T-*urf13* fusionado ao peptídeo sinal da subunidade 9 da ATPase de *N. crassa* e, portanto, expressa a proteína que é inserida na membrana mitocondrial interna (Figura 12A).

Utilizando-se o corante rodamina 123 mediu-se, por citometria em fluxo, o potencial de membrana mitocondrial, e observou-se o efeito da adição de metomil às células transformadas com o vetor pTW. Cresceram-se as leveduras em YPGly até $OD_{600}=1$. Adicionaram-se metomil (concentração final 12 mM) ou NaN_3 (final 65 $\mu\text{g/mL}$). Incubaram-se por 30 min e analisaram-se as células por citometria em fluxo no aparelho FACStar Plus (Becton-Dickinson).

Os transformantes obtidos com o vetor pTW, na ausência de metomil, fluorescem com intensidade alta (Figura 13B, histograma vermelho). Adicionando-se o inibidor de respiração NaN_3 , ocorre despolarização da membrana e diminuição significativa da fluorescência (Figura 13B, histograma preto). Adição de metomil às células reduz o potencial de membrana $\Delta\Psi$, entretanto, a população de leveduras torna-se heterogênea. Utilizando-se o corante DiOC₆(3) (iodeto de 3,3'-

Fig. 12. Localização celular das proteínas URF13 expressas pelos vetores pC1 e pTW. **A** - O vetor pTW contém o gene quimérico completo, contendo o gene T-*urf13*, o qual possui um códon TGG na posição 87, ao invés de um CGG como no gene original de milho, fusionado à sequência endereçadora mitocondrial da subunidade 9 da ATPase de *N. crassa* (PS - peptídeo sinal). Assim, a proteína expressa por pTW é direcionada e inserida na membrana mitocondrial interna. **B** - O vetor pC1 expressa a proteína URF13 sem a sequência endereçadora. Logo, a proteína permanece no citoplasma. As regiões flanqueadoras das sequências que codificam para as proteínas URF13 e PS-URF13 são o promotor de alto nível de expressão constitutiva (5' PGK) e o terminador (3' PGK) da fosfoglicerato quinase de levedura. Todos os plasmídios carregam a informação necessária para replicação autônoma e seleção em *E. coli* e em *S. cerevisiae* (*ori Amp^r* e 2μ , *LEU2*, respectivamente).

A**Glicerol** **NaN₃** **Metomil** **B** **C**

Fig. 13. Efeito do metomil na atividade mitocondrial de células expressando a proteína URF13. Cresceram-se células da cepa W303-1A, transformadas com os plasmídeos pTW e pC1, em SLeu-Gly, adicionando-se metomil e incubando-se por 30 min. Em seguida, coraram-se as células com rodamina 123 (10 μ g/ml final). Lavou-se o excesso do corante e analisaram-se as células por citometria em fluxo, como descrito no Material e Métodos. **Painéis A e B:** Atividade mitocondrial da cepa transformantes pTW, na presença de metomil. Histogramas: **vermelho:** células na ausência de metomil; **preto:** células na presença de NaN₃ (65 μ g/mL); **verde:** células na presença de metomil (final 12 mM). Os números indicados correspondem aos valores médios das fluorecências. **Painel C:** Efeito da concentração de metomil sobre a atividade mitocondrial das cepas transformadas com pC1 e C1 pTW.

dihexiloxacarbocianina), Glab et al. (1993) obtiveram observações similares, inclusive, heterogeneidade da população de esferoplastos transformados com o vetor pTW.

A heterogeneidade mitocondrial causa incerteza nas medidas com rodamina 123, pois isso indica que algumas moléculas do fluoróforo estão ligadas de maneira independente da energia celular (Lopez-Mediavilla et al., 1989). Entretanto, nessas situações, é possível obter observações qualitativas, medindo-se outro parâmetro celular proporcional à fluorescência. Uma medida muito utilizada em citometria em fluxo é o espalhamento frontal, que é proporcional ao tamanho, forma e homogeneidade óptica das células.

Obtiveram-se os gráficos de FSC (Forward Scatter – espalhamento frontal) versus FL1 (fluorescência da partícula) para culturas em glicerol, metomil e NaN_3 , de células W303-1A, transformadas com o vetor pTW (Figura 13A). Os gráficos correspondem exatamente às populações analisadas na Figura 13B. Dividiram-se os gráficos em quadrantes de mesmo tamanho, anotando-se o percentual de células que possuem fluorescência alta (ALTO $\Delta\Psi$) ou baixa (BAIXO $\Delta\Psi$).

Células crescidas em glicerol apresentam 85,17 % de sua população altamente polarizada, enquanto que 91,19 % das leveduras, na presença de NaN_3 , sofrem redução do potencial de membrana. As células transformadas com o vetor TW, na presença de metomil, apresentam heterogeneidade de 62,30 % com potencial transmembranar alto e 37, 43 % com baixo $\Delta\Psi$. Os dados obtidos indicam que os poros formados pelo metomil, associado ao oligômero URF13, despolarizam a membrana das mitocôndrias, reduzindo o $\Delta\Psi$ da organela. Cerca de 40 % das células são sensíveis ao carbamato, porém, ocorre heterogeneidade na distribuição da rodamina 123.

Num terceiro experimento, titulou-se a concentração de metomil e mediu-se a fluorescência da rodamina 123, em cepas transformadas com os vetores pC1 e pTW, obtendo-se as curvas da Figura 13C. A fluorescência da linhagem transformada com o plasmídeo pC1 aumenta e estabiliza-se, enquanto que o transformante pTW sofre despolarização das membranas mitocondriais, à medida que a concentração de metomil cresce. Analisando-se a curva da cepa transformada com o vetor pTW, observa-se que não há mais decréscimo de fluorescência, para concentrações de metomil acima de 12 mM. Logo, empregou-se essa concentração para os próximos experimentos.

O Oligômero URF13 associado ao metomil afeta a indução de GAL1

Estabelecendo-se as condições em que a proteína URF13, expressa em levedura, causa disfunção mitocondrial, na presença de metomil, investigou-se o efeito dessa perturbação sobre a indução de *GAL1*, após pré-cultura em glicose ou glicerol.

Transformaram-se células da cepa W303-1A com os vetores pC1 e pTW, crescendo-as em glicose. Lavaram-se as leveduras, ressuspendendo-as no mesmo meio de cultura sem fonte de carbono e submetendo-as a 1 h de incubação na presença de metomil (final 12 mM). Em seguida, adicionou-se galactose (final 2%) e coletaram-se amostras para a análise dos níveis dos mRNAs de *GAL1*.

Nas leveduras transformadas com pC1 ocorre desrepressão completa de *GAL1*, 3,5 h após a remoção da glicose. A proteína URF13 encontra-se no citoplasma e as funções mitocondriais são restauradas (Figura 14A, painel superior). Nas células transformadas com o vetor pTW, o metomil liga-se ao oligômero URF13 e abre poros nas mitocôndrias. Isso causa uma disfunção mitocondrial que impede a desrepressão

seguida de indução completa de *GAL1* e, provavelmente, mantém as mitocôndrias no estado reprimido (Figura 14A, painel inferior).

Removendo-se a glicose e incubando-se ambas as cepas em YPGal, na presença de metomil, observa-se que, 4,5 h depois, o nível da transcrição da cepa transformada com o plasmídio pTW é dez vezes menor que o nível dos transcritos de *GAL1* nas leveduras transformadas com o vetor pC1 (Figura 14B).

Esses resultados indicam fortemente que as mitocôndrias recuperam-se após a remoção da glicose do meio de cultura, conforme nossa hipótese e evidências da literatura (Stevens, 1981) e que essa recuperação é necessária para a indução de *GAL1*, na presença de galactose. Além disso, a disfunção causada pelo poro formado na membrana interna mitocondrial reduz significativamente a transcrição da galactoquinase.

Em células crescidas em glicerol, onde as mitocôndrias encontram-se ativas e em número abundante, os resultados são semelhantes. Os transformantes obtidos com o plasmídio pC1, na presença de metomil, induzem *GAL1* após 30 min de crescimento em galactose (Figura 15A, painel superior). Não ocorre redução significativa dos níveis de indução de *GAL1*, o que sugere que o metomil não altera a expressão e mostra que a proteína URF13 citoplasmática não tem nenhum efeito sobre a transcrição.

Nas leveduras transformadas com pTW, cultivadas em glicerol, a expressão de *GAL1* sofre o efeito da disfunção mitocondrial causada pelo metomil e o oligômero URF13, pois não atinge os níveis transcripcionais observados nos transformantes pC1, crescidos nas mesmas condições (Figura 15A, painel inferior). Na figura 15B, observa-

se que a transcrição de *GAL1* é reduzida em até duas vezes na linhagem pTW, comparando-se com a linhagem pC1. Isso sugere que a proteína URF13 endereçada à mitocôndria, torna a levedura sensível ao metomil e reduz os níveis de indução de *GAL1*, em células crescidas em glicerol.

A expressão da proteína URF13, na presença de metomil, causa a morte da célula (Huang et al., 1990; Glab et al., 1990). Verificou-se, nos tempos analisados nos “northern blots” das figuras 14 e 15, se as células permaneciam viáveis após incubação com o carbamato.

Cresceram-se os transformantes pC1 e pTW em meio contendo glicerol e adicionou-se metomil (concentração final 12 mM). Após 2 e 4 h de cultura, diluíram-se as amostras para 10^3 células/mL, utilizando-se um hemocitômetro, e plaquearam-se, aproximadamente, 100 células em placas YPD, contando-se as colônias formadas após 3 dias de incubação a 30 °C.

A eficiência de formação de colônias para as células incubadas por 2 ou 4 h, na presença de metomil, é, aproximadamente, a mesma das leveduras crescidas na ausência da droga (Figura 16). Isso indica que a viabilidade celular não foi comprometida; resultado que dá suporte às cinéticas de transcrição das Figuras 14 e 15.

Fig. 14. Efeito da proteína URF13, na presença de metomil, sobre a indução de *GAL1*, após crescimento em glicose. Cresceram as células da cepa W303-1A, transformadas com os vetores pC1 ou pTW, em SDLeu conforme descrito no Material e Métodos. Lavaram-se as células e adicionou-se metomil (concentração final 12 mM), incubando-se por 1 h. Acrescentou-se galactose concentração final 2% e coletaram-se alíquotas das culturas nos tempos indicados para a extração do RNA total. Realizaram-se Northern Blots (**Painel A**) que foram hibridizados com sondas de DNA dos genes *GAL1* (galactoquinase) e *ACT1* (actina), marcadas com [α - 32 P] dCTP. Aplicaram-se em cada canaleta 10 μ g de RNA total. **Painel B:** normalização dos dados obtidos na cinética de A.

A **C1**

0 0,5 1 2 4

Tempo (h)

GAL1

ACT1

TW

0 0,5 1 2 4

Tempo (h)

GAL1

ACT1

Fig. 15

B

Fig. 15. Continuação. Efeito da proteína URF13, na presença de metomil, sobre a indução de *GALI*, após crescimento em glicerol. Cresceram as células da cepa W303-1A, transformadas com o vetores pC1 ou pTW, em SGly-Leu, conforme descrito no Material e Métodos. Lavaram-se as células e adicionou-se metomil (concentração final 12 mM), incubando-se por 1 h. Acrescentou-se galactose, concentração final 2%, e coletaram-se alíquotas das culturas nos tempos indicados para a extração do RNA total. Realizaram-se Northern Blots (**Painel A**) que foram hibridizados com sondas de DNA dos genes *GALI* (galactoquinase) e *ACT1* (actina), marcadas com $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP. Aplicaram-se em cada canaleta 10 μg de RNA total. **Painel B:** normalização dos dados obtidos na cinética de **A**.

Fig. 16. Ensaio de viabilidade para células W303-1A, transformadas com os vetores pC1 e pTW, crescidas na presença de metomil. Cresceram-se os transformantes em SLeu-Gly até $OD_{600} = 1$. Adicionou-se metomil (concentração final 12 mM), incubando-se pelos tempos indicados. Estabeleceu-se a concentração das células em 10^3 células/mL, utilizando-se um hemocitômetro, e plaquearam-se 100 μ L em YPD. Incubaram-se as placas por 3 dias e contaram-se as colônias obtidas. Os resultados apresentados são percentuais do número de colônias que cresceram, para a respectiva cepa, na ausência de metomil.

O conjunto dos dados apresentados até agora sugerem que a transcrição de *GAL1* depende da função mitocondrial. Três abordagens distintas, células *petite p⁻* e *Δcox10*, inibidores de respiração (antimicina-A e NaN_3) e abertura de poro na membrana mitocondrial interna, através do oligômero URF13, na presença de metomil, mostraram que a disfunção da organela compromete a indução da galactoquinase. Investigou-se, em seguida, se o controle da indução de *GAL1*, dependente da função mitocondrial, ocorre a nível transcricional.

Efeito de inibidores de respiração sobre o promotor de GAL1

A fim de investigar se o controle negativo da indução de *GAL1*, na presença de NaN_3 e antimicina-A, ocorre a nível transcricional, analisou-se a construção heteróloga que contém o promotor *GAL1* controlando o gene bacteriano *gusA* (que codifica a β -glicoronidase). Inseriu-se o fragmento de 2 kb do vetor pGUS1 (Marathe and McEwen, 1995), que contém a seqüência codificadora do gene *gusA*, no vetor pYES2 (veja descrição da construção no Material e Métodos). O plasmídio pGAL1-GUS obtido possui o promotor GAL1 fusionado à seqüência do gene *gusA*, seguida do terminador do gene *CYC1* de levedura.

Transformou-se a cepa W303-1A selvagem com o vetor pGAL1-GUS, crescendo-se em YPGly. Incubaram-se com os inibidores antimicina-A ou NaN_3 por 30 min, induzindo-se, em seguida com galactose (final 2%). Na ausência de galactose não ocorre indução (Figura 17, canaletas 1 e 5), enquanto que, após 1 h na presença do carboidrato, os níveis de mRNA de *GAL1* e do repórter *GUS* aumentam significativamente (Figura 17, canaletas 2 e 6). Tratando-se previamente as células com antimicina-A, não ocorre indução de *GAL1* tampouco de *GUS*, na presença de

galactose (Figura 17, canaletas 3 e 7). O inibidor do complexo IV, NaN_3 , também reprime a indução de *GALI* e a transcrição de *GUS* (Figura 17, canaletas 4 e 8). Esses resultados indicam que a regulação da indução do gene *GALI*, dependente da atividade mitocondrial, ocorre a nível transcricional, pois controla o promotor do gene.

Mediu-se a atividade mitocondrial das células, na presença dos inibidores antimicina-A e NaN_3 , por citometria em fluxo. Após crescimento em glicerol, a atividade mitocondrial das leveduras, medida através da fluorescência da rodamina 123, é alta (Figura 17B, histograma vermelho), indicando que as mitocôndrias das células desta cultura estão ativas. Na presença dos inibidores de respiração antimicina-A ou NaN_3 , a fluorescência sofre uma diminuição violenta (Figura 17B, histogramas preto e verde), sugerindo uma redução no potencial de membrana que leva à disfunção da organela. Logo, ambas as drogas são capazes de reduzir o potencial de membrana e causar disfunção na mitocôndria.

O conjunto de todos os dados apresentados sugere que a inibição da atividade mitocondrial por antimicina-A, que atua no complexo III, ou por azoteto de sódio, inibidor do complexo IV, impede a indução transcricional de *GALI*, na presença de galactose. Essa regulação negativa da expressão da galactoquinase ocorre a nível transcricional. Dados similares foram obtidos reprimindo-se o promotor do gene *cbh1*, que codifica a enzima majoritária do sistema celulolítico, de *T. reesei*, utilizando-se DNP (2,4-dinitrofenol) para inibir a atividade mitocondrial (Abrahão-Neto et al., 1995).

A

Fig. 17. Efeito de inibidores de respiração sobre o promotor *GAL1*. Cresceram as células da cepa W303-1A selvagem, transformadas com o vetor pGAL1-GUS, em Sura-Gly, conforme descrito no Material e Métodos. Adicionou-se Antimicina-A (10 µg/mL) ou NaN₃ (65 µg/mL), incubando-se por 30 min. Em seguida, induziu-se *GAL1* com galactose concentração final 2% e, após 1 h de indução, coletaram-se amostras para a extração do RNA total. Realizaram-se Northern Blots (**Painel A**) que foram hibridizados com sondas de DNA dos genes *GAL1* (galactosquinase), *ACT1* (actina) e do gene repórter *GUS* (glicoronidase), marcadas com [α -³²P] dCTP. Aplicaram-se em cada canaleta 10 µg de RNA total. **Painel B:** Análise da atividade mitocondrial por citometria em fluxo empregando o corante rodamina 123 (concentração final 10µg/mL). Histogramas: **vermelho**: células crescidas em glicerol; **preto**: células na presença de Antimicina-A (10 µg/mL); **verde**: células na presença de NaN₃ (65 µg/mL). Os números indicados correspondem aos valores médios das fluorescências.

O promotor *GALI* sofre repressão por glicose, mediada pela proteína “zinc finger” Mig1p. Como esse repressor participa da regulação a nível transcricional, resolveu-se investigar seu envolvimento na indução de *GALI*, dependente da atividade da mitocôndria.

Envolvimento do repressor Mig1p no controle da indução de GAL1 dependente da função mitocondrial

A glicose reprime a transcrição de vários genes de *S. cerevisiae*, através do mecanismo que ativa o repressor Mig1p, o qual recruta o complexo geral de repressão Tup1p-Ssn6p (Gancedo, 1998; Nehlin et al., 1991). A proteína codificada pelo gene *MIG1* atua diretamente nos promotores dos genes do sistema *GAL*, ligando-se a seqüências denominadas URS (upstream repressing sequence).

Estudou-se o envolvimento do repressor Mig1p, na expressão de *GALI*, dependente da atividade da mitocôndria, utilizando-se a linhagem W303-1A $\Delta mig1$ (cujo gene *MIG1* foi rompido — Nehlin et al., 1991), na qual não ocorre repressão por glicose. Células $\Delta mig1$ necessitam de galactose para a indução (Nehlin et al., 1991), isto é, o mecanismo estudado nesta tese não é afetado pela mutação. Cresceram-se em glicerol leveduras da cepa W303-1A $\Delta mig1$, adicionando-se galactose (concentração final 2 %). Na ausência de galactose não ocorre indução (Figura 18, canaleta 1), enquanto que, 1 h após a adição do carboidrato, os níveis de mRNA de *GALI* aumentam e o gene está completamente induzido (Figura 18, canaleta 2). Embora tratando-se previamente as células com antimicina-A, *GALI* induz na presença de galactose (Figura 18, canaleta 3). O inibidor do complexo IV, azoteto de sódio,

Fig. 18. Envolvimento do repressor Mig1p na regulação da indução de *GAL1* dependente da função mitocondrial. Cresceram as células da cepa W303-1A *mig1* em YPGly, conforme descrito no Material e Métodos. Adicionou-se antimicina-A (final 10 $\mu\text{g/mL}$) ou NaN₃ (final 65 $\mu\text{g/mL}$), incubando-se as células por 30 min. Após adição de inibidores, induziu-se *GAL1* com galactose (concentração final 2%) e coletaram-se alíquotas das culturas após 1h, para a extração do RNA total. Realizaram-se Northern Blots que foram hibridizados com sondas de DNA dos genes *GAL1* (galactoquinase) e *ACT1* (actina), marcadas com [α -³²P] dCTP. Aplicaram-se em cada canaleta 10 μg de RNA total.

continua reprimindo a indução de *GAL1*, mesmo na linhagem $\Delta mig1$ (Figura 18, canaleta 4).

Esses resultados sugerem que a proteína Mig1p está envolvida no controle da indução de *GAL1*, que requer a atividade do complexo III da mitocôndria (compare Figura 18, canaleta 3 com Figura 17, canaleta 3). Além disso, como o azoteto de sódio mantém a inibição de *GAL1* na cepa mutante, é possível que a droga atue por outro mecanismo, não mediado por Mig1p.

Ocorre redução da transcrição do gene controle actina, na presença dos inibidores de respiração, porém, aumentando-se a concentração de RNA total das canaletas 3 e 4, acredita-se que o efeito observado para a transcrição de *GAL1* seria similar.

Discussão

Em diversos organismos como a levedura *S. cerevisiae*, o fungo filamentoso *T. reesei* e grande variedade de células de mamífero, encontraram-se evidências de uma via de sinalização da mitocôndria para o núcleo (Poyton e McEwen, 1996; Abrahao-Neto et al., 1995; Pahl e Baeuerle, 1997).

A transcrição da flavohemoglobina de *S. cerevisiae*, codificada no gene *YHB1*, e da citrato sintase peroxissomal, produto de *CIT2*, aumenta em células petite ρ^0 e em células ρ^+ tratadas com antimicina-A (Zhao et al., 1996; Liao et al., 1991). No fungo de solo *T. Reesei*, a expressão do gene *cbh1*, que codifica a celobiohidrolase I, enzima majoritária do sistema celulolítico, é reprimida na presença dos inibidores de respiração KCN e DNP (Abrahao-Neto et al., 1995). E, em células de mamífero, a transcrição dos genes das respostas inflamatória e imune, ativada pelo fator de transcrição NF- κ B (Baeuerle e Henkel, 1994), é inibida em células ρ^0 e estimulada em células ρ^+ , tratadas com antimicina-A (Poyton e McEwen, 1996). O mecanismo pelo qual as células dos exemplos supracitados modulam a expressão gênica nuclear, em resposta ao estado fisiológico da mitocôndria, é denominado regulação retrógrada (Parikh et al., 1987; Poyton e McEwen, 1996).

Esses experimentos realizados em levedura, trichoderma e células de mamífero, estabeleceram um novo paradigma de estudo do papel das mitocôndrias dentro da célula. Baseando-se nesses trabalhos, estudou-se a provável comunicação entre mitocôndria e núcleo para o gene *GAL1* de *S. cerevisiae*, cuja regulação está bem caracterizada (Melcher, 1997).

A atividade mitocondrial é necessária para a indução de GAL1

Em células crescidas em glicerol, após adição de galactose, o gene nuclear *GAL1* é induzido 1000 vezes; porém, é fortemente reprimido na presença de glicose (Johnston et al., 1994). Células crescidas em glicerol apresentam maior número de mitocôndrias ativas, com alta capacidade respiratória, enquanto que leveduras crescidas em glicose apresentam menor número organelas, com baixa atividade mitocondrial (Stevens, 1981; Ulery et al., 1994, Ronne, 1995). Utilizaram-se as diferenças no estado fisiológico da mitocôndria, que se alteram em função das condições de cultura, para verificar se há diferenças entre as cinéticas de indução de *GAL1*, dependente da atividade da organela.

Após pré-cultura em glicerol, as leveduras induzem *GAL1* rapidamente, na presença de galactose ($t = 20$ min), enquanto que células, cuja pré-cultura ocorreu em meio contendo glicose, induzem a transcrição da galactoquinase depois de 3h de cultivo em YPGal (Figura 6). Esses resultados concordam com os obtidos por Johnston et al. (1994), que mediu a expressão da fusão *GAL1-LacZ*, onde o promotor *GAL1* controla o gene bacteriano que codifica a β -galactosidase. Nesse sistema, células que vieram de uma pré-cultura em glicerol, induzem completamente *LacZ* em 6 h, enquanto que leveduras, oriundas de pré-cultura em glicose, levam 10 h para atingir os mesmos níveis de expressão. Atribuiu-se o atraso na indução à quantidade insuficiente de indutor para inativar Gal80p e/ou Mig1p, que reprime o promotor do gene *GAL1* no elemento URS (Johnston et al. 1994).

As funções mitocondriais são reprimidas, quando as células crescem na presença de glicose, alterando, inclusive, a morfologia da organela (Stevens, 1981).

porém, assim que a glicose é exaurida do meio de cultura (diauxia), restabelece-se a produção das enzimas da mitocôndria, pois ocorre desrepressão dos genes que codificam as enzimas do ciclo do ácido cítrico e de outras envolvidas na respiração (Ronne, 1995; Ulery et al., 1994). Logo, em condições repressoras, sintetiza-se ATP com baixo rendimento, em relação ao crescimento oxidativo. Como o produto do gene *GAL3*, indutor transcricional do sistema *GAL*, requer galactose e ATP para remover Gal80p do domínio ativador de Gal4p (Zenke et al., 1996; Blank et al., 1997), sugere-se que o ATP requerido possa ser a ligação que o mecanismo de indução estabelece com a atividade mitocondrial.

Em células crescidas em glicerol, o gene *GAL1* sofre repressão por glicose, mesmo na presença de galactose. Verificou-se que a rápida repressão transcricional de *GAL1* ocorre em 30 min, com simultânea diminuição da atividade mitocondrial (Figura 7). O valor obtido confirma o trabalho de Johnston et al. (1994), para o mecanismo de repressão por glicose mediado pelo elemento URS (upstream repressing sequence) do promotor *GAL1*, no qual se liga o repressor Mig1p.

A despolarização da membrana mitocondrial, na presença de glicose, medida por citometria em fluxo, empregando-se o corante rodamina 123, mostra que o carboidrato reprime a atividade da mitocôndria. Esse resultado é similar ao obtido com outras cepas de levedura (Carraro et al., 1998). Como a repressão completa da transcrição de *GAL1* ocorre com simultânea diminuição do potencial de membrana, sugere-se que ambos os fenômenos podem estar acoplados, senão, compartilham dos mesmos mecanismos reguladores.

A glicose reprime a transcrição de *GAL1* através de múltiplos mecanismos: proteólise de Gal2p, repressão de *GAL3* e ativação do repressor Mig1p, que atua nos promotores de *GAL1* e *GAL4*, que codifica o ativador do sistema *GAL* (Johnston et al., 1994). Assim, é possível que a repressão da atividade mitocondrial também colabore para garantir a forte repressão da galactoquinase.

A fim de demonstrar a provável comunicação entre mitocôndria e núcleo, existente na regulação da indução de *GAL1* por galactose, utilizaram-se as cepas *petite* isogênicas ρ^- e $\Delta cox10$; respectivamente, que apresenta deleção parcial do DNA mitocondrial e mutação no gene nuclear que codifica a farnesil transferase, requerida para a biossíntese da heme A do citocromo c oxidase (Tzagoloff et al, 1983; Poyton e McEwen, 1996). Essas linhagens, deficientes na função respiratória, são incapazes de crescer em substratos não fermentáveis como etanol e glicerol (Tzagoloff, 1982).

Ambas as cepas *petite* são incapazes de induzir *GAL1*, após 6 h de cultivo na presença de galactose (Figura 8). Embora cultivadas em fonte de carbono não-fermentável, sua viabilidade celular de 70 a 80 % (Figura 9) permite afirmar que a perda de indução da galactoquinase, que atinge níveis de 1000 vezes na presença de galactose, é consequência da deficiência respiratória.

Mutantes *gal3* que também apresentam deficiência na função respiratória (ρ^-), ou nos genes do metabolismo normal de galactose, são incapazes de induzir o sistema *GAL* (Bhat e Hopper, 1991). Entretanto, a expressão constitutiva de *GAL1* supera os defeitos na respiração ou na via de Leloir, permitindo a transcrição dos genes do metabolismo de galactose. Isso indica que é possível passar os requerimentos de galactose e ATP para a indução (Zenke et al., 1996; Blank et al., 1997) e, portanto, há

um caminho para a indução de *GAL1*, independente da atividade mitocondrial. Todavia, a indução da galactoquinase nas cepas *petite* é extremamente lenta, refletindo o estado metabólico da célula e a necessidade da atividade da organela para a expressão.

Os genes *CIT2* e *YHB1*, que codificam, respectivamente, a isoforma peroxissomal da citrato sintase e a flavohemoglobina de *S. cerevisiae* sofrem aumento em sua transcrição em células ρ^0 (Liao et al., 1991; Zhao et al., 1996). Entretanto, a modulação de *GAL1* é negativa nas cepas *petite*, indicando diferenças entre a transcrição nuclear desses genes, dependente da atividade da mitocôndria. Logo, é provável que os dois tipos de regulação ocorram segundo mecanismos e fatores diferentes.

Outro modo de reduzir a atividade mitocondrial é através de inibidores de respiração, que atuam em complexos específicos da cadeia respiratória, no gradiente de prótons da membrana interna ou na ATP sintase. Leveduras crescidas em glicerol, incubadas previamente por 30 min na presença de antimicina-A ou de azoteto de sódio (NaN_3), não induzem *GAL1*, após 1 h de cultivo em galactose. Outras drogas como rotenona, oligomicina ou 2,4-dinitrofenol (DNP) são incapazes de inibir a transcrição de *GAL1*, mesmo após 2 h de incubação prévia com tais inibidores (Figura 10).

Como o ponto de atuação desses inibidores está bem caracterizado (Figura 5), pode-se estender as conclusões obtidas com células *petites*, determinando-se a atividade mitocondrial que é necessária para a indução de *GAL1*. Logo, a inibição do complexo I, da subunidade F_0 da ATP sintase ou o desacoplamento da fosforilação oxidativa, não resultam em alterações da expressão da galactoquinase, enquanto que a

inibição dos complexos III e IV sugere que sua atividade é necessária para a indução de *GALI*. Todavia, esperava-se o resultado obtido com a rotenona, porque o complexo I de *S. cerevisiae* não é reprimido com essa droga (Seo et al., 1998; Kitajima-Ihara e Yagi, 1998).

Inibidores de respiração são tóxicos para a célula, podendo reduzir a viabilidade celular. Determinou-se a viabilidade das células tratadas com antimicina-A e com NaN_3 , verificando-se que, após 30 min de incubação, restam 80 % de células viáveis (Figura 11). Novamente, como *GALI* induz 1000 vezes na presença de galactose, a quantidade de leveduras presentes na cultura seria suficiente para se observar os transcritos da galactoquinase. Os resultados desses experimentos indicam que a indução do gene requer a atividade dos complexos III e IV da membrana interna mitocondrial.

Diversos trabalhos apontam que a ação de drogas sobre a atividade mitocondrial modula a transcrição nuclear em fungos e em células de mamífero. Em *T. reesei*, o gene *cbh1*, que codifica a celobiohidrolase I do sistema celulolítico secretado por esse fungo de solo, possui transcrição reprimida na presença dos inibidores de respiração DNP e KCN (Abrahao-Neto et al., 1995). Na levedura *S. cerevisiae*, a transcrição do gene *CIT2* aumenta, na presença de antimicina-A e, a de *YHB1*, na presença de antimicina-A ou cianeto (Liao et al., 1991; Zhao et al., 1996). Células de mamífero, sofrem diminuição da ativação mediada por NF- κ B, quando tratadas com inibidores que atuam nos complexos I e II da cadeia respiratória, enquanto que a ativação é potencializada na presença de antimicina-A (Poyton and McEwen, 1996). Assim, os

dados observados para *GAL1* classificam-no entre os genes controlados pela atividade dos complexos III e IV da cadeia de transporte de elétrons.

A proteína URF13 de milho causa disfunção mitocondrial que inibe a indução de GAL1

O modo mais elegante de se perturbar a atividade da mitocôndria é causar disfunção na organela sem interferir diretamente na cadeia de transporte de elétrons, no conteúdo do mtDNA tampouco nas proteínas mitocondriais codificadas em genes nucleares. A abordagem que melhor cumpre esses requisitos é a expressão da proteína URF13 de milho em levedura.

No milho cmsT (planta macho-estéril, incapaz de produzir pólen fértil), a proteína codificada pelo gene *T-urf13*, forma um oligômero na membrana mitocondrial interna. A presença desse oligômero torna a planta sensível às toxinas dos fungos *Bipolaris maydis* (BmT), *Phyllosticta maydis* (PmT) e ao inseticida carbamato metomil. Ligando-se ao oligômero URF13, as toxinas-T ou o metomil abrem um poro na membrana mitocondrial interna, que desacopla a fosforilação oxidativa, dissipa o potencial de membrana $\Delta\Psi$ e permite o escape de moléculas pequenas como NAD^+ , CoA e íons Ca^{2+} (Figura 5) (Levings, 1996; Rhoads et al., 1998).

A expressão da proteína URF13, endereçada à mitocôndria de *S. cerevisiae* pelo peptídeo sinal da subunidade 9 da ATPase de *Neurospora crassa* (Banroques et al., 1986), confere sensibilidade ao metomil e às toxinas-T (Huang et al., 1990; Glab et al., 1990).

Mediu-se o potencial da membrana interna mitocondrial, utilizando-se citometria em fluxo e o fluoróforo rodamina 123, que acumula na organela ativa em proporção ao $\Delta\Psi$ (Skowroneck et al., 1990). O polipeptídeo codificado pelo gene *T-urf13*, expresso em levedura, diminui o potencial de membrana mitocondrial $\Delta\Psi$, na presença de metomil, indicando que o poro formado pelo oligômero reduz a atividade da organela (Figura 13). Células controle expressando a proteína URF13 sem a sequência endereçadora não sofrem o efeito do metomil, pois a proteína permanece no citoplasma. Esses dados concordam com os obtidos por Glab et al. (1993), que obtiveram, inclusive, heterogeneidade da população de células. A heterogeneidade mitocondrial indica que algumas moléculas da sonda fluorescente rodamina 123 estão ligadas de maneira independente da energia celular (Lopez-Mediavilla et al., 1989). Todavia, qualitativamente, observa-se que, aproximadamente, 40 % das células sofrem despolarização da membrana, após adição de metomil, indicando que, de fato, há disfunção na organela produzida pela expressão do polipeptídeo URF13 no sistema heterólogo.

Investigou-se o efeito da perturbação na função mitocondrial, causada pela proteína URF13, sobre a indução de *GAL1*, em diferentes condições nutricionais. Leveduras crescidas em glicose (fonte de carbono que reprime as mitocôndrias), transformadas com o vetor pC1, expressam a proteína URF13 que não é endereçada à mitocôndria. Nessas células, ocorre desrepressão completa de *GAL1*, 3,5 h após a remoção da glicose. Como proteína URF13 encontra-se no citoplasma, as funções mitocondriais são restauradas (Figura 14).

Em células transformadas com o vetor pTW, que endereçam a proteína URF13 à mitocôndria, o metomil liga-se ao oligômero URF13 e abre poros na membrana interna mitocondrial, causando uma disfunção que impede a desrepressão, seguida de indução completa de *GALI*. Isso indica que as mitocôndrias dos transformantes pC1 se recuperam após a remoção da glicose do meio de cultura, conforme nossa hipótese, baseada em evidências da literatura (Stevens, 1981; Ulery et al., 1994, Ronne, 1995), e que essa recuperação é necessária para a indução de *GALI*.

Mais além, os resultados mostram que a disfunção causada pelo poro formado na membrana interna mitocondrial reduz fortemente a transcrição da galactoquinase, pois a diferença entre as expressões dos transformante pC1 e pTW é de 10 vezes, após 4,5 h de cultivo na presença de YPGal.

Células de *S. cerevisiae*, crescidas em glicerol, possuem mitocôndrias ativas e em número abundante (Stevens, 1981). Os transformantes obtidos com o plasmídio pC1, cultivados em glicerol, na presença de metomil, induzem *GALI* após 30 min de crescimento em galactose (Figura 15). Nas leveduras transformadas com pTW, cultivadas em glicerol, a expressão de *GALI* sofre o efeito da disfunção mitocondrial causada pelo metomil e o oligômero URF13, pois o nível de indução é, aproximadamente, duas vezes menor, que os níveis transcricionais observados nos transformantes pC1.

A expressão da proteína URF13, na presença de metomil, diminui a viabilidade das células, pois leva à morte celular (Huang et al., 1990; Glab et al., 1990) Nos experimentos que mostram que os níveis transcricionais da cepa pC1 é maior que a da cepa TW não houve diminuição da eficiência de formação de colônias de levedura,

mesmo após 4 h na presença do carbamato (Figura 16). Assim, os resultados observados das cinéticas de indução de *GAL1*, em leveduras expressando a proteína URF13, foram realizados com células viáveis.

O conjunto dos resultados obtidos com a proteína URF13 apresentam evidências bem convincentes da comunicação entre mitocôndria e núcleo. Como o polipeptídeo URF13 desacopla a fosforilação oxidativa dissipando o potencial de membrana (Glab et al., 1993), sugere-se que o potencial eletroquímico da mitocôndria é necessário para a expressão da galactoquinase. Todavia, como o uso do DNP não proporcionou diferença significativa na indução de *GAL1* (Figura 10), certamente o poro aberto pelo polipeptídeo URF13 ou tem efeito maior que o DNP sobre o $\Delta\Psi$, ou permite que outra(s) molécula(s) escape(m)/entre(m) na mitocôndria, perdendo-se o sinal requerido para transcrição de *GAL1*.

O fato da redução do potencial de membrana mitocondrial ser capaz de alterar a transcrição de um gene nuclear é bem conhecido, pois o gene *cbh1* de *T. reesei* é reprimido por DNP (Abrahao-Neto et al., 1995). Muito recentemente, mostrou-se também que a expressão da proteína desacopladora UCP-3, no músculo esquelético de camundongos, aumenta em 3 vezes a transcrição da tioesterase mitocondrial (Moore et al., 2001). Entretanto, em *GAL1* a resposta é mais violenta, quando se realiza a pré-cultura em glicose, pois a transcrição reduz 10 vezes. Assim, adicionando-se os dados obtidos com inibidores de respiração, sugere-se que *GAL1* requer as atividades dos complexos III, IV e do potencial transmembranar $\Delta\Psi$ da organela.

Através de três abordagens diferentes, células *petite* ρ^- e Δcox10 , inibidores de respiração (antimicina-A e NaN_3) e abertura de poro na membrana mitocondrial

interna, pela ligação do metomil ao oligômero URF13, na presença, mostrou-se que a atividade mitocondrial é necessária para a indução de *GAL1*.

Como a regulação do promotor de *GAL1* foi intensamente estudada (Melcher, 1997), investigou-se, em seguida, se o controle de sua indução, dependente da função mitocondrial, ocorre a nível transcricional. Verificou-se também se o repressor Mig1p está envolvido na sinalização da mitocôndria para o núcleo.

Inibindo-se a mitocôndria, Mig1p controla a indução de GAL1 a nível transcricional

Utilizando-se o vetor pGAL1-GUS, uma construção heteróloga, que contém o promotor *GAL1* controlando o gene bacteriano *gusA* (que codifica a β -glicoronidase), verificou-se se o controle negativo da indução de *GAL1*, na presença de NaN_3 e antimicina-A, ocorre a nível transcricional. Tanto o inibidor do complexo III quanto o o inibidor do complexo IV, reprimem a transcrição do gene GUS, controlada pelo promotor *GAL1* (Figura 17). Os inibidores atuaram efetivamente, pois, medindo-se a fluorescência da rodamina 123 por citometria de fluxo, o potencial de membrana mitocondrial na presença de ambas as drogas é menor que o das células não tratadas. Esses fatos sugerem que a antimicina-A e o azoteto de sódio despolarizam as membranas mitocondriais e impedem a ativação da transcrição no promotor *GAL1*.

Dados similares foram obtidos reprimindo-se o promotor do gene *cbh1*, que codifica a enzima majoritária do sistema celulolítico, de *T. reesei*, utilizando-se DNP (2,4-dinitrofenol) para inibir a atividade mitocondrial (Abrahamo-Neto et al., 1995). Em *S. cerevisiae*, o gene *CIT2* sofre modulação positiva de sua transcrição a nível transcricional (Liao et al., 1991), quando se inibe a organela com antimicina-A. O

mesmo acontece com a flavohemoglobina, produto do gene *YHB1*, quando as células são tratadas com antimicina-A ou cianeto (Zhao et al., 1996). Logo, a regulação da transcrição de genes nucleares, dependentes da atividade mitocondrial parece controlar os genes de diversos microorganismos em seus promotores.

O gene *GAL1* sofre repressão por glicose. Isso ocorre porque o repressor Mig1p liga-se ao elemento URS, presente no promotor de *GAL1*, e recruta o complexo geral de repressão Tup1p-Ssn6p que, por sua vez, exerce sua função na maquinaria transcricional (Gancedo, 1998; Nehlin et al., 1991). Na ausência de glicose, Mig1p é fosforilada pela quinase Snf1p (Gancedo, 1998; Carlson, 1999), que impede a migração do repressor para o núcleo (DeVit et al., 1997).

Em células $\Delta mig1$ (onde o gene *MIG1* foi rompido), tratadas previamente com antimicina-A, o gene *GAL1* é expresso, na presença de galactose (Figura 18). Como na cepa selvagem esse inibidor do complexo III inibe a indução da galactoquinase, conclui-se que, provavelmente, a proteína codificada por *MIG1* está envolvida com a regulação da indução dependente da atividade mitocondrial. Adição de NaN_3 às células $\Delta mig1$ impede a indução de *GAL1*, assim como na cepa selvagem. Logo, é possível que a droga atue por outro mecanismo, não mediado por Mig1p.

Os dados obtidos sugerem que Mig1p está envolvida na regulação do promotor *GAL1*, mediante o sinal de repressão da mitocôndria. É provável que a repressão da organela, na presença de glicose, seja responsável por impedir que um sinal mitocondrial ative a quinase Snf1p, que inativa o repressor, assim que o carboidrato se exaure. Logo, esse é, provavelmente, o ponto de conexão entre a repressão por glicose e a atividade mitocondrial, requerida para a transcrição de *GAL1*.

Mig1p é uma proteína do tipo “zinc finger”, muito similar aos genes de mamífero da família Krox/Egr (early growth response), à Sp1 e à proteína do tumor de Wilms (Nehlin e Ronne, 1990). A similaridade encontra-se, exclusivamente, no domínio de ligação ao DNA (Ronne, 1995). Essas proteínas ligam-se ao motivo GC, presente no promotor de muitos genes reprimidos por glicose (Nehlin and Ronne, 1990). O fator de transcrição Egr-1, que pertence a essa família, é um regulador chave ativado por isquemia, que dispara a expressão de genes reguladores principais das respostas de inflamação, coagulação e hiper-permeabilidade vascular, e sua ativação ocorre quando as células são privadas de oxigênio (Yan et al., 2000). Logo, é possível que o repressor Mig1p, tenha conservado outro domínio, não muito óbvio na estrutura primária dessas proteínas, capaz de sentir a atividade respiratória.

O segundo mensageiro da comunicação entre mitocôndria e núcleo

Em alguns sistemas, verificou-se que as espécies reativas de oxigênio (ROS) são capazes de ativar a resposta da regulação retrógrada. Por exemplo, a ativação do fator de transcrição NF- κ B, envolvido na resposta inflamatória (Pahl e Baeuerle, 1997), ocorre através de ROS, que liberam o ativador do seu inibidor I κ B (Poyton e McEwen, 1996). O gene *YHB1* de levedura também é induzido em células tratadas com geradores de radicais livres ou deficientes na superóxido dismutase (Zhao et al., 1996).

Ubisemiquinona ou ubiquinol, formas reduzidas da coenzima Q, são auto-oxidadas e podem liberar superóxido ou H₂O₂. Em mitocôndrias, cuja cadeia respiratória foi inibida com drogas que atuam nos complexos III e IV, os níveis dessas espécies aumenta (Poyton e McEwen, 1996). Como a indução de *GAL1* é reprimida na

presença de antimicina-A, inibidor do complexo III, ou de NaN_3 , inibidor do complexo IV, acredita-se que espécies reativas de oxigênio participam do mecanismo que impede a indução. Entretanto, ao contrário de NF- κ B e *YHB1*, que possuem modulação positiva na presença de ROS, *GAL1* sofre regulação negativa.

O gene *SNF1* de *S. cerevisiae* codifica uma quinase completamente necessária para a desrepressão de *GAL1*, após remoção da glicose do meio de cultura (Carlson, 1999; Gancedo, 1998). A glicose dispara um sinal que inativa Snf1p e reprime fortemente a atividade mitocondrial, reduzindo o rendimento da síntese de ATP, que é maior na respiração. Existe uma correlação entre os níveis de ADP/ATP e a atividade de Snf1p (Wilson et al., 1996) que, na ausência de glicose, fosforila o repressor Mig1p e alivia a repressão no promotor da galactoquinase. Provavelmente, o sinal que estimula a transcrição de *GAL1* é quando os níveis de ADP/ATP atingem o limiar que ativa Snf1p. Assim, Mig1p é removida do núcleo e retoma-se a transcrição, na presença de galactose.

Ao associar-se ao oligômero URF13, o metomil abre um poro na membrana mitocondrial interna. Por esse poro, moléculas pequenas como NAD^+ CoA e íons Ca^{2+} passam livremente (Huang et al., 1990; Glab et al., 1990). É possível que a diminuição abrupta da síntese de ATP, juntamente com o aumento da permeabilidade ao cálcio, com saída de NAD^+ , possam compor um sinal forte, capaz de reprimir a transcrição de *GAL1*, em células crescidas em glicose, em até 10 vezes.

O efeito das espécies reativas de oxigênio, sobre a transcrição de *GAL1*, pode ser estudado empregando-se agentes sequestrantes ou geradores de radicais livres. Por exemplo, o trolox, uma forma hidrossolúvel do α -tocoferol (análogo da vitamina E), é

um bom seqüestrante de radicais peroxil, enquanto que a menadiona (vitamina K₃), uma quinona sintética, é capaz de gerar ROS, especificamente, na mitocôndria (Halliwell e Gutteridge, 1999). A participação do cálcio é facilmente analisada complexando-se os íons Ca²⁺ com EGTA (ácido etileno-bis(oxietilenonitrilo) tetraacético) e medindo-se o conteúdo do Ca²⁺ mitocondrial, utilizando-se citometria em fluxo e o fluoróforo Rhod 2 (Trollinger et al., 1997), específico para tais íons presentes na organela. Embora, muito provavelmente, o sinal da ativação de Snf1p seja a razão ADP/ATP da célula, os resultados obtidos com medidas de ATP apresentam inconsistência, pois o nível de nucleotídeos de adenina, em células crescidas glicose e etanol, é, praticamente, o mesmo (Gancedo, 1998). Assim, a perspectiva para trabalhos futuros é estudo do provável sinal da comunicação entre mitocôndria e núcleo, requerido para a indução da galactoquinase.

Conclusões

1. Células crescidas em glicerol, que apresentam alta capacidade respiratória, induzem *GALI* rapidamente ($t = 20$ min), enquanto que células crescidas em glicose, que possuem baixa atividade mitocondrial, induzem após 3 h de crescimento em galactose. É provável que a atividade mitocondrial, estabelecida pelo tipo de pré-cultura, seja um componente importante na sinalização da indução da galactoquinase. Portanto, a repressão das mitocôndrias por glicose é, provavelmente, responsável pelo atraso na cinética de indução de *GALI*. À medida que ocorre desrepressão dos genes mitocondriais e das enzimas envolvidas na respiração, as mitocôndrias recuperam-se, e a atividade da organela é suficiente para a expressão atingir seu nível máximo;
2. Em células crescidas em glicerol, a adição de glicose causa a repressão da transcrição de *GALI* induzida por galactose, com simultânea repressão da atividade mitocondrial. Muito provavelmente, esses eventos compartilham os mesmos reguladores; senão, compõem um mecanismo acoplado. Assim, a glicose, que reprime a transcrição de *GALI* através de mecanismos múltiplos, atua também na mitocôndria, para assegurar a forte repressão transcricional da galactoquinase;
3. Mutantes *petite* ρ^- , que apresenta deleção parcial no mtDNA, ou $\Delta cox10$, deficiente no gene nuclear que codifica a farnesil transferase mitocondrial, são incapazes de crescer em fontes de carbono não fermentáveis. Essas linhagens

também são incapazes de induzir *GALI*, após 6 horas de crescimento na presença de galactose. Conclui-se que perturbação da atividade mitocondrial, por deleção do DNA da organela ou rompimento de gene nuclear que codifica uma proteína essencial para a respiração, impede a rápida indução de *GALI*, observada na cepa selvagem;

4. Os únicos inibidores de respiração, capazes de inibir a indução de *GALI*, são a antimicina-A e o azoteto de sódio (NaN_3), que atuam nos complexos III e IV da cadeia de transporte de elétrons, respectivamente. Nesses complexos ocorre a ligação entre a atividade mitocondrial e a expressão gênica nuclear;
5. Apenas a construção que expressou a proteína quimérica, composta da sequência sinalizadora da subunidade 9 da ATP sintase de *N. crassa* fusionada ao polipeptídeo URF13 (pTW), foi capaz de conferir sensibilidade ao metomil. A proteína URF13 sozinha (pC1), não direcionada para a mitocôndria, é incapaz de comprometer a indução de *GALI*, nas condições nutricionais estudadas. O poro gerado na membrana mitocondrial interna, pela associação do metomil ao oligômero URF13, é capaz de inibir a transcrição de *GALI*, em células crescidas em glicerol ou glicose. Em particular, o efeito é dramático em células crescidas em glicose, pois, provavelmente, impede a desrepressão das mitocôndrias. Logo, a transcrição de *GALI* requer o potencial eletroquímico $\Delta\Psi$ da organela. A proteína URF13 sozinha, não direcionada para a mitocôndria, é incapaz de comprometer a indução de *GALI*, tanto em células crescidas em glicerol quanto em células crescidas em glicose;

6. O promotor *GAL1* controlando o gene heterólogo *GUS* é regulado pela atividade mitocondrial, pois não induz os transcritos da β -glicoronidase, após tratamento prévio das células com antimicina-A ou NaN_3 . Conclui-se que a regulação da indução da galactokinase, dependente da atividade dos complexos III e IV, ocorre a nível transcricional;
7. O repressor Mig1p está envolvido na regulação transcricional de *GAL1*, dependente da atividade do complexo III, mas não do complexo IV da cadeia de transporte de elétrons. Assim, o produto do gene *MIG1* é capaz de sentir a atividade respiratória e, provavelmente, a repressão por glicose e o controle da indução de *GAL1* pela atividade mitocondrial são mecanismos acoplados. Na cepa Δmig1 , tratada com NaN_3 , a indução de *GAL1* permanece inibida. Provavelmente, isso ocorre porque há outro mecanismo de repressão, que não é mediado por Mig1p.

Material e Métodos

Linhagens e meios de cultura

Utilizou-se a cepa selvagem de *S. cerevisiae* W303-1A (*MAT a*, ρ^+ , *ade2-1*, *trp1-1*, *his3-11,15*, *leu2-3,112*, *ura3-1*) (Thomas and Rothstein, 1989) e as três linhagens isogênicas: *petite nuclear* Δ *cox10* (*cox10::HIS3*) (Nobrega et al., 1990), *petite citoplasmático* ρ^- , gerada através de crescimento da cepa selvagem na presença de brometo de etídio e mutante Δ *mig1* (*mig1::LEU2*) (Nehlin et al., 1991).

Cresceram-se as leveduras em meio líquido rico YPD (1% extrato de levedura 1%, peptona 2%, glicose 2%), YPGal (1% extrato de levedura 1%, peptona 2%, galactose 2%), YPGly (extrato de levedura 1%, peptona 2%, Glicerol 5%, Glicose 5 mM), ou meio mínimo (YNB 0,67% - “yeast nitrogen base”- sem amonoácidos Y-0626, suplementado com a mistura de aminoácidos apropriada, Y-1376 para o meio Leu e Y-1501 para o meio ura) ao qual era adicionado 2% glicose [SDLeu(ura)], 5% glicerol [SLeu(ura)-Gly] ou 2% galactose [Sleu(ura)-Gal] (concentrações finais), conforme o experimento. Para o crescimento em placas adicionou-se ágar aos meios acima na concentração final de 2%. Utilizaram-se reagentes da marca Sigma no preparo dos meios de cultura.

Obtenção do petite citoplasmático ρ^-

Cresceu-se uma cultura da linhagem selvagem em 10 mL de YPD por 18-20h a 30°C, 300rpm. Inoculou-se 1/100 do volume desta cultura em 10mL de YPD contendo brometo de etídio (EtBr - concentração final 10 μ g/mL), medindo-se OD₆₀₀ a cada 12h. Repetiu-se o inóculo em EtBr até, aproximadamente, 40 gerações submetidas à

mutagênese (Liao et al., 1991) e diluiu-se 5µL desta cultura em 1ml de água autoclavada, plaqueando-se 1µL desta solução sobre 100µL de água estéril em placas YPD-agar.

Verificou-se se as colônias que cresceram eram respiratório-deficientes, plaqueando-as em YPGly/EtOH (extrato de levedura 1%, peptona 2%, Glicerol 2%, etanol 1%, ágar 2%). Selecionaram-se as colônias incapazes de crescer em fontes de carbono não fermentativas; apresentando, portanto, deficiência na atividade respiratória.

Recristlização do metomil à partir do Lannate

O metomil é vendido comercialmente como Lannate (Du Pont; metomil dissolvido em xileno). Rotoevaporou-se o inseticida comercial a 60°C até obter um sólido marrom seco, o qual foi dissolvido num volume mínimo de etanol. Ferveu-se a solução até redução do volume à metade do inicial. Resfriou-se e recristalizou-se, lentamente, em freezer a -20°C. Filtrou-se o sólido em funil de Büchner e repetiu-se a recristalização mais duas vezes. Secou-se o sólido branco final sob vácuo e determinou-se o seu ponto de fusão (78-79°C).

Plasmídios e transformação de levedura

A construção dos plasmídios pC1 e pTW, utilizados para estudar o efeito da expressão do gene *T-urf13* em levedura sobre a atividade mitocondrial e a transcrição de *GALI*, encontram-se em Glab et al. (1990). Ambos os vetores contém a informação necessária para replicação autônoma e seleção em *E. coli* e em *S. cerevisiae* (*ori*, *Amp^r* e *2µ*, *LEU2* respectivamente).

O vetor pGAL1-GUS foi obtido clonando-se o fragmento de 2 kb *HindIII*-*EcoRI* do vetor pGUS1 (Marathe and McEwen, 1995) no sítio de clonagem múltipla do vetor pYES2 (Invitrogen), digerido com as mesmas enzimas.

Os experimentos de transformação foram conduzidos conforme descrito em Dohmen et al. (1991).

Crescimento da cultura em meio líquido

Inoculou-se uma colônia isolada em 10ml de meio contendo glicose [YPD ou SDLeu(ura), conforme a linhagem do experimento], incubando-se a 30°C, 300rpm, por 18-20h. Inoculou-se, no dia seguinte, um volume apropriado do pré-inóculo em 200 mL do meio de cultura, contendo a fonte de carbono adequada para o experimento [glicerol (YPGly, SLeu(ura)-Gly) ou glicose (YPD, SDLeu(ura))], de maneira que, após 15h de crescimento, obteve-se $OD_{600} = 1$.

Coletaram-se as células centrifugando-as a 3.500 rpm por 5min em rotor Sorvall GSA a 30°C. Lavaram-se as leveduras duas vezes com 100ml de meio de cultura sem fonte de carbono, centrifugando-as nas condições anteriores. Prosseguiu-se com os tratamentos indicados em cada experimento.

Extração do RNA total

Extraíu-se o RNA total das leveduras utilizando-se o procedimento de Ausubel et al. (1995), modificado, a seguir: centrifugou-se 10 mL da cultura num tubo contendo o mesmo volume de água gelada em rotor Sorvall SS-34, coletando-se as células a 7000rpm por 3 min. Ressuspendeu-se o pellet em 1mL de tampão para RNA gelado (0,5 M NaCl; 0,2 M Tris·Cl pH 8,0; 10mM EDTA), transferindo-se para um tubo de microcentrífuga, aplicando-se um pulso de 30 seg a 14.000rpm, temperatura

ambiente. Ressuspendeu-se o pellet em 300µL de tampão para RNA, adicionou-se um volume equivalente a 200 µL de microesferas de vidro (tamanho: 450 a 600 µm) e 300 µL de solução de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico 25:24:1 equilibrada com 10mM Tris pH 8,0/1mM EDTA. Agitou-se em agitador do tipo “Vortex” por 2 min em velocidade máxima, centrifugando-se a 14.000rpm, temperatura ambiente, por 3 min. Transferiu-se a fase aquosa para um tubo de microcentrífuga contendo 200 µL de solução de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, agitando-se vigorosamente por 10 seg, repetindo-se a centrifugação anterior e transferindo-se a fase aquosa para um tubo de microcentrífuga limpo. Repetiu-se a extração anterior com 200µL de clorofórmio, transferindo-se 200 µL da fase aquosa para outro tubo limpo. Adicionou-se 1/10 do volume de acetato de sódio 3M pH 5,2, precipitando-se o RNA com 600 µL de etanol gelado por 30 min a -20°C. Centrifugou-se por 15 min em 14.000rpm a 4°C, secou-se o pellet ao ar por 10 min, ressuspendendo-se em 50 µL de água autoclavada. Determinou-se a concentração do RNA total por espectrofotometria a 260nm e a 280nm. Armazenaram-se as amostras a -70°C.

Northern blots

A eletroforese dos RNAs de levedura, após desnaturação com glioxal e DMSO, e a montagem dos “northern blots” foram executadas segundo descrito em Sambrook et al. (1989). As sondas de DNA de *GALI*, *ACT1* e *gusA* foram marcadas utilizando-se o kit “Random Primers Labeling System” da Gibco. As pré-hibridações (5 min) e as hibridações (16 h - empregando-se 25 ng de sonda marcada) das membranas de nylon, contendo o RNA imobilizado, foram realizadas em solução contendo SDS 7% e

Na₂HPO₄ 0,25 M pH 7,2 a 65°C. Lavaram-se as membranas uma vez com solução SDS 5% Na₂HPO₄ 20 mM pH 7,2 a 65°C por 30 min e outra, com solução SDS 1% Na₂HPO₄ 20 mM pH 7,2 a 65°C por 30 min. Filmes Kodak X-Omat XK-1 foram expostos às membranas em freezer a -70°C, durante 1 a 8 h.

Amplificação dos genes *GAL1*, *ACT1* e *gusA*

Com base na sequência do gene *GAL1* (Citron and Donelson, 1985), na estrutura do gene *ACT1* (Gallwitz and Sures, 1980) e do gene *gusA* (Jefferson et al., 1986) obtidas na literatura, desenharam-se oligonucleotídeos para a amplificação de suas seqüências codificadoras. Utilizou-se DNA de *S. cerevisiae* como molde para as amplificações de *GAL1* e *ACT1* e o vetor pGUS1 (Marathe and McEwen, 1995) como molde para a amplificação de *gusA*. Amplificaram-se os genes utilizando-se o procedimento descrito em Sambrook et al. (1989). Os “primers” utilizados e os programas do termociclador estão indicados abaixo:

GAL1-F 5' GCGCAAAGGAATTACCAAGACC 3'

GAL1-R 5' GGCGAGAGACTCTTCAACTAA 3'

94°C, 4 min; 25 ciclos (94°C, 1 min, 55°C, 1min, 72°C, 1 min); 72°C, 5 min.

ACT1-F 5' GAGGTTGCTGCTTTGGTTATT 3'

ACT1-R 5' GAAACACTTGTGGTGAACGAT 3'

94°C, 7 min; 4 ciclos (45°C, 1,5 min, 72°C, 1,5min, 94°C, 1min); 27 ciclos (52°C, 1 min, 72°C, 1min, 94°C, 1min); 72°C, 8 min.

gusA-F 5' GGGAATGGTGATTACCGACGA 3'

gusA-R: 5' CCATCCGTAATAACGGTTCAG 3'

94°C, 7 min; 25 ciclos (94°C, 1 min, 54°C, 1min, 72°C, 1min); 72°C, 8 min.

Procedimento para corar as células com rodamina 123

Completoou-se o protocolo de cultura em meio líquido conforme descrito nos experimentos. Aliquotou-se 5 ml da cultura e adicionou-se rodamina 123 (concentração final 10 µg/ml), incubando-se por 30 min a 30°C, 300 rpm. Transferiram-se alíquotas de 500µL para tubos de microcentrífuga, mantendo-se as amostras no gelo. Lavou-se o excesso de rodamina duas vezes com meio de cultura, sem fonte de carbono, gelado (pulsos de 30 s, 14000 rpm). Ressuspenderam-se as células em 500 µL e diluiu-se na razão de 1:10 no mesmo meio, para a análise por citometria em fluxo.

Análise da atividade mitocondrial por citometria em fluxo

As medidas por citometria em fluxo foram realizadas em um aparelho FACStar Plus (Becton-Dickinson), equipado com um laser de argônio (excitação em 488 nm e potência de 80 mW). A intensidade de fluorescência da rodamina 123 foi medida a 535 nm. Adquiriram-se os dados no software LYSYS II versão 1.1, HP Pascal 3.22. O número de células medidas por experimento foi fixado em 10.000.

A analisaram-se os resultados utilizando-se o software WinMDI 2.3 (escrito por Joseph Trotter) o qual está disponível em <http://facs.scripps.edu>.

Experimentos de viabilidade

Os experimentos de viabilidade foram baseados no trabalho de Huang et al. (1990). Cresceram-se as células até OD₆₀₀ = 1. Realizaram-se os tratamentos

apropriados (indicados nas figuras) e determinou-se a densidade de células com um hemocítômetro, ajustando-se para 10^3 células/mL, utilizando-se meio de cultura sem fonte de carbono. Plaqueou-se 100 μ L (aproximadamente 100 células) em placas adequadas (YPD ou SDLeu). Incubou-se por 2 a 3 dias a 30°C; então, o número de colônias em cada placa foi contado.

As técnicas de bioquímica e de biologia molecular não descritas neste material e métodos, porém empregadas na realização deste trabalho, encontram-se nos manuais de Ausubel et al. (1995) e Sambrook et al. (1989).

Referências

- Abrahao-Neto,J., Rossini,C.H., el-Gogary,S., Henrique-Silva,F., Crivellaro,O. and el-Dorry,H. (1995) Mitochondrial functions mediate cellulase gene expression in *Trichoderma reesei*. *Biochemistry*, **34**, 10456-10462.
- Ansari,A.Z., Reece,R.J. and Ptashne,M. (1998) A transcriptional activating region with two contrasting modes of protein interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 13543-13548.
- Ausubel,F.M., Brent,R., Kingston,R.E., Moore,D.D., Seidman,J.G., Smith,J.A. and Struhl,K. (1995) *Short Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, New York, NY.
- Baeuerle,P.A. and Henkel,T. (1994) Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.*, **12**, 141-179.
- Bajwa,W., Torchia,T.E. and Hopper,J.E. (1988) Yeast regulatory gene *GAL3*: carbon regulation; UAS_{GAL} elements in common with *GAL1*, *GAL2*, *GAL7*, *GAL10*, *GAL80* and *MEL1*; and encoded protein strikingly similar to yeast and *Escherichia coli* galactokinases. *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 3439-3447.
- Banroques,J., Delahodde,A. and Jacq,C. (1986) A mitochondrial RNA maturase gene transferred to the yeast nucleus can control mitochondrial mRNA splicing. *Cell*, **46**, 837-44.
- Bhat,P.J., Oh,D. and Hopper,J.E. (1990) Analysis of GAL3 signal transduction pathway activating GAL4 protein-dependent transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **125**, 281-291.
- Bhat,P.J. and Hopper,J. (1991) The mechanism of inducer formation in *gal3* mutants of the yeast galactose system is independent of normal galactose metabolism and mitochondrial respiratory function. *Genetics*, **128**, 233-239.
- Blank,T.E., Woods,M.P., Lebo,C.M., Xin,P and Hopper,J. (1997) Novel Gal3 proteins showing altered Gal80p binding cause constitutive transcription of Gal4p-activated genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 2566-2575.
- Boles,E. and Hollenberg,C.P. (1997) The molecular genetics of hexose transport in yeasts. *FEMS Microbiol Rev.*, **21**, 85-111.
- Bram,R.J., Lue,N.F. and Kornberg,R.D. (1986) A GAL family of upstream activating sequences in yeast: roles in both induction and repression of transcription. *EMBO J.*, **5**, 603-608.

- Broach,J.R. (1979) Galactose regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. The enzymes encoded by the *GAL7*, *10*, *1* cluster are coordinately controlled and separately translated. *J. Mol. Biol.*, **131**, 41-53.
- Carey,M., Kakidani,H., Leatherwood,J., Mostashari,F. and Ptashne,M. (1989) An amino-terminal fragment of GAL4 binds DNA as a dimer. *J. Mol. Biol.*, **209**, 423-432.
- Carle-Urioste,J.C., Escobar-Vera,J., El-Gogary,S., Henrique-Silva,F., Torigoi,E., Crivellaro,O., Herrera-Estrella,A. and El-Dorry H. (1997) Cellulase induction in *Trichoderma reesei* by cellulose requires its own basal expression. *J Biol Chem.* **272**, 10169-10174.
- Carling,D., Aguan,K., Woods, A., Verhoeven, A.J., Beri,R.K., Brennan,C.H., Sidebottom,C., Davison,M.D. and Scott,J. (1994) Mammalian AMP-activated protein kinase is homologous to yeast and plant protein kinases involved in the regulation of carbon metabolism. *J Biol Chem.*, **15**, 11442-11448.
- Carlson,M., Osmond,B.C., Neigeborn,L. and Botstein,D. (1981) Mutants of yeast defective in sucrose utilization. *Genetics*, **98**, 25-40.
- Carlson,M. (1999) Glucose repression in yeast. *Curr.Opin. Microbiol.*, **2**, 202-207.
- Carraro,D.M., Ferreira Junior,J.R., Schumacher,R., Pereira,G.G., Hollenberg,C.P. and El-Dorry H. (1998) A region of the cellobiohydrolase I promoter from the filamentous fungus *Trichoderma reesei* mediates glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*, dependent on mitochondrial activity. *Biochem Biophys Res Commun.*, **253**, 407-14
- Celenza,J.L. and Carlson,M. (1989) Mutational analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 protein kinase and evidence for functional interaction with the SNF4 protein. *Mol Cell Biol.*, **9**, 5034-5044.
- Celenza,J.L., Eng,F.J. and Carlson,M. (1989) Molecular analysis of the SNF4 gene of *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for physical association of the SNF4 protein with the SNF1 protein kinase. *Mol Cell Biol.*, **9**, 5045-5054.
- Chaumont,F., Bernier,B., Buxant,R., Williams,M.E., Levings,C.S. III and Boutry,M. (1995) Targeting the maize T-urf13 product into tobacco mitochondria confers methomyl sensitivity to mitochondrial respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **92**, 1167-1171.
- Chen,X.J. and Clark-Walker,G.D. (2000) The petite mutation in yeasts: 50 years on. *Int Rev Cytol.*, **194**, 197-238.

- Ciracy,M. (1977) Isolation and characterization of further *cis*- and *trans*-acting regulatory elements involved in the synthesis of glucose-repressible alcohol dehydrogenase (ADHII) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.*, **176**, 427-431.
- Citron,B.A. and Donelson,J.E (1984) Sequence of the *Saccharomyces GAL* region and its transcription in vivo. *J. Bacteriol.*, **158**, 269-278.
- Cooper,J.P., Roth,S.Y. and Simpson,R.T. (1994) The global transcriptional regulators, SSN6 and TUP1, play distinct roles in the establishment of a repressive chromatin structure. *Genes Dev.*, **8**, 1400-1410.
- Davis,R.E., Miller,S., Herrnsstadt,C, Ghosh,S.S., Fahy,E., Shinobu,L.A., Galasko,D., Thal,L.J., Beal,M.F., Howell,N. and Parker,W.D.Jr. (1997) Mutations in mitochondrial cytochrome c oxidase genes segregate with late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **94**, 4526-4531.
- DeVit,M.J., Waddle,J.A. and Johnston,M. (1997) Regulated nuclear translocation of the Mig1 glucose repressor. *Mol. Biol. Cell*, **8**, 1603-1618.
- Dewey,R.E., Siedow,J.N., Timothy,D.H. and Levings,C.S. III (1988) A 13-kilodalton maize mitochondrial protein in *E. coli* confers sensitivity to *Bipolaris maydis* toxin. *Science.*, **239**, 293-295.
- Dohmen,J.R., Strasser,A.W.M., Höner,C.B. and Hollenberg,C.P. (1991) An efficient transformation procedure enabling long-term storage of competent cells of various yeast genera. *Yeast*, **7**, 691-692.
- el-Gogary,S., Leite,A., Crivellaro,O., Eveleigh,D.E. and el-Dorry,H. (1989) Mechanism by which cellulose triggers cellobiohydrolase I gene expression in *Trichoderma reesei*. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.* **86**, 6138-6141.
- Entian,K.D. and Zimmermann,F.K. (1982) New genes involved in carbon catabolite repression and derepression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, **151**,1123-1128.
- Erickson,J.R. and Johnston,M. (1993) Genetic and molecular characterization of GAL83: its interaction and similarities with other genes involved in glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **135**, 655-664.
- Feng,Z., Wilson,S.E., Peng,Z.Y., Schlender,K.K., Reiman,E.M. and Trumbly,R.J. (1991). The yeast *GLC7* gene required for glycogen accumulation encodes a type 1 protein phosphatase. *J. Biol. Chem.*, **266**, 23796-23801.

- Ferguson,L.R. and von Borstel,R.C. (1992) Induction of the cytoplasmic 'petite' mutation by chemical and physical agents in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.*, **265**, 103-148.
- Gallwitz,D. and Sures,I. (1980) Structure of a split yeast gene: complete nucleotide sequence of the actin gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 2546-2550.
- Gancedo,J. (1998) Yeast catabolite repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**, 334-361.
- Giniger,E., Varnum, S.M. and Ptashne, M. (1985) Specific DNA-binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. *Cell*, **40**, 767-774.
- Glab,N., Wise,R.P., Pring,D.R., Jacq,C. and Slonimski,P. (1990) Expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a gene associated with cytoplasmic male sterility from maize: respiratory dysfunction and uncoupling of yeast mitochondria. *Mol. Gen. Genet.*, **223**, 24-32.
- Glab,N., Petit,P.X. and Slonimski,P.P. (1993) Mitochondrial dysfunction in yeast expressing the cytoplasmic male sterility T-urf13 gene from maize: analysis at the population and individual cell level. *Mol Gen Genet.*, **236**, 299-308.
- Green,D.R. and Reed,J.C. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science*, **281**, 1309-1312.
- Halliwell,B. and Gutteridge,J. (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, Oxford, UK.
- Hanna,M.G. and Nelson,I.P. (1999) Genetics and molecular pathogenesis of mitochondrial respiratory chain diseases. *Cell. Mol. Life Sci.*, **55**, 691-706.
- Hayakawa,T., Noda,M., Yasuda,K., Yorifuji,H., Taniguchi,S., Miwa,I., Sakura,H., Terauchi,Y., Hayashi,J., Sharp,G.W., Kanazawa,Y., Akanuma,Y., Yazaki,Y. and Kadowaki,T. (1998) Ethidium bromide-induced inhibition of mitochondrial gene transcription suppresses glucose-stimulated insulin release in the mouse pancreatic beta-cell line betaHC9. *J Biol Chem.*, **273**, 20300-20307.
- Holzer,H. (1976) Catabolic inactivation in yeast. *Trends Biochem. Sci.*, **1**, 178-181.
- Huang,J., Lee,S.-H., Lin,C., Medici,R., Hack,E. and Myers,A.M. (1990) Expression in yeast of the T-URF13 protein from Texas male sterile maize mitochondria confers sensitivity to methomyl and to Texas-cytoplasm-specific fungal toxins. *EMBO J.*, **9**, 339-347.

- Jefferson,R.A., Burgess,S.M. and Hirsh,D. (1986) β -Glucoronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 8447-8451.
- Jia,Y., Rothermel,B., Thornton,J. and Butow,R.A. (1997) A basic helix-loop-helix-leucine zipper transcription complex in yeast functions in a signaling pathway from mitochondria to the nucleus. *Mol Cell Biol.*, **17**, 1110-1117.
- Jiang,R. and Carlson,M. (1996) Glucose regulates protein interactions within the yeast SNF1 protein kinase complex. *Genes Dev.*, **10**, 3105-3115.
- Johnston,M. (1987) Genetic evidence that zinc is an essential co-factor in the DNA-binding domain of GAL4 protein. *Nature*, **328**, 353-355.
- Johnston,M., Flick,J.S. and Pexton,T. (1994) Multiple mechanisms provide rapid and stringent glucose repression of GAL gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.*, **14**, 3834-3841.
- Kadowaki,T., Kadowaki,H., Mori,Y., Tobe,K., Sakuta,R., Suzuki,Y., Tanabe,Y, Sakura,H., Awata,T., Goto,Y., Hayakawa,T., Matsuoka,K., Kawamori,R., Kamada,T., Horai,S., Nonaka,I., Hagura,R., Akanuma,Y., and Yazaki,Y. (1994), A subtype of diabetes mellitus associated with a mutation of mitochondrial DNA. *N Engl J Med.*, **330**, 962-968.
- Kalaydjieva,L., Perez-Lezaun,A., Angelicheva,D., Onengut,S. Dye,D., Bosshard,N.U, Jordanova,A. Savov,A. Yanakiev,P. Kremensky,I. Radeva,B. Hallmayer,J. Markov,A., Nedkova,V., Tournay,I. Aneva,L. and Gitzelmann,R. (1999) A founder mutation in the GK1 gene is responsible for galactokinase deficiency in Roma (Gypsies). *Am. J. Hum. Genet.*, **65**, 1299-1307.
- Keleher,C.A., Reed,M.J., Schultz,J., Carlson,M. and Johnson,A.D. (1992) Ssn6-Tup1 is a general repressor of transcription in yeast. *Cell*, **68**, 709-719.
- Kitajima-Ihara,T. and Yagi,T. (1998) Rotenone-insensitive internal NADH-quinone oxidoreductase of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria: the enzyme expressed in *Escherichia coli* acts as a member of the respiratory chain in the host cells. *FEBS Lett.* **421**, 37-40.
- Korth,K.L. and Levings,C.S. III (1993) Baculovirus expression of the maize mitochondrial protein URF13 confers insecticidal activity in cell cultures and larvae. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **90**, 3388-3392.
- Lagunas,R. (1993) Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev.*, **10**, 229-242.

- Levings, C.S. III. (1996) Infertility treatment: a nuclear restorer gene in maize. *Science*, **272**, 1279-1280.
- Liao, X.S., Small, W.C., Srere, P.A. and Butow, R.A. (1991) Intramitochondrial functions regulate nonmitochondrial citrate synthase (CIT2) expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.*, **11**, 38-46.
- Liao, X. and Butow, R.A. (1993) RTG1 and RTG2: two yeast genes required for a novel path of communication from mitochondria to the nucleus. *Cell*, **72**, 61-71.
- Lopez-Mediavilla, C., Orfao, A., Gonzalez, M. and Medina, J.M. (1989) Identification by flow cytometry of two distinct rhodamine-123-stained mitochondrial populations in rat liver. *FEBS Lett.* **254**, 115-20.
- Lundin, M., Nehlin, J.O. and Ronne, H. (1994) Importance of a flanking AT-rich region in target site recognition by the GC box-binding zinc finger protein MIG1. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 1979-1985.
- Ma, J. and Ptashne, M. (1987) The carboxi-terminal 30 aminoacids of GAL4 are recognized by GAL80. *Cell*, **50**, 137-142.
- Marathe, S.V. and McEwen, J.E. (1995) Vectors with the *gus* reporter for identifying and quantitating promoter regions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, **154**, 105-107.
- Margulis, L. (1981) *Symbiosis in cell evolution*. W.H. Freeman, San Francisco, CA.
- Melcher, K. (1997) Galactose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: a paradigm of eukaryote gene regulation. In Zimmermann, F.K. and Entian, K.D. (ed.), *Yeast sugar metabolism*, Technomic, Lancaster, PA, p. 235-269.
- Melcher, K. and Xu, H.E. (2001) Gal80-Gal80 interaction on adjacent Gal4p binding sites is required for complete *GAL* gene repression. *EMBO J.*, **20**, 841-851.
- Mitchell, K.I., Stapleton, D., Gao, G., House, C., Michell, B., Katsis, F., Witters, L.A. and Kemp, B.E. (1994) Mammalian AMP-activated protein kinase shares structural and functional homology with the catalytic domain of yeast Snf1 protein kinase. *J Biol Chem.*, **269**, 2361-2364.
- Moore, G.B., Himms-Hagen, J., Harper, M.E. and Clapham, J.C. (2001) Overexpression of UCP-3 in skeletal muscle of mice results in increased expression of mitochondrial thioesterase mRNA. *Biochem Biophys Res Commun.*, **283**, 785-90.

- Murthy,T.V.S. and Bhat,J.P. (2000) Disruption of galactokinase signature sequence in Gal3p of *Saccharomyces cerevisiae* does not lead to loss of signal transduction function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **273**, 824-828.
- Mylin,L.M., Bhat,J.P. and Hopper, J.E. (1989) Regulated phosphorylation and dephosphorylation of GAL4, a transcriptional activator. *Genes Dev.*, **3**, 1157-1165.
- Neigeborn, L. and Carlson,M. (1984) Genes affecting the regulation of SUC2 gene expression by glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **108**, 845-858.
- Nehlin,J.O. and Ronne,H. (1990) Yeast MIG1 repressor is related to the mammalian early growth response and Wilms' tumour finger proteins. *EMBO J.*, **9**, 2891-2898.
- Nehlin,J.O., Carlberg,M. and Ronne,H. (1991) Control of yeeast *GAL* genes by MIG1 represor: a transcriptional cascade in the glucose response. *EMBO J.*, **10**, 3373-3377.
- Nobrega,M.P., Nobrega,F.G. and Tzagoloff,A. (1990) *COX10* codes for a protein homologous to the ORF1 product of *Paracoccus denitrificans* and is required for the synthesis of yeast cytochrome oxidase. *J. Biol. Chem.*, **265**, 14220-14226.
- Östling,J. and Ronne,H. (1998) Negative control of the Mig1p repressor by Snf1p-dependent phosphorylation in the absence of glucose. *Eur. J. Biochem*, **252**, 162-168.
- Özcan,S., Dover,J., Rosenwald,A.G., Wölfl,S. and Johnston,M. (1996) Two glucose transporters in *Saccharomyces cerevsiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 12428-12432.
- Özcan,S., Dover,J. and Johnston,M. (1998) Glucose sensing and signalling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, **17**, 2566-2573.
- Pahl,H.L. and Baeuerle,P.A. (1997) The ER-overload response: activation of NF-kappa B. *Trends Biochem. Sci.*, **22**,63-67.
- Parikh,V.S., Morgan,M.M., Scott,R., Clements,L.S. and Butow,R.A. (1987) The mitochondrial genotype can influence nuclear gene expression in yeast. *Science*, **235**, 576-580.
- Peng,G. and Hopper,J.E. (2000) Evidence for Gal3p's cytoplasmic location and Gal80p's dual cytoplasmic-nuclear location implicates new mechanisms for controlling Gal4p activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 5140-5148.

- Pfeiffer,T., Schuster,S. and Bonhoeffer,S. (2001) Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. *Science.*, **292**,504-7.
- Platt,A., and Reece,R.J. (1998) The yeast galactose genetic switch is mediated by formation of a Gal4p-Gal80p-Gal3p complex. *EMBO J.*, **17**, 4086-4091.
- Platt,A., Ross,H.C., Hankin,S. and Reece,R.J. (2000) The insertion of two aminoacids into a transcriptional inducer converts into a galactokinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 3154-3159.
- Poyton,R.O. and McEwen,J.E. (1996) Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes. *Annu Rev Biochem.*, **65**, 563-607.
- Raha,S and Robinson,B.H. (2000) Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem Sci.*, **25**, 502-508.
- Redd,M.J., Stark,M.R. and Johnson,A.D. (1996) Accessibility of alpha 2-repressed promoters to the activator Gal4. *Mol Cell Biol.*, **16**, 2865-2969.
- Rhoads,D.M., Brunner-Neuenschwander,B., Levings,C.S. III. and Siedow,J.N. Cross-linking and disulfide bond formation of introduced cysteine residues suggest a modified model for the tertiary structure of URF13 in the pore-forming oligomers. *Arch Biochem Biophys.* **354**, 158-164.
- Rothermel,B.A., Thornton,J.L. and Butow,R.A. (1997) Rtg3p, a basic helix-loop-helix/leucine zipper protein that functions in mitochondrial-induced changes in gene expression, contains independent activation domains. *J Biol Chem.* **272**, 19801-19807.
- Sadowski,I., Costa,C. and Dhanawansa,R. (1996) Phosphorylation of Gal4p at a single C-terminal residue is necessary for galactose induced transcription. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 4879-4887.
- Sambrook,J., Fritsch,E.F. and Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY.
- Schagger,H. and Pfeiffer,K. (2000) Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.*, **19**, 1777-1783.
- Scheffler,I.E. (2000) A century of mitochondrial research: achievements and perspectives. *Mitochondrion.*, **1**, 3-31.
- Schulze-Osthoff,K., Bakker,A.C., Vanhaesebroeck,B., Beyaert,R., Jacob,W.A. and Fiers,W. (1992) Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early

- damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation. *J. Biol. Chem.*, **267**, 5317-5323.
- Sekito,T., Thornton,J. and Butow,R.A. (2000) Mitochondria-to-nuclear signaling is regulated by the subcellular localization of the transcription factors Rtg1p and Rtg3p. *Mol. Biol. Cell.*, **11**, 2103-2115.
- Seo,B.B., Kitajima-Ihara T, Chan,E.K., Scheffler,I.E., Matsuno-Yagi,A. and Yagi,T. (1998) Molecular remedy of complex I defects: rotenone-insensitive internal NADH-quinone oxidoreductase of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria restores the NADH oxidase activity of complex I-deficient mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **95**: 9167-71.
- Sil,A.K., Alam,S., Xin,P. Ma.L., Morgan,M., Lebo,C.M., Woods,M.P. and Hopper,J.E. (1999) The Gal3p-Gal80p-Gal4p transcriptional switch of yeast: Gal3p destabilizes the Gal80p-Gal4p complex in response to galactose and ATP. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 7828-7840.
- Skowronek,P., Krummeck,G., Haferkamp,O. and Rodel G. (1990) Flow cytometry as a tool to discriminate respiratory-competent and respiratory-deficient yeast cells. *Curr Genet.* **18**, 265-7.
- Stevens, B.J. (1981) In *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces – Life Cycle and Inheritance* (J.N. Strathern, E.W. Jones and J.R. Broach, eds), Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, pp 471-504.
- Suzuki-Fujimoto,T., Fukuma,M., Yano,K.-I., Sakurai,H., Vonica,A., Johnston,S.A. and Fukasawa,T. (1996) Analysis of the galactose signal transduction pathway in *Saccharomyces cerevisiae*: interaction between Gal3p and Gal80p. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 2504-2508.
- Swerdlow,R.H., Parks,J.K., Miller,S.W., Tuttle,J.B., Trimmer,P.A., Sheehan,J.P., Bennett,J.P.Jr., Davis,R.E. and Parker.W.D.Jr. (1996) Origin and functional consequences of the complex I defect in Parkinson's disease. *Ann Neurol.*, **40**,663-671.
- Thomas,B.J. and Rothstein,R.J. (1989) Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell*, **56**, 619-630.
- Treitel,M.A. and carlson.M. (1995) Repression by SSN6-TUP1 is directed by MIG1, a repressor/activator protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 3132-3136.

- Trollinger,D,R,, Cascio,W.E. and Lemasters,J.J. (1997) Selective loading of Rhod 2 into mitochondria shows mitochondrial Ca^{2+} transients during the contractile cycle in adult rabbit cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun.*, **236**, 738-742.
- Tschopp,J.F., Emr,S.D., Field,C. and Schekman,R. (1986) GAL2 codes for a membrane-bound subunit of the galactose permease in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.*, **166**, 313-318.
- Tsuyumu,S. and Adams,B.G. (1974) Dilution kinetic studies of yeast populations: *in vivo* aggregation of galactose utilizing enzymes and positive regulator molecules. *Genetics*, **77**, 491-505.
- Tu,J. and Carlson,M. (1995) REG1 binds to protein phosphatase type 1 and regulates glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, **14**, 5939-5946.
- Tzagoloff,A. (1982) *Mitochondria*. Plenum Press, New York, NY
- Tzagoloff,A., Nobrega,M., Gorman,N. and Sinclair,P. (1993) On the functions of the yeast COX10 and COX11 gene products. *Biochem Mol Biol Int.* **31**, 593-598.
- Tzamarias,D. and Struhl,K. (1994) Functional dissection of the yeast Cyc8-Tup1 transcriptional co-repressor complex. *Nature*, **369**, 758-760.
- Ulery,T.L., Jang,S.H. and Jaehning,J.A. (1994) Glucose repression of yeast mitochondrial transcription: kinetics of derepression and role of nuclear genes. *Mol Cell Biol.*, **14**, 1160-1170.
- Voet,D. and Voet,J.G.(1995) *Biochemistrty*, John Wiley & Sons, New York, NY.
- Vollenbroich,V., Meyer,J., Engels,R., Cardinali,G., Menezes,R.A. and Hollenberg,C.P. (1999) Galactose induction in yeast involves association of Gal80p with Gal1p or Gal3p. *Mol. Gen. Genet.*, **261**, 495-507.
- von Zglinicki,T., Serra,V., Lorenz,M., Saretzki,G., Lenzen-Grossimlighaus,R., Gessner,R., Risch,A, and Steinhagen-Thiessen,E. (2000) Accumulation of single-strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblasts. *Free Radic. Biol. Med.*, **28**, 64-74.
- Williams,F.E., Varanasi,U. and Trumbly,R.J. (1991) The CYC8 and TUP1 proteins involved in glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* are associated in a protein complex. *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 6500-6511.
- Wilson,W.A., Hawley,S.A. and Hardie,D.G. (1996) Glucose repression/derepression in budding yeast: SNF1 protein kinase is activated by phosphorylation under

derepressing conditions, and this correlates with a high AMP:ATP ratio. *Curr Biol.*, **6**, 1426-1434.

Woods,A., Munday,M.R., Scott,J., Yang,X., Carlson,M. and Carling,D. (1994) Yeast SNF1 is functionally related to mammalian AMP-activated protein kinase and regulates acetyl-CoA carboxylase in vivo. *J Biol Chem.*, **269**, 19509-19515.

Yan,S.F., Fujita,T., Lu,J., Okada,K., Shan Zou,Y., Mackman,N., Pinsky,D.J. and Stern,D.M. (2000) Egr-1, a master switch coordinating upregulation of divergent gene families underlying ischemic stress. *Nat. Med.*, **6**, 1355-61.

Yang,X., Hubbard,E.J. and Carlson,M. (1992) A protein kinase substrate identified by the two-hybrid system. *Science*, **257**, 680-682.

Yang,X., Jiang,R. and Carlson,M. (1994) A family of proteins containing a conserved domain that mediates interaction with the yeast SNF1 protein kinase complex. *EMBO J.*, **13**, 5878-5886.

Yano,K. and Fukasawa,T. (1997) Galactose-dependent reversible interaction of Gal3p with gal80p in the induction pathway of Gal4p-activated genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 1721-1726.

Zenke,F.T., Engels,R., Vollenbroich,V. Meye,J. Hollenberg,C.P. and Breunig,K.D. (1996) Activation of Gal4p by galactose-dependent interaction of galactokinase and Gal80p. *Science*, **272**, 1662-1665.

Zimmermann,F.K., Kaufmann,I., Rasenberger,H. and Hausmann,P. (1977) Genetics of carbon catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*: genes involved in the derepression process. *Mol. Gen. Genet.*, **151**, 95-103.

Zimmermann,F.K. and Scheel,I. (1977) Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* resistant to carbon catabolite repression. *Mol. Gen. Genet.*, **154**, 75-82.

Zhao XJ, Raitt D, V Burke P, Clewell AS, Kwast KE, Poyton RO. (1996) Function and expression of flavohemoglobin in *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence for a role in the oxidative stress response. *J Biol Chem.*, **271**, 25131-25138.