UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Expressão heteróloga de um transportador mitocondrial de nicotinamida adenina dinucleotídeo (Ndt1) de *Aspergillus fumigatus* em células HEK293 com deficiência da citrina

Laís de Lourdes de Lima Balico

Ribeirão Preto 2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Expressão heteróloga de um transportador mitocondrial de nicotinamida adenina dinucleotídeo (Ndt1) de *Aspergillus fumigatus* em células HEK293 com deficiência da citrina

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientada: Laís de Lourdes de Lima Balico

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia no dia 21/11/2018. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto 2018 AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

BALICO, LAÍS DE LOURDES DE LIMA.

Expressão heteróloga de um transportador mitocondrial de nicotinamida adenina dinucleotídeo (Ndt1) de *Aspergillus fumigatus* em células HEK293 com deficiência da citrina. Ribeirão Preto, 2018.

...p.: 162; 30 cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Uyemura, Sérgio Akira.

1. Transportador mitocondrial de nicotinamida adenina dinucleotídeo. 2. Citrina. 3. Mitocôndria.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Laís de Lourdes de Lima Balico

Expressão heteróloga de um transportador mitocondrial de nicotinamida adenina dinucleotídeo (Ndt1) de *Aspergillus fumigatus* em células HEK293 com deficiência da citrina.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientada: Laís de Lourdes de Lima Balico

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura

Aprovado em:

Banca Examinadora

_Assinatura:
Assinatura:
Assinatura:
Assinatura:
_Assinatura:
Assinatura:

Dedicatória

Dedico esta tese ...

À minha irmã, Hysadora, sem seu amor e luz nunca teria realizado meus sonhos. Para sempre minha estrelinha, saudades infinitas.

Ho meu esposo, Eduardo, que ilumina meus dias, tornando minha vida mais leve e feliz. Obrigado por acreditar até quando eu já havia desistido.

Á minha filhotinha, Qola, por sempre estar ao meu lado.

À minha família, minha mãe Teresa, mãe do coração Jussara, aos meus avôs, minha irmã Betina e meu cunhado Fabrício, pelo amor, apoio incondicional e por acreditarem sempre.

À minha nova família, meus sogros Nilceia e Ángelo, minha eunhada, Daisa, pela compreensão e apoio de sempre.

Hgradecimentos

AGRADECIMENTOS

Ao professor e orientador Dr. Sérgio Akira Uyemura, meus agradecimentos pela paciência, dedicação, confiança, ensinamentos e exemplo de comprometimento com a pesquisa, educação e respeito ao próximo. Com certeza você será meu mentor científico durante toda a minha carreira.

À Prof^a. Dr^a. Andréia Machado Leopoldino, pela ajuda nos experimentos, discussões pertinentes e disponibilidade em diversos momentos.

À Prof^a. Dr^a. Taisa Magnani Dinamarco pelas discussões pertinentes.

Aos amigos Ms. Émerson S. Santos, João J. Franco, Aline Bernardi, Stefânia Minto, Allysson Rodrigo e Regina Teixeira, pela amizade sincera, discussões, paciência e bons momentos.

Ao Dr. Vinicius Kannen, pela ajuda em diversos momentos e discussões pertinentes.

À amiga Julina Sakita, minha irmã do coração, pela amizade sincera, discussões pertinentes, momentos de descontração e trabalho, e acima de tudo pelo companheirismo nas horas mais difíceis.

Aos alunos de iniciação científica, Julia Roza e Maycon Marção, pela paciência e pela amizade construída.

Aos demais amigos do Laboratório de Bioquímica Clinica da FCFRP-USP e laboratório da Prof^a.Dr^a Taisa Magnani Dinamarco.

A todos os docentes e funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia pela atenção e comprometimento com o ensino.

Ao Henrique Theodoro, secretário do Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia pela atenção e dedicação que sempre demonstrou.

A todos os amigos do Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia pela amizade e por todos os momentos de discussão científica e de descontração. À Universidade de Tsukuba, ao Programa Trans-Pacífico e a Prof^a. Dr^a. Saori Isoda, pela oportunidade de intercâmbio no doutorado, pelo apoio financeiro e principalmente pela amizade construída.

Ao Prof. Dr. Fumihiro Sugiyama, ao Prof. Dr. Seya Mizuno e todos os amigos do laboratório pela oportunidade de doutorado sanduiche no Japão, pela convivência harmoniosa, discussões pertinentes e pela amizade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte técnico e financeiro ao laboratório.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de doutorado concedida.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (Capes) – Código de Financiamento 001.

A todos aqueles que, embora não citados, contribuíram de direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

"Quando a inteligência e a bondade ou afeto são usados em conjunto, todos os atos humanos passam a ser construtivos."

Dalai Lama



RESUMO

Balico, L.L.L. Expressão heteróloga de um transportador mitocondrial de nicotinamida adenina dinucleotídeo (Ndt1) de *Aspergillus fumigatus* em células HEK293 com deficiência da citrina. 2018. 162f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

O balanço redox em mitocôndrias de mamíferos é realizado pelo transportador de aspartato-glutamato (AGC), o gual é o principal mecanismo para o movimento de equivalentes redutores na forma de NADH. A citrulinemia do tipo II (CTLN2) é uma doença autossômica recessiva de início tardio, causada por mutações no gene SLC25A13 que codifica a citrina. A citrina é uma isoforma do transportador AGC e catalisa o transporte de glutamato citosólico através da troca com o aspartato mitocondrial, o qual será utilizado no ciclo da ureia. A CTLN2 promove uma deficiência no ciclo da ureia e conseguente hiperamonemia. A deficiência da citrina promove um aumento da razão NADH/NAD⁺ citosólica. O aumento dessa razão inibe a glicólise e a gliconeogênese. O desenvolvimento de modelo *in vitro* da CTLN2 é importante para estudos do mecanismo da doença e de novas terapias. A expressão heteróloga de proteínas entre diferentes reinos tem sido utilizado como uma forma de corrigir algumas doenças mitocondriais. Estudos bioquímicos e moleculares em nosso laboratório demonstraram a presença de um transportador mitocondrial de nicotinamida adenina dinucleotídeo (Ndt1) em Aspergillus fumigatus. Ndt1 realiza o transporte de NAD⁺ citosólico para a matriz mitocondrial, sendo dessa forma uma proteína importante para manter o balanço redox em A. fumigatus. Assim, o objetivo deste trabalho foi obter uma linhagem de células de mamífero HEK293 com knockdown para o gene SLC25A13, ou seja, um modelo in vitro de CTLN2 e a expressão heteróloga da proteína Ndt1 como uma forma de recuperação do metabolismo. As células com knockdown para o gene SLC25A13 apresentaram um aumento da razão NADH/NAD+ citosólico, redução da glicólise, redução da concentração da ureia e aumento da concentração de amônia. A expressão de Ndt1 foi capaz de reduzir a razão NADH/NAD+ citosólico e recuperou a atividade glicolítica. Entretanto, a expressão de Ndt1 não foi capaz de aumentar a concentração de ureia e reduzir a concentração de amônia causadas pela CTLN2. Dessa forma, nossos resultados sugerem que a expressão da proteína Ndt1 em células de mamíferos recupera o metabolismo mitocondrial e atividade glicolítica das células com CTLN2, mas não melhora o ciclo da ureia e o aumento da concentração de amônia.

Palavras-chave: Citrulinemia, Mitocôndria, Citrina, Transportador mitocondrial de nicotinamida adenina dinucleotídeo, *Aspergillus fumigatus*.



ABSTRACT

Balico, L.L.L. **H**eterologous expression of a mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide transporter (Ndt1) from *Aspergillus fumigatus* in HEK293 cells with citrin deficiency. 2018. 162f. Thesis (Doutoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Redox balance in mammalian mitochondria is performed by the aspartate-glutamate carrier (AGC), which is the main mechanism for the movement of reducing equivalents in the form of NADH.Type II citrullinemia (CTLN2) is an adult-onset autosomal recessive disease caused by mutations in SLC25A13 gene, and that coding citrin. Citrin is an isoform of AGC and catalyzes the transport of cytosolic glutamate through exchange with mitochondrial aspartate. It will be used in the urea cycle. CTLN2 causes urea cycle deficiency and hyperammonemia. Citrin deficiency cause an increase in the cytosolic NADH/NAD+ ratio. The increase in this ratio inhibits glycolysis and gluconeogenesis. The development an in vitro CTLN2 model is important for new studies about the disease mechanism and new therapies. Heterologous expression of proteins from different organisms has been used to recover some mitochondrial diseases. Biochemical and molecular studies in our laboratory demonstrated the presence of a mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide transporter (Ndt1) in Aspergillus fumigatus. Ndt1 protein performs cytosolic NAD+ transport to the mitochondria matrix, thus being an important protein to keep the redox balance in A. fumigatus. Thus, the aim of this work was to obtain a line of HEK293 mammalian cells with knockdown for the SLC25A13 gene, an in vitro CTLN2 model and the heterologous expression of the Ndt1 protein as a form of metabolism recovery. Cells with citrin knockdown showed an increase of cytosolic NADH/NAD+ ratio, reduction of glycolysis, reduction of urea concentration, and increase of ammonia concentration. Expression of Ndt1 protein was able to reduce cytosolic NADH/NAD+ ratio and recovered the glycolytic activity. However, Ndt1 protein was not able to increase the urea concentration and reduce of ammonia concentration caused by CTLN2. Thus, our results suggest that expression of Ndt1 protein in mammal cells recovers the mitochondrial metabolism and glycolytic activity in CTLN2 cells but does not improve urea cycle and reduce ammonia concentration.

Keywords: Citrullinemia, Mitochondria, Citrin, Mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide transporter, *Aspergillus fumigatus*.

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Ciclo da ureia	35
Figura 2.	Lançadeira malato-aspartato	38
Figura 3.	Representação esquemática da cadeia transportadora de	
	elétrons clássica	40
Figura 4.	Componentes da cadeia transportadora de elétrons, via	
	clássica e alternativa	41
Figura 5.	Via <i>de novo</i> e <i>salvage</i> de síntese de NAD ⁺	43
Figura 6.	RNA total extraído de A. fumigatus após o tratamento com	
	a DNase	61
Figura 7.	Produto de PCR obtido após amplificação do gene ndt1	
	de A. fumigatus a partir do cDNA	62
Figura 8.	Produto da PCR de colônia após transformação das	
	bactérias com a construção <i>ndt1/</i> pDONR	62
Figura 9.	Alinhamento das sequências nucleotídicas do gene ndt1	
	clonado em vetor pDNOR e do cDNA do gene <i>ndt1</i> de A.	
	fumigatus	63
Figura 10.	Produtos da PCR de colônia após a transformação das	
	bactérias com a construção <i>ndt1</i> /pcDNA	68
Figura 11.	RNA total extraído das células HEK293 após o tratamento	
	com a DNase	69
Figura 12.	Análise da expressão relativa do gene SLC25A13 nas	
	diferentes linhagens: HEK293, shControle e sh	70

Figura 13.	Análise do Western blot de mitocôndria isolada das	
	linhagens HEK293, shControle e sh	70
Figura 14.	Análise do Western blot do extrato proteico total das	
	linhagens obtidas	71
Figura 15.	Análise do Western blot de mitocôndria isolada das	
	linhagens obtidas	72
Figura 16.	Microscopia confocal das linhagens obtidas	73
Figura 17.	Alinhamento das sequências de aminoácidos das	
	proteínas Ndt1 de <i>A. fumigatus</i> , citrina isoforma 1 e	
	isoforma 2	75
Figura 18.	Modelagem estrutural das proteínas citrina isoformas 1 e	
	2, e Ndt1, utilizando o software Phyre2	77
Figura 19.	Concentração de NAD+, NADH e razão NADH/NAD+	
	celular total	79
Figura 20.	Concentração de NAD+, NADH e razão NADH/NAD+ em	
	mitocôndrias isoladas	81
Figura 21.	OCR em células com deficiência da citrina e expressando	
	a proteína Ndt1	83
Figura 22.	OCR em células com deficiência da citrina e expressando	
	a proteína Ndt1, suplementação com piruvato 2 mM	85
Figura 23.	OCR em células com deficiência da citrina e expressando	
	a proteína Ndt1, suplementação com aspartato 2 mM	87
Figura 24.	OCR em células com deficiência da citrina e expressando	
	a proteína Ndt1, suplementação com arginina 2 mM	89

- Figura 38. OCR em células shC/Controle e shC/Ndt1..... 144
- Figura 39. OCR em células shC/Controle e shC/Ndt1, suplementação com piruvato 2 mM...... 145
- Figura 41. OCR em células shC/Controle e shC/Ndt1, suplementação com arginina 2 mM...... 147
- Figura 42. ECAR em células com shC/Controle e shC/Ndt1..... 148
- Figura 43. ECAR em células com shC/Controle e shC/Ndt1, suplementação com piruvato 2 mM...... 149

Figura 45.	ECAR em células com shC/Controle e shC/Ndt1,
	suplementação com arginina 2 mM 151
Figura 46.	Concentração de lactato extracelular em células
	shC/Controle e shC/Ndt1 152
Figura 47.	Concentração de lactato extracelular em células com
	shC/Controle e shC/Ndt1, suplementação com aspartato
	ou arginina 153
Figura 48.	Concentração de ureia extracelular em células
	shC/Controle e shC/Ndt1 em meio de cultura com glicose
	5 mM 154
Figura 49.	Concentração de ureia extracelular em células com
	shC/Controle e shC/Ndt1 em meio de cultura com glicose
	25 mM 155
Figura 50.	Concentração de amônia intracelular em células com
	shC/Controle e shC/Ndt1 em meio de cultura com glicose
	5 mM 156
Figura 51.	Concentração de amônia intracelular em células
	shC/Controle e shC/Ndt1 em meio de cultura com glicose
	25 mM 157
Figura 52.	Mapa do vetor pDONR/Zeo
	(Invitrogen)

Figura 53. Mapa do vetor pcDNA3.1/nV5-DEST™ (Invitrogen)...... 163

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Alinhamento das sequências nucleotídicas do gene ndt1					
	clonado e da sequência depositado no banco de dados					
	GenBank,	com	а	dedução	dos	
	aminoácidos					65
Tabela 2. Linhagens células obtidas nesse trabalho					74	

Lista de Abreviaturas e Siglas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-DG 2-deoxiglicose 2-DG-P 2-deoxiglicose-fosforilada AA Antimicina A ADP Adenosina 5'-difosfato AGC Transportador aspartato-glutamato AOX **Oxidase Alternativa** ATP Adenosina 5'-trifosfato att Attachment AVC Acidente Vascular Cerebral BHAM Ácido benzohidroxâmico BSA Albumina de soro bovino CCCP Carbonil cianeto 3-clorofenilhidrazona cDNA **DNA** complementar CO_2 Dióxido de Carbono CTLN1 Citrulinemia do tipo 1 CTLN2 Citrulinemia do tipo 2 Dulbecco's Modified Eagle's Medium DMEM DMSO Dimetilsufóxido Ácido desoxirribonucleico DNA dNTPs Desoxirribonucleotídeos ECAR Taxa de Acidificação Extracelular **EROs** Espécies Reativas de Oxigênio FCCP Carbonil cianeto p-trifluorometoxifenilhidrazona GFP Proteína Verde Fluorescente GPI Glicose-6-fosfato isomerase H+ Próton Н Hora **HEK293** Human Embryonic kidney 293 (Embrionária de Rim Humana) kDa **Kilo Daltons**

LB Lu	ıria Bertani
-------	--------------

- LHON Neuropatia óptica hereditária de Leber
- MELAS Encefalopatia mitocondrial com ácido lático e episódios tipo AVC
- MERRF Epilepsia mioclônica com ragger red fibers
- METS *Mitochondrial Energy Transfer Signature* (Assinatura de Transferência de Energia Mitocondrial)
- MOI Multiplicidade de infecção
- NAD⁺ Nicotinamida adenina dinucleotídeo
- NADH Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
- NADPH Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
- NaMN Ácido nicotínico mononucleotídeo
- Nde NADH desidrogenase alternativa externa
- Ndi NADH desidrogenase alternativa interna
- Ndt1 Transportador mitocondrial de nicotinamida adenina dinucleotídeo
- NICCD Colestase intra-hepática neonatal
- OAA Oxaloacetato
- OCR Taxa de Consumo de Oxigênio
- Oligo Oligomicina
- ORNT1 Ornitina translocase 1
- p/v Relação peso/volume
- pb pares de base
- PBS Tampão salina fosfato
- PCR Reação em Cadeia da Polimerase
- PVDF Fluoreto de polivinilideno
- qRT-PCR PCR quantitativo em tempo real
- RNA Ácido ribonucleico
- RNAi RNA de interferência
- Rot Rotenona
- rpm Rotação por minuto
- SDS Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS
SHAM	Ácido salicil hidroxâmico
shRNA	short hairpin RNA
Sir2	Silent Information Regulator
siRNA	small interference RNA (pequena molécula de interferência de RNA
SIRT	Sirtuína
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TBS	Tampão salina Tris
TBS-T	Tampão salina Tris com Tween 20
ТСА	Ciclo do Ácido Tricarboxílico
UCP	Proteína desacopladora
UV	Ultravioleta
VDAC	Canal de ânion dependente de voltagem
v/v	Relação volume/volume
Zeo	Zeocina

Lista de Símbolos

LISTA DE SÍMBOLOS

- R Marca registrada
- °C Graus Celsius
- g Força da gravidade
- Hz Hertz
- mA Miliampere
- mV Milivolts
- ∞ Vazio
- ™ Trademark
- U Unidade
- V Volts

 $\Delta ndt1\Delta ndt2$ Cepa duplo mutante dos genes *ndt1* e *ndt2* de S. cerevisiae

- Δp Gradiente eletroquímico de prótons
- ΔpH Diferença de pH
- Δψ Potencial elétrico de membrana

Sumário

SUMÁRIO

Re	sumo		i
Ab	stract		ii
Lis	ta de fig	juras	iii
Lis	ta de ta	belas	iv
Lis	ta de ab	previaturas e siglas	v
Lis	ta de sí	mbolos	vi
1.	INTRO	DUÇÃO	34
	1.1.	Citrulinemia	34
	1.2.	Mitocôndria	38
	1.3.	Transportador mitocondrial de nicotinamida adenina dinucleotídeo (Ndt1)	42
	1.4.	Expressão heteróloga de componentes mitocondriais	44
2.	OBJE		48
	2.1.	Objetivos Específicos	48
3.	MATE	RIAIS E MÉTODOS	50
	3.1.	Microrganismos	50
		3.1.1. A. fumigatus	50
		3.1.2. Escherichia coli	50
	3.2.	Extração de RNA e síntese de cDNA	50
	3.3.	Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (primers)	51
	3.4.	Reação em cadeia da polimerase (PCR)	51
	3.5.	Eletroforese em gel de agarose	51
	3.6.	Clonagem em vetor pDONR™/Zeo	52
	3.7.	Preparo de células de <i>E. coli</i> competentes	52
	3.8.	Transformação de células de <i>E. coli</i> competentes	52
	3.9.	PCR de colônia	53
	3.10.	Sequenciamento de DNA	53
	3.11.	Clonagem em vetor pcDNA3.1 para expressão em células de	
		mamífero	53
	3.12.	Cultura de células	54

	3.13.	short hai	irpin RNA (shRNA) do gene SLC25A13 em células	
		HEK293.		54
	3.14.	Confirma	ção da redução da expressão do gene SLC25A13	
		por qRT-	PCR	55
	3.15.	Transfec	ção do gene ndt1 de A. fumigatus em células	
		HEK293.		55
	3.16.	Western	blot	55
	3.17.	Microsco	pia confocal	56
	3.18.	Quantific	ação de NADH, NAD⁺ e razão NADH/NAD⁺	57
	3.19.	Determin	nação da taxa de consumo de oxigênio (OCR) e taxa	
		de acidifi	cação extracelular (ECAR)	57
	3.20.	Determin	nação da concentração de lactato	58
	3.21.	Determin	nação da concentração de ureia extracelular	58
	3.22.	Determin	nação da concentração de amônia intracelular	58
	3.23.	Análise e	estrutural das proteínas	59
	3.24.	Análise e	estatística	59
4.	RESU	LTADOS		61
	4.1.	Clonager	m do gene <i>ndt1</i> de <i>A. fumigatus</i> em vetor de	
		expressã	o de células de mamíferos	61
	4.2. Knockdown do gene SLC25A13 utilizando shRNA em células			
	HEK293			68
	4.3.	Expressâ	ão heteróloga da proteína Ndt1 de <i>A. fumigatus</i> em	
		células H	IEK293 e HEK293 com deficiência da citrina	70
	4.4.	Similarid	ades entre as proteínas citrina e Ndt1	74
	4.5.	Análise c	lo metabolismo celular	78
		4.5.1	Determinação das concentrações celulares e	
			mitocondrial de NADH, NAD ⁺ e, razão NADH/NAD ⁺	78
		4.5.2	Determinação do metabolismo oxidativo	81
		4.5.3	Análise das concentrações de ureia e amônia	103
5.	DISCU	ISSÃO		110
	51	Expressão	heteróloga da proteína Ndt1 e <i>knockdown</i> do gene	
	0.1.	Exproduce		

	5.2.	Caracterização metabólica das células HEK293 expressando			
		a proteína	Ndt1 e com deficiência da citrina	115	
6.	CONC	LUSÃO		121	
7.	REFE	RÊNCIAS	BIBLIOGRÁFICAS	123	
8.	APÊN	IDICES		144	
	8.1.	OCR, EC	CAR e concentração de lactato das linhagens		
		shC/Cont	role e shC/Ndt1	144	
	8.2.	Concentra	ação de ureia e amônia das linhagens shC/Controle		
		e shC/Nd	1	153	
	8.3.	Meios de	cultivo	158	
		8.3.1.	YG	158	
		8.3.2. I	LB (Lúria Bertani)	158	
		8.3.3.	SOC	158	
		8.3.4.	ТВ	159	
	8.4.	 Soluções, tampões e reagentes 			
		8.4.1.	PBS	159	
		8.4.2.	TAE	159	
		8.4.3.	Tampão de amostra de DNA	160	
		8.4.4.	Tampão de amostra para SDS-PAGE	160	
		8.4.5.	SDS-PAGE	160	
		8.4.6.	Tampão de corrida Tris-Glicina pH 8,3	161	
		8.4.7.	Tampão de transferência	161	
		8.4.8.	TBS-T	161	
9.	ANEX	OS		163	
	9.1.	Mapas de Vetores 1			

1 - Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Citrulinemia

Em 1962, McMurray e colaboradores descreveram pela primeira vez a citrulinemia, os quais evidenciaram aminoacidúria em indivíduos com desordens neurológicas. Através da análise do perfil cromatográfico observaram um aumento de citrulina na urina e no sangue desses indivíduos. A citrulinemia é uma disfunção metabólica caracterizada principalmente por hiperamonemia e acúmulo de citrulina nos fluidos corporais (Saheki e Kobayashi, 2002), essa doença também é classificada como uma desordem do ciclo da ureia.

O ciclo da ureia é uma via de excreção final de nitrogênio em mamíferos. A ureia apresenta baixa toxicidade aos indivíduos mesmo em altas concentrações, enquanto, a amônia, seu precursor é altamente tóxico (Leonard e Morris, 2002). O ciclo da ureia foi descrito por Hans Krebs e foi o primeiro ciclo biológico descoberto, e ajudou a estabelecer o conceito para a descoberta do ciclo do ácido tricarboxílico [(TCA) Krebs, 1932]. O ciclo da ureia (Figura 1) é muito parecido com o ciclo TCA, possui poucos intermediários, sendo que os quatro intermediários formados são todos α -aminoácidos e três desses não são encontrados em proteínas, são eles: ornitina, citrulina e argininosuccinato (Krebs, 1932; Watford, 2003). A deficiência ou ausência total de atividade das enzimas do ciclo da ureia leva ao acúmulo de amônia e outros metabólitos nos primeiros dias de vida humanos (Summar, 2001). Entretanto, existem outras proteínas que regulam o ciclo da ureia como a ornitina translocase (ORNT1) e citrina, ambos transportadores mitocondriais, os quais têm sido relacionados a desordens no ciclo da ureia, devido a deficiência desses transportadores.



Figura 1. Ciclo da ureia. Adaptado de Blair, Cremer e Tchan, 2015.

A citrulinemia pode ser classificada em três tipos, dependendo do gene envolvido e da idade de início da doença. A citrulinemia do tipo 1 (CTLN1) ou citrulinemia clássica é caracterizada pela deficiência de uma enzima do ciclo da ureia no fígado, a enzima argininosuccinato sintase, que converte citrulina е aspartato em argininosuccinato. Esse tipo de citrulinemia ocorre nos primeiros dias de vida. A deficiência total dessa enzima resulta em altos níveis de citrulina, que pode causar hiperamonemia neonatal e ser fatal para os indivíduos acometidos. A deficiência parcial da enzima resulta em quadros patológicos mais brandos, sendo que alguns pacientes são assintomáticos e outros apresentam apenas episódios repetidos e atenuados de hiperamonemia. A hiperamonemia leve ou crônica pode prejudicar o desenvolvimento intelectual dos indivíduos (Crombez e Cederbaum, 2007).

A colestase intra-hepática neonatal (NICCD), é um tipo de citrulinemia. Causada pela deficiência do transportador citrina e ocorre em recém-nascidos ou crianças. As apresentações clínicas de NICCD em crianças com idade inferior a um ano são diversas, tais como a colestase intra-hepática transitória, hepatomegalia, histórico de baixo peso ao nascer, restrição no crescimento, hipoproteinemia, disfunção hepática variável. NICCD não é grave, os sintomas geralmente desaparecem após um ano do início do tratamento (Tamamori *et al.*, 2002; Saheki e Song, 2005; Miyazaki *et al.*, 2018).

A citrulinemia do tipo 2 (CTLN2) afeta principalmente adultos de 20 a 50 anos, também é chamada de citrulinemia do tipo 2 de início tardio. A manifestação mais frequente é a hiperamonemia que causa sintomas neurológicos como desorientação, delírios, anormalidade comportamental como agressividade, irritação e hiperatividade; sonolência; perda de memória; tremores agudos; convulsões; coma, podendo evoluir para edema cerebral e morte (Saheki *et al.*, 2004). Os sintomas surgem após o uso de álcool, medicação ou cirurgia, principalmente. Alguns indivíduos que apresentaram NICCD após os 20 anos podem apresentar CTLN2 com graves sintomas neurológicos. Normalmente, ocorre uma fase de transição gradual após a NICCD até o início da CTLN2, no entanto, os sintomas de CTLN2 quando surgem são repentinos (Sakehi e Kobayashi, 2002; Saheki e Song, 2005; Miyazaki *et al.*, 2018).

CTLN2 é mais frequente na população japonesa, onde a estimativa é que ocorra 1:100.000-230.000 indivíduos nascidos. Nos últimos anos, outras populações do leste asiático, Oriente Médio, Estados Unidos e Reino Unido têm sido diagnosticadas com essa doença, tornando-a assim uma doença com distribuição pan-étnica (Lu *et al.*, 2005; Dimmock *et al.*, 2007; Palmieri, 2008; Song *et al.*, 2011; Kikuchi *et al.*, 2012; Woo, Park e Lee, 2014).

A CTLN2 é uma doença autossômica recessiva, causada por mutações no gene *SLC25A13*. Este gene possui 160 kb e 18 éxons e está localizado no cromossomo 7q21.3. *SLC25A13* codifica uma proteína denominada citrina que faz parte da família de transportador de solutos 25 (lançadeira malato-aspartato), sendo o membro 13 (Hayasaka *et al.*, 2018). A citrina possui 675 aminoácidos e peso molecular calculado de aproximadamente 74 kDa. A estrutura da citrina possui aproximadamente 78% de identidade com a proteína aralar, presente principalmente no cérebro e descrita inicialmente por Del Arco e colaboradores (1998 e 2000).

Palmieri e colaboradores (2001) identificaram a citrina e aralar como isoformas do transportador de aspartato glutamato (AGC). Este transportador é um componente da lançadeira malato-aspartato, a qual é um importante transportador de equivalentes redutores para a mitocôndria na forma de NADH. A citrina transporta citrulina da mitocôndria para o citosol. A citrulina e o aspartato são utilizados para síntese de ureia a partir da amônia (Williamson, 1976) e alanina. Dessa forma, a deficiência da citrina causa uma redução da concentração de citrulina e aspartato no citosol, acúmulo de amônia na mitocôndria e bloqueio da síntese de ureia (Figura 1). Além disso, a deficiência da citrina causa alteração na lançadeira malato-aspartato e pode levar a
um aumento da razão NADH/NAD⁺ citosólica, causando inibição da glicólise e gliconeogênese, pode também prejudicar o metabolismo de álcool e a lipogênese (Rabier e Kamoun, 1995; Saheki e Kobayashi, 2002; Hayasaka *et al.*, 2018) (Figura 2).

O NAD⁺ e seus derivados apresentam um papel central como modulador do metabolismo energético celular. A manutenção das concentrações de NAD⁺ e suas isoformas é importante para a manutenção do metabolismo energético e das funções celulares (Ying, 2008; Di Stefano e Conforti, 2013). Em mamíferos, o NADH é capaz de atravessar a membrana mitocondrial externa (Iwata *et al.*, 1998). Entretanto, a membrana mitocondrial interna é impermeável a entrada de NAD⁺ e NADH produzidos no citosol (Bonitz *et al.*, 1982). A entrada de moléculas hidrofílicas pela membrana interna é catalisada por uma família de proteínas codificadas no núcleo e denominadas de transportadores mitocondriais, as moléculas transportadas por essa família de proteínas são muito variadas em tamanho e estrutura (Palmieri *et al.*, 2011). Dessa forma, a lançadeira malato-aspartato é a principal responsável pelas alterações na relação NAD⁺/NADH em mamíferos.

No citosol, equivalentes redutores de NADH são transferidos para oxalacetato (OAA) produzindo malato, essa reação é catalisada pela enzima malato desidrogenase citosólica e forma NAD⁺. O malato é transportado para a matriz mitocondrial na troca com α -cetoglutarato, pelo transportador malato- α -cetoglutarato. Na matriz mitocondrial, o malato é oxidado pela malato desidrogenase mitocondrial formando OAA e NADH. O NADH pode transferir elétrons para a cadeia respiratória, enquanto, o OAA é convertido para aspartato pela transaminação com glutamato através da aspartato aminotransferase mitocondrial. O aspartato sai da mitocôndria através do AGC em uma troca eletrogênica por glutamato e um próton. O aspartato citosólico é convertido para OAA pela transaminação com α -cetoglutarato através da enzima aspartato aminotransferase citosólica, completando o transporte (Bakker *et al.*, 2001; McKenna *et al.*, 2006) (Figura 2).

Para que ocorra glicólise aeróbica o NADH citosólico deve ser oxidado através da participação da lançadeira malato-aspartato. A citrina também participa da glicólise aeróbica, uma vez que essa proteína transporta NADH do citosol para mitocôndria como um membro da lançadeira malato-aspartato (Saheki *et al.*, 2002; Saheki e Kobayashi, 2002).



Figura 2. Lançadeira malato-aspartato. Mal – malato; OAA – oxaloacetato; Pyr – piruvato; G3P- glicerol-3-fosfato; DHAP – diidroxiacetona fosfato; Glu – glutamato; Asp – aspartato; αKG – α-cetoglutarato; AGC – transportador de aspartato-glutamato; OMC – transportador de oxoglutarato-malato; cMDH e mMDH – malato desidrogenase citosólica e mitocondrial; cGPDH e mGPDH – glicerofosfato desidrogenase citosólica e mitocondrial; cyt – citosol; mit – mitocôndria; IM – membrana mitocondrial interna. Adaptado de Saheki e Kobayashi, 2002.

1.2. Mitocôndria

Lynn Margulis propôs a teoria endossimbiótica das organelas (Margulis, 1967), onde a mitocôndria teria se originado de uma endossimbiose de uma α-protobactéria, um ancestral das células eucarióticas, ocorrido a cerca de 2 bilhões de anos. Essa organela de origem bacteriana foi tolerada e atua como regulador central em inúmeras funções celulares (Archibald, 2015).

A mitocôndria é a organela celular responsável, através da fosforilação oxidativa, pela síntese de aproximadamente 95% do ATP necessário à manutenção da estrutura e função das células (Hatefi, 1985). Além de ser a principal fonte de energia celular, a mitocôndria está relacionada com a produção de espécies reativas de oxigênio [EROs; (Bertero e Maack, 2018)], captação de cálcio (Vercesi *et al.*, 2018), apoptose e autofagia (Hadj-Moussa, Green e Storey, 2018; Farmer, Naslavsky e Caplan, 2018) e como reguladora de células imunológicas (Meyer *et al.*, 2018).

Na mitocôndria ocorre a interconversão da energia redox livre proveniente da oxidação dos substratos respiratórios em energia química, na forma de ATP (Mitchell, 1961). A energização das mitocôndrias, com substratos respiratórios gera um gradiente eletroquímico de prótons (Δp), cujo potencial elétrico de membrana ($\Delta \Psi$) é

de 0,1 a 0,2 V (negativo na matriz) e cuja diferença de pH (∆pH) é de uma unidade (alcalino na matriz). Em mamíferos, o sistema responsável pela fosforilação oxidativa, na membrana mitocondrial interna, é formado por cinco complexos enzimáticos que incluem a cadeia respiratória (complexo I-IV) e a FoF1-ATP sintetase (complexo V). Durante a fosforilação oxidativa, os elétrons são removidos dos substratos oxidáveis pela ação de desidrogenases específicas, ligadas a NADH (substratos de sítio I), e transferidos à cadeia respiratória com subsequente redução do oxigênio molecular. Os equivalentes redutores são transferidos inicialmente a NADH desidrogenase mitocondrial (complexo I). O succinato (substrato de complexo II) é oxidado pela succinato desidrogenase ligada a FAD (complexo II). Os complexos I e II transferem seus elétrons a ubiquinona (UQ), sendo os mesmos transferidos sequencialmente aos complexos III, citocromo c, complexo IV e finalmente ao oxigênio, com formação de água. Os elétrons originados da beta oxidação de ácidos graxos são transferidos à cadeia respiratória através da ubiquinona (Boyer et al., 1977; Hatefi, 1985; Lehninger et al., 1993). De acordo com a hipótese quimiosmótica de Mitchell em associação com a do acoplamento conformacional de Boyer, o fluxo de elétrons através dos complexos I, III e IV são acompanhados do bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, gerando um gradiente eletroquímico de H⁺. A energia livre liberada no retorno do H⁺ à matriz mitocondrial induz alteração conformacional do componente F1 da FoF1-ATP sintetase (complexo V), liberando o ATP formado em seus sítios catalíticos (Mitchell, 1961; Boyer et al., 1977) (Figura 3).



Figura 3. Representação esquemática da cadeia transportadora de elétrons clássica. MME – membrana mitocondrial externa; MMI – membrana mitocondrial interna; Cit c – citocromo c; UQ – ubiquinona; I – complexo I; II – complexo II; III – complexo III; IV – complexo IV; V – complexo V. Adaptado de Mitchell, 1961.

Fungos, leveduras, plantas e protozoários possuem além da cadeia respiratória clássica, uma proteína desacopladora, a qual pode ser encontrada na maioria dos organismos (Rasmusson e Müller, 2006) e componentes alternativos. A via alternativa está ausente em células de mamíferos. A mitocôndria de *A. fumigatus* foi caracterizada em nosso laboratório, demonstrando a presença de complexos I-V, cadeia respiratória clássica, uma proteína desacopladora (UCP) e a presença da via alternativa (Figura 4): uma NADH-desidrogenase alternativa interna e outra externa, e uma oxidase alternativa mitocondrial (AOX) (Tudella *et al.*, 2004; Martins *et al.*, 2011).



Figura 4. Componentes da cadeia transportadora de elétrons, via clássica e alternativa. I – Complexo I; NDE – NAD(P)H desidrogenase alternativa externa; NDI – NAD(P)H desidrogenase alternativa interna; II – Complexo II; UQ – ubiquinona; AOX – oxidase alternativa; III – Complexo III; Cit c – citocromo c; IV – Complexo IV; V – Complexo V; UCP – proteína desacopladora. Adaptado de Mitchell, 1961 e de Rasmusson e Müller, 2006.

As NADH desidrogenases alternativas foram descritas em mitocôndrias de plantas e fungos, catalisando a mesma reação redox do complexo I da via clássica. Essas enzimas transferem o elétron do NADH presente na matriz mitocondrial diretamente para a ubiquinona, porém sem o bombeamento de prótons. Além da presença da NADH desidrogenase voltada para a face interna da membrana mitocondrial interna (Ndi), fungos e plantas podem apresentar uma ou duas NADH desidrogenase alternativa voltadas para a face externa da membrana mitocondrial (Nde). Essa enzima por sua vez, catalisa a transferência de elétrons do NAD(P)H presente no espaço intermembranas para a ubiquinona, contornando novamente o complexo I. As NADH desidrogenase alternativas são insensíveis a rotenona, inibidor clássico do complexo I, mas sensíveis à flavona (Kerscher, 2000; Martins *et al.*, 2011).

A presença da AOX, uma ubiquinol oxidase resistente ao cianeto faz com que essa enzima atue como aceptora final de elétrons. A AOX recebe os elétrons provenientes da ubiquinona e os transfere para o oxigênio, reduzindo até água. A oxidase alternativa é inibida por ácido salicilhidroxâmico (SHAM) e ácido benzilhidroxâmico (BHAM), porém, resistente ao cianeto, inibidor clássico do complexo IV (Moore e Siedow, 1991; Magnani *et* al, 2007; Martins *et al*, 2011). As UCPs são uma classe de proteínas transportadoras de ânions, localizadas na membrana mitocondrial interna. Essas proteínas estão presentes em mitocôndrias de tecido adiposo marrom e de alguns tecidos não-termogênicos em mamíferos, plantas, fungos e protozoários (Ricquier e Bouillaud, 2000; Jarmuszkiewicz *et al.*, 1999; Uyemura *et al.*, 1999; Jarmuszkiewicz *et al.*, 2002; Jarmuskiewicz *et al.*, 2000; Cavalheiro *et al.*, 2004; Tudella *et al.*, 2004; Luévano-Martinez *et al.*, 2010). As UCPs, como proteínas transportadoras de ânions dissipam o gradiente eletroquímico de prótons gerado pela cadeia de transporte de elétrons, sem que ocorra a passagem pelo complexo V. A UCP1 após dissipar o gradiente de prótons produz calor ao invés de ATP. Essas proteínas são ativadas por ácidos graxos e sensíveis a nucleotídeos de purina (Jarmuszkiewicz *et al.*, 2010; Martins *et al.*, 2011).

As mitocôndrias além de possuírem papel central no metabolismo energético, são as principais fontes de espécies reativas de oxigênio (EROs) durante o transporte de elétrons na cadeia respiratória pode ocorrer o escape de elétrons principalmente através do complexo I e III (Vercesi et al., 1997; Kowaltowski et al., 2009). As EROs possuem um papel importante em mecanismos fisiológicos de morte celular e sinalização celular. Essas vias integram completamente os compartimentos celulares e a mitocôndria para uma rápida resposta ativando uma via de sinalização citosólica e, finalmente alterando a expressão gênica no núcleo celular (Yun e Finkel, 2014). Dessa forma, alterações na função mitocondrial têm sido associado a diversos processos fisio-patológicos, como Alzheimer, Parkinson, câncer, doenças neurodegenerativas, diabetes, além de atuar também na obesidade e envelhecimento (Finkel e Holbrook, 2000; Wallace, 2005; Amigo et al., 2016; Macdonald et al., 2018; Silzer e Phillips, 2018; Larsen, Hanss e Krüger, 2018; Anderson, Ghiraldeli e Pardee, 2018; de Mello et al., 2018; Panel, Ghaleh e Morin, 2018).

1.3. Transportador mitocondrial de nicotinamida adenina dinucleotídeo (Ndt1)

A mitocôndria possui em sua matriz, a coenzima NADH, a qual transfere o hidrogênio do substrato para a cadeia respiratória. O NAD⁺ pode estar envolvido em funções regulatórias críticas na transcrição, atividade enzimática e outros importantes processos como ADP-ribosilação e reações de desacetilação (Herrero-Yraola *et al.*, 2001; Onyango *et al.*, 2002; Du *et al.*, 2003). Além disso, o NAD⁺ é um substrato das sirtuínas (SIRT/Sir2, **S**ilent Information **R**egulator), que pertencem a um grupo de deacetilases NAD⁺ dependentes. Estas enzimas removem grupos acetil dos resíduos

de lisina em histonas, microtúbulos e outras proteínas, modulando assim inúmeros eventos celulares (Lin, Kwan e Dutcher, 2010).

As enzimas envolvidas na biossíntese de NAD⁺ estão localizadas fora da mitocôndria (Anderson *et al.*, 2002; *Ya*ng *et al.*, 2003). A via de biossíntese de NAD⁺ foi caracterizada em procariotos (Penfound e Foster, 1996) e em leveduras (Lin e Guarante, 2003; Denu, 2003). Em procariotos e eucariotos inferiores, o NAD⁺ é sintetizado pela via *de novo* do ácido quinolínico e pela via do ácido nicotínico, denominada via *salvage* (Penfound e Foster, 1996). A via *de novo* inicia-se a partir do triptofano, o qual é convertido a ácido nicotínico mononucleotídeo (NaMN) através de seis reações enzimáticas e uma não enzimática. O NaMN converge para a via *salvage* e sofre a ação de duas nicotinamidase formando NAD⁺ (Figura 5). Uma vez sintetizado no citosol, o NAD⁺ deve ser importado para o interior da mitocôndria.



Figura 5. Via *de novo* e *salvage* de síntese de NAD⁺. Npt – ácido nicotínico fosforibosiltransferase; NaMN – ácido nicotínico mononucleotídeo; Nmnat – nicotinamida mononucleotídeo adenililtrasnferase; NMN – nicotinamida mononucleotídeo; iNAMPT – intracelular nicotinamida fosforibosil-transferase; NMNAM – n-metilnicotinamida; Nnmt – nicotinamida n-metiltransferase. Adaptado de Wakino, Hasegawa e Itoh, 2015.

Em mamíferos, as alterações na relação NADH/NAD⁺ ocorrem principalmente através da lançadeira malato-aspartato, essa lançadeira é encontrada em inúmeros

tecidos como fígado, rim, coração, cérebro e células β-pancreáticas (Nielsen *et al.*, 2011).

Em fungos, leveduras e plantas, o NADH citosólico pode sofrer oxidação pelas NADH desidrogenases alternativas externas (Martins *et al.*, 2011), e os elétrons são transferidos para a cadeia respiratória. Além disso, estudos identificaram e caracterizaram duas isoformas de proteína transportadora mitocondrial de NAD⁺ (Ndt1 e Ndt2) em *Sacharomyces cerevisiae* [(S. cerevisiae) Todisco *et al.*, 2006] e em *Arabidopsis thaliana* [(*A.* thaliana) Palmieri *et al.*, 2009] capazes de transportar esses componentes. Estas proteínas possuem massa molecular de aproximadamente 42 e 37,5 kDa para Ndt1 e Ndt2, respectivamente. Os estudos em duplos mutantes *Δndt1Δndt2* de *S. cerevisiae* mostrou um severo atraso no crescimento destes mutantes em fontes de carbono não fermentáveis (Todisco *et al.*, 2006).

Estudos prévios em nosso laboratório foi observado que em mitocôndrias de Paracoccidioides brasiliensis (P. brasiliensis), o NAD⁺ também induzia a formação de potencial de membrana mitocondrial (Martins *et al.*, 2008), o qual podia ser dissipado por FCCP, sugerindo a presença de um transportador de NAD⁺, conforme havia sido descrito em S. cerevisiae. Balico e colaboradores (2017) demonstraram que uma sequência no genoma de A. fumigatus, que possui 32% de identidade com o gene do transportador mitocondrial de nicotinamida adenina dinucleotídeo (ndt1) de S. cerevisiae, apresenta a mesma função bioquímica das proteínas Ndt1 de S. cerevisiae e A. thaliana. Através da expressão heteróloga em S. cerevisiae foi confirmado que a proteína Ndt1 de A. fumigatus foi capaz de gerar potencial de membrana mitocondrial na presença de NAD⁺, bem como transportar o NAD⁺ exógeno para a matriz mitocondrial, em experimentos utilizando mitocôndrias isoladas. Além disso, essa proteína apresentou um papel importante no crescimento e síntese da parede celular das leveduras. Dessa forma, a entrada de NAD⁺ do citosol para a mitocôndria por diferentes mecanismos tem sido atribuído como uma forma de resistência dos microrganismos em diferentes ambientes hostis (Amora et al., 2000; Calegario et al., 2003; Hanging et al., 2010; Kimura et al., 2010).

1.4. Expressão heteróloga de componentes mitocondriais

As alterações na fosforilação oxidativa decorrentes de deleções ou mutações em genes que codificam proteínas de diferentes vias mitocondriais têm sido descritas

como causa de inúmeras doenças degenerativas, câncer e envelhecimento (Wallace, 1999; Palmieri, 2008; Schon *et al.*, 2010).

As desordens ligadas a erros inatos do metabolismo envolvendo o sistema de fosforilação oxidativa representam uma incidência de 1 em 5.000 nascimentos (Thorburn, 2004). Estas desordens resultam em uma grande variedade de fenótipos clínicos que podem iniciar durante a infância ou na fase adulta. Diferentes órgãos ou tecidos podem ser afetados, especialmente, cérebro, coração e músculo esquelético, os quais utilizam intensamente a fosforilação oxidativa para produção de ATP. Dentre as principais deficiências, as disfunções no complexo I está associado com múltiplas patologias como a neuropatia óptica hereditária de Leber (LHON), Síndrome de Leigh, encefalopatia mitocondrial com acidose lática e episódios tipo AVC (MELAS), Epilepsia mioclônica com *ragged red fibers* (MERRF), e inclui também as doenças neurodegenerativas como Parkinson (Manickam, Michael e Ramasamy, 2017; Baertling *et al.*, 2017; David *et al.*, 2017; Naini *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2017).

As terapias utilizadas no tratamento dessas doenças apresentam uma eficiência moderada (Wallace, 2005). Desta forma, encontrar estratégias capazes de reverter essas síndromes tem sido discutida. Na última década, tem se demonstrado a possibilidade de substituição de alguma subunidade de componentes da cadeia respiratória que sofreu alterações por uma subunidade "selvagem", denominado de expressão heteróloga trans-reino. Nesse caso, realiza-se a expressão heteróloga em células humanas de subunidades dos componentes da cadeia respiratória ou outras proteínas mitocondriais provenientes de fungos e plantas.

A expressão da NADH desidrogenase alternativa interna 1 (NDI1) de *S. cerevisiae* em células de mamíferos pode corrigir deficiências no complexo I (Yagi *et al.*, 2006; Yagi *et al.*, 2006; Seo *et al.*, 2006; Marella *et al.*, 2008; Marella *et al.*, 2009). Essa proteína também recuperou o metabolismo de células com mutações que causam neuropatia óptica hereditária de Leber (Park, Li e Bai, 2007). Além disso, a expressão dessa proteína em camundongos não causou resposta imunológica (Marella *et al.*, 2011).

Outra proteína que tem sido estudada utilizando estratégias semelhantes é a AOX, uma proteína encontrada em plantas, protozoários e fungos, a qual também tem sido expressa em linhagens celulares de mamíferos que possuem alguma deficiência do citocromo *c* oxidase (Dassa e*t al.*, 2008; Perales-Clemente *et al.*, 2008; El-Khoury *et al.*, 2013) tentando dessa forma, restaurar a atividade da cadeia respiratória. O estudo dessas proteínas mitocondriais ainda tem um alto e inexplorado interesse, uma vez que, as mesmas têm mostrado reverter alterações da função mitocondrial e restaurar a cadeia transportadora de elétrons. Assim, compreender a contribuição desses componentes mitocondriais para o metabolismo das células pode ser essencial para avaliar o seu papel nas doenças que causam alteração da bioenergética mitocondrial em humanos. Dessa forma, a expressão do transportador Ndt1 pode contribuir com a melhora no metabolismo das células com citrulinemia, uma vez que o NAD⁺ transportado para as mitocôndrias seria utilizado pelo ciclo de Krebs para sintetizar NADH e este seria utilizado pela cadeira respiratória para geração de ATP.

2 - Objetivos

2. OBJETIVOS

Clonar e expressar o gene do transportador mitocondrial de nicotinamida adenina dinucleotídeo (*ndt1*) de *A. fumigatus* para correção da deficiência da citrina em células *human embryonic kidney 293* (HEK293, célula embrionária de rim humano), modelo de CTLN2.

2.1. Objetivos específicos

- Obtenção do modelo de CTLN2 em células HEK293;
- Construção do vetor de transfecção contendo o gene ndt1 de A. fumigatus;
- Expressão do gene ndt1 em células HEK293 e HEK293 com deficiência da citrina;
- Caracterização do perfil metabólico, respiração mitocondrial e via glicolítica, além de outras alterações bioquímicas causadas pela CTLN2 nas linhagens celulares obtidas.

3 - Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Microrganismos

3.1.1. A. fumigatus

A cepa selvagem de *A. fumigatus Af293* foi cultivada em meio de cultura sólido YG [extrato de levedura 0,5% (p/v); glicose 2% (v/v); solução de elementos traços 0,1% (v/v) e ágar 2% (p/v)] e incubada por 48 horas a 37°C. Os conídios de *A. fumigatus* foram recuperados em PBS esterilizado pH 7,4 utilizando filtração em lã de vidro autoclavada. A suspensão de conídios foi armazenada à 4°C (Magnani *et al.*, 2007). Todos os meios de cultura e soluções estão descritos no Apêndices itens 8.3 e 8.4.

3.1.2. Escherichia coli

As bactérias *Escherichia coli* (*E. coli*) DH10β, foram cultivadas em meio de cultura Lúria-Bertani [LB, triptona 1% (p/v); extrato de levedura 0,5% (p/v); NaCl 1% (p/v); e/ou ágar 2% (p/v)] e incubadas por 16 horas a 37°C.

3.2. Extração de RNA e síntese do cDNA

Os conídios de A. fumigatus foram inoculados em meio de culura YG e incubado por 16 horas a 37°C sob agitação de 200 rpm. O micélio foi recuperado por filtração à vácuo, e macerado com almofariz e pistilo, na presença de nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó homogêneo (Magnani et al., 2007). O RNA total de A. fumigatus e das linhagens das células HEK293 foi isolado utilizando o kit PureLink® RNA Mini (Ambion, ThermoFisher), seguindo as recomendações do fabricante. O RNA total extraído foi tratado com DNase 1 U, para eliminação de possíveis contaminação por DNA. Logo após o RNA total foi purificado utilizando uma mistura de fenol:clorofórmio (v/v) e precipitado com isopropanol. A integridade do RNA foi verificada em gel de agarose 1% (p/v) em condição desnaturante de acordo com McDonnel, Simon e Studier (1977) e modificações de Sambrook e Green (1989). A concentração dos RNA obtidos antes е após 0 tratamento com DNase foi determinado espectrofotometricamente em comprimento de onda de 260 nm, utilizando o aparelho NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

Em seguida, o cDNA de *A. fumigatus* e das linhagens celulares de HEK293 foi sintetizado utilizando o kit *SuperScript[®] III One-Step System com Platinum[®] Taq* DNA Polimerase (Invitrogen, ThermoFisher), seguindo as instruções do fabricante.

3.3. Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (primers)

Os *primers* foram desenhados a partir da sequência completa do gene que codifica o transportador mitocondrial de nicotinamida adenina dinucleotídeo (*ndt1*) de *A. fumigatus*, depositada no *GenBank*, sob número de acesso AFUA_4G06780. Os *primers* foram desenhados com sequências específicas para recombinação com vetor de expressão em células de mamíferos pcDNA3.1/nV5-DEST[™] (Invitrogen, ThermoFisher):

Forward:5'<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGCTTG</u>ACCATGTTTTCCGACGGTCACGGC3'; Reverse:5'<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC</u>TTACTCATCCTGCTGCAGCAA3'.

Em negrito está a sequência Kozaq, enquanto as sequências *att*B1 e *att*B2, respectivamente, estão sublinhadas.

3.4. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As reações de amplificação foram realizadas de acordo com Saiki *et al.* (1985), utilizando um Termociclador Eppendorf (Mastercycler Gradient). A reação foi iniciada pela adição da enzima *Taq* DNA polimerase *High Fidelity* 5 U/µL, tampão 10 X *High Fidelity PCR Buffer* [Tris-SO₄ 600 mmol/L (pH 8,9), sulfato de amônio 180 mmol/L] (Invitrogen, ThermoFisher), e água deionizada estéril para completar o volume de 50 µL.

Foi utilizado o seguinte perfil termal: 94°C por 2 minutos; 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 68°C por 1 minuto e 30 segundos; em seguida, foi realizado um ciclo de extensão final de 68°C por 10 minutos. O produto amplificado foi purificado utilizando o kit *QIAquick® Gel Extraction* (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante e quantificado em equipamento *NanoDrop 1000* (Thermo Scientific).

3.5. Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese em gel de agarose foi realizada de acordo com Sambrook e Green (1989). Os géis de agarose 1% (p/v) foram preparados em tampão TAE 1x. As amostras foram preparadas com tampão de amostra e *GelRed*[™] (Uniscience).

As corridas eletroforéticas foram realizadas na presença de tampão TAE 1x, sob aplicação de corrente de 90 V e tempo variável. Os géis foram visualizados na presença de luz ultravioleta (UV) em aparelho *ChemiDoc™ MP System* (BioRad).

3.6. Clonagem em vetor pDONR™/Zeo

Para a expressão em células de mamíferos, HEK293 foi utilizada a plataforma de clonagem *Gateway*[®] (Life Technologies) devido a sua eficiência, e compatibilidade na construção de vetores de expressão. Além de possibilitar a transferência por recombinação *in vitro* do inserto a diferentes vetores de destino com aplicações distintas, conforme recomendação do fabricante. Inicialmente, o produto da PCR purificado foi clonado em vetor pDONR™/Zeo (Invitrogen, ThermoFisher) através de reação de recombinação BP, seguindo as recomendações do fabricante. Nessa reação ocorre a recombinação através de sequências específicas chamadas sítios *attachment* (*att*), esses sítios estão inseridos no vetor destino e nos *primers* utilizados para amplificação do inserto, nesse caso o gene *ndt1* de *A. fumigatus*. Na reação o sítio *att*P do vetor pDNOR™ recombina com o sítio *att*L presente no inserto, gerando clones de entrada (Landy, 1989; Hartley, Temple e Brasch, 2000).

3.7. Preparo de células de *E. coli* competentes

As células de *E. coli* DH10β competentes foram preparadas conforme protocolo descrito por Sambrook e Green (1989). As células foram semeadas a partir do estoque do -80°C, em 10 mL de meio LB e incubadas por 12 horas a 37°C sob agitação de 200 rpm.

Em seguida, esta subcultura foi diluída em 250 mL de meio SOB e incubada a 37°C sob agitação de 200 rpm até atingir uma densidade óptica entre 0,4 e 0,6 em comprimento de onda de 600 nm. Após esse período, a cultura foi transferida para tubos de 50 mL estéril e incubadas em gelo por 10 minutos. Logo após a cultura foi centrifugada a 2.500 *g* por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi retirado e o sedimento foi ressuspenso cuidadosamente em 20 mL de meio TB resfriado. Incubado novamente em gelo por 10 minutos, e centrifugado nas mesmas condições descritas anteriormente. Novamente, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 20 mL de meio TB e adicionado 1,5 mL de DMSO. As células foram incubadas em gelo por 10 minutos. As bactérias foram aliquotadas em microtubos e congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80°C.

3.8. Transformação de células de *E. coli* competentes

As transformações das bactérias competentes foram realizadas por choque térmico de acordo com Sambrook e Green (1989). Inicialmente, as células competentes foram

retiradas do freezer -80°C e descongeladas em gelo. Em seguida, foi adicionado aproximadamente 10 ng de DNA plasmidial a 50 – 100 µL de células competentes. Essa mistura foi incubada em gelo por 30 minutos, em seguida, foi realizado um choque térmico por 45 segundos a 42°C, e a suspensão foi incubada em gelo por 3 minutos e adicionado meio de cultura SOC.

Essa cultura foi incubada por 1 hora a 37°C, sob agitação de 200 rpm. Após este tempo, a cultura foi semeada em meio de cultura LB sólido com o antibiótico adequado 50 µg/mL e incubada por 16 horas a 37°C.

3.9. PCR de colônia

Para confirmação dos clones selecionados foi realizada uma PCR de colônia para confirmação da presença do fragmento correspondente ao gene *ndt1*. As condições de reação foram às mesmas descritas no item 3.4. Como molde foi utilizado à própria colônia inoculada diretamente ao meio de reação.

3.10. Sequenciamento de DNA

Os clones positivos selecionados foram inoculados em 5 mL de meio LB líquido e incubados por 16 horas a 37°C, sob agitação de 200 rpm. O DNA plasmidial dos clones positivos selecionados foram extraídos utilizando o kit *QIAprep® Miniprep* (Qiagen), conforme instruções do fabricante. O DNA plasmidial foi utilizado para preparação das reações de sequenciamento utilizando o kit *Big Dye® Terminator Cycle Sequencing* (ABI Prism).

A reação de sequenciamento foi realizada segundo Sanger, Nicklen e Coulson (1977), em um sequenciador automático 3500 *Genetic Analyzer* (ThermoFischer), no Centro de Sequenciamento de Ácidos Nucleicos da FCFRP-USP.

3.11. Clonagem em vetor pcDNA3.1 para expressão em células de mamífero

O DNA plasmidial do clone positivo selecionado e confirmado por sequenciamento, foi utilizado para clonagem em vetor de expressão pcDNA3.1/nV5-DEST™ (Invitrogen, ThermoFisher) através de reação de recombinação LR. As bactérias *E. coli* DH10β foram transformadas e os clones positivos selecionados, como descrito nos itens 3.8 e 3.9, respectivamente. O DNA plasmidial foi extraído utilizando o kit *QlAprep*[®] *Midiprep* (Qiagen) conforme instruções do fabricante e descrição no item 3.10. E a reação de sequenciamento foi realizada como descrito no item 3.10. Na reação LR, novamente ocorre uma recombinação dos sítios *att* presentes no clone de entrada e no vetor destino, nesse caso os sítios *att*L1/*att*L2 presentes no clone de entrada, obtido após a reação BP, recombina com os sítios *att*R1 e *att*R2 presentes no vetor pcDNA3.1/nV5-DEST[™], gerando um clone destino onde é possível a expressão da proteína de interesse em células de mamíferos (Landy, 1989; Hartley *et al.*, 2000).

3.12. Cultura de células

As linhagens celulares *human embryonic kidney 293* (HEK293) obtidas nesse trabalho foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) com concentração de glicose 25 mM e com L-glutamina 0,584 g/L (Sigma Aldrich), suplementado com soro fetal bovino 10% (v/v) (Sigma Aldrich) e solução de antibiótico e antimicótico [penicilina 100 µg/mL, estreptomicina 100 µg/mL e anfotericina B 250 µg/mL (Sigma Aldrich)]. As células foram mantidas em incubadora umidificada na presença de 5% de CO₂ a 37°C, condição padrão de cultura.

3.13. short hairpin RNA (shRNA) do gene SLC25A13 em células HEK293

A redução dos níveis de expressão do gene *SLC25A13*, que codifica a citrina, foi realizada pelo silenciamento do RNA através do shRNA, utilizando o kit *Mission TRC shRNA libraries* (Sigma Aldrich) que contém um shRNA controle e um shRNA para o gene *SLC25A13* em partículas lentivirais.

Os plasmídeos com os shRNA possuem o gene de resistência ao antibiótico puromicina, e o gene codificante da proteína verde fluorescente (GFP). A transdução foi realizada a partir do cálculo da multiplicidade de infecção (MOI), onde esse é o número de partículas lentivirais por células, para esse experimento foi determinado que o MOI era de 0,5x10⁵ partículas necessárias. Foram utilizadas 1x10⁵ células para cada transdução: controle e gene *SLC25A13*. As células foram incubadas com as partículas em condição padrão de cultura por 16 horas a 37°C. No dia seguinte, o meio de cultura foi trocado e as células incubadas por mais 24 horas a 37°C. Após esse período, as células foram selecionadas com o antibiótico puromicina 2 µg/mL durante 15 dias para obtenção das linhagens estáveis.

As linhagens estáveis obtidas foram utilizadas nos experimentos posteriores.

3.14. Confirmação da redução da expressão do gene SLC25A13 por qRT-PCR

Para confirmação da redução dos níveis de expressão do gene *SLC25A13* foi realizada uma PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) conforme Semighini *et al.* (2002), utilizando o kit TaqMan[®] Universal PCR *Master Mix* (Applied Biosystems) e as sondas pré-desenhadas TaqMan[®] gene *expression assays* para os genes humanos *SLC25A13* e β -actina (Applied Biosystems). As variações na concentração inicial de RNA mensageiro foram corrigidas através da normalização com o gene constitutivamente expresso β -actina.

3.15. Transfecção do gene ndt1 de A. fumigatus em células HEK293

A sequência do gene *ndt1* clonada em vetor pcDNA 3.1, bem como o vetor pcDNA 3.1 vazio (pcDNAØ), foram utilizadas para a transfecção das células HEK293 utilizando o reagente *PolyFect* (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante. Brevemente, 1,2x10⁶ células HEK293 e células com deficiência da citrina (células sh), obtidas como descrito anteriormente (item 3.13), apresentando confluência entre 60-80%, foram incubadas com 2 µg DNA plasmidial juntamente com o reagente *PolyFect*. Em seguida, a placa foi gentilmente homogeneizada para garantir a distribuição uniforme dos complexos, e incubadas por 24 horas com 5% de CO₂ a 37°C. Em seguida, o meio de cultura foi trocado e as células incubadas por mais 24 horas a 37°C. Após esse período, as células foram selecionadas com o antibiótico geneticina 750 µg/mL durante 15 dias para obtenção das linhagens estáveis.

As linhagens estáveis obtidas foram utilizadas nos experimentos posteriores.

3.16. Western blot

As análises de Western blot foram realizadas utilizando o extrato proteico total ou em mitocôndrias isoladas. Brevemente, o extrato proteico total foi obtido através da lise celular utilizando o reagente *CelLytic*[™] *M* (Sigma Aldrich). Em seguida, as células foram rompidas através de sonicação com 3 pulsos (100 Hz) de 10 segundos, com intervalos de 30 segundos no gelo. Após esse período, o lisado celular foi centrifugado à 20.800 g por 20 minutos a 4°C, o sobrenadante correspondente a fração proteica foi coletado. A fração mitocondrial foi obtida como descrito por Frezza, Cipolat e Scorrano (2007). As proteínas correspondentes ao extrato proteico total e a fração mitocondrial foram quantificadas conforme Smith *et al.* (1985) utilizando o kit *Pierce BCA Protein Assay* (ThermoFisher), seguindo as recomendações do fabricante.

Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) foi realizado como descrito por Laemmli (1970). Todas as corridas eletroforéticas de SDS-PAGE foram realizadas utilizando gel de empacotamento de 5% (p/v) e gel de corrida de 10% (p/v), foi utilizado tampão tris-glicina, sob uma corrente de 90 V e tempo variável. Em seguida, as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF (Towbin, Staehelin e Gordon, 1979), utilizando tampão de carbonato e bicarbonato de sódio, sob aplicação de corrente de 350 mV e tempo de 90 minutos. Logo após a transferência as membranas foram incubadas com solução de bloqueio, leite desnatado 5% (p/v) diluído em TBS-T, por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpos anti-V5 Tag, diluição 1:5.000 (Invitrogen, ThermoFisher), anti-β actina monoclonal, diluição 1:5.000 (Sigma Aldrich), anti-SLC25A13, diluição 1:1.000 (Abcam), anti-VDAC, diluição 1:5.000 (Abcam), por 16 horas a 4°C. Após esse período, as membranas foram incubadas com anticorpos secundários conjugados com peroxidase por 1 hora a temperatura ambiente. A detecção do imunocomplexo (antígeno-anticorpo) foi obtida após incubação com kit Clarity™ WB Enhancer Reagent Luminol Substrate (BioRad) e observado em equipamento ChemiDoc™ Imaging System (BioRad).

3.17. Microscopia Confocal

As linhagens celulares obtidas foram submetidas a microscopia confocal para confirmação da localização celular da proteína recombinante Ndt1. Brevemente, 5x10⁵ células foram incubadas com *MitoTracker® Deep Red FM* (Molecular Probes, ThermoFisher) 50 nM por 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram plaqueadas sob lamínulas e incubadas em condição padrão, na presença de 5% de CO₂ por 16 horas a 37°C. As células foram fixadas utilizando metanol gelado, e incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente, e foi realizado uma reação de bloqueio utilizando solução tamponada de Tris (TBS) acrescido de Tween 20 0,5% (v/v, TBS-T) mais BSA 3% (p/v) por 1 hora a temperatura ambiente. Logo após as células foram incubadas com anticorpo primário anti-V5 na diluição 1:50 com TBS-T mais BSA 5% (p/v) por 16 horas a 4°C. As lamínulas foram lavadas com TBS-T, e incubadas com anticorpo secundário anti-*mouse* Alexa Fluor[®] 555 (Invitrogen,

ThermoFisher) na diluição de 1:1000 em TBS-T mais BSA 5% (p/v) por 2 horas a temperatura ambiente. O núcleo das células foi marcado com DAPI 10 µg/mL por 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram montadas com *Fluoromount*[™] *Aqueous Mounting Medium* (Sigma Aldrich) e analisadas em microscópio confocal [aumento de 63x (zoom digital de 3x); TCS SP8; Leica Microsystems].

3.18. Quantificação de NADH, NAD⁺ e razão NADH/NAD⁺

As concentrações de NADH e NAD⁺ foram determinadas através de um método fluorimétrico utilizando kit NAD/NADH (Abcam). As determinações foram realizadas em um leitor de microplacas (Biotek), utilizando os comprimentos de onda de excitação 540 nm e emissão de 590 nm, por 2 horas a temperatura ambiente. Foram utilizadas 2x10⁶ células, para obtenção do lisado celular como descrito pelo fabricante do kit. As mitocôndrias foram isoladas como descrito por Frezza, Cipolat e Scorrano (2007), e em seguida lisadas como descrito pelo fabricante do kit. A razão NADH/NAD⁺ foi calculada a partir das concentrações de NADH e NAD⁺.

3.19. Determinação da taxa de consumo de oxigênio (OCR) e taxa de acidificação extracelular (ECAR)

OCR e ECAR foram determinados em equipamento *SeaHorse XF24 Analyzer* [SeaHorse Biosciences; (Nicholls *et al.*, 2010; Sakamuri *et al.*, 2018; TeSlaa e Teitell, 2014)]. $3x10^4$ células foram utilizadas para determinação do OCR e ECAR. As células foram plaqueadas em meio de cultura DMEM com concentração de glicose 5 mM ou 25 mM, e mantidas em condição padrão de cultura por 24 horas. Para determinar o impacto de piruvato, aspartato, ou arginina no metabolismo celular, as células foram cultivadas na presença de piruvato 2 mM (Sigma-Aldrich), aspartato 2 mM (Merck) ou arginina 2 mM (Sigma-Aldrich). Em seguida, o meio de cultura foi trocado e para o experimento foi utilizado o meio de cultura DMEM suplementado com L - glutamina, mas sem HEPES e bicarbonato de sódio (Gibco), nas mesmas condições descritas acima, glicose 5 mM ou 25 mM, e suplementações com piruvato, aspartato ou arginina. As células foram mantidas nesse meio sem CO₂ por 1 hora a 37°C antes de iniciar os experimentos. Para determinação do OCR foram adicionados oligomicina 3 μ M (Sigma Aldrich), CCCP 1 μ M (Sigma Aldrich), rotenona 1 μ M (Sigma Aldrich) e antimicina A 1 μ M (Sigma Aldrich). Em seguida, o ECAR foi determinado na presença

de oligomicina 3 µM (Sigma Aldrich) e 2-deoxiglicose 100 mM (Sigma Aldrich). Todos os experimentos foram realizados a 37°C. A normalização dos experimentos foi realizada utilizando a concentração de proteína total. Todos os experimentos foram realizados no laboratório da Prof^a. Dr^a. Alicia J. Kowaltowiski do IQ-USP.

3.20. Determinação da concentração de lactato

As concentrações de lactato foram determinadas de acordo com Savory e Kaplan (1966) e Westgard, Lahmeyer e Birnbaum (1972). 1x10⁵ células foram plaqueadas em meios de cultura DMEM com glicose 5 mM ou 25 mM e suplementações com piruvato, aspartato ou arginina 2 mM. As placas foram incubadas em condição padrão de cultura por 72 horas. As concentrações de lactato foram determinadas utilizando o kit Lactato Enzimático (Labtest). Todas as determinações foram realizadas seguindo as recomendações do fabricante, e em seguida, os valores foram normalizados pela concentração de proteínas.

3.21. Determinação da concentração de ureia extracelular

As concentrações de ureia extracelular foram determinadas de acordo com Bergmeyer (1985). 1x10⁶ células foram plaqueadas em meios de cultura DMEM com glicose 5 mM ou 25 mM, e suplementações com piruvato, aspartato ou arginina 2 mM. As placas foram incubadas em condição padrão de cultura por 48 horas. O meio de cultura foi utilizado para quantificação da concentração da ureia utilizando o kit Ureia CE (Labtest), seguindo as recomendações do fabricante. Em seguida, os valores foram normalizados pela concentração de proteínas.

3.22. Determinação da concentração de amônia intracelular

As concentrações de amônia intracelular foram determinadas de acordo com Olson e Anfinsen (1953), Mondzaac e colaboradores (1965) e Bergmeyer (1985). $1x10^6$ células foram plaqueadas em meios de cultura DMEM com glicose 5 mM ou 25 mM, e suplementações com piruvato, aspartato ou arginina 2 mM. As placas foram incubadas em condição padrão de cultura por 48 horas. As células foram lisadas com o reagente *CelLytic*TM *M* (Sigma Aldrich) e sonicação com 3 pulsos (100 Hz) de 10 segundos, com intervalos de 30 segundos no gelo. Após esse período, o lisado celular foi centrifugado à 20.800 *g* por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para quantificação da concentração de amônia utilizando o kit *Ammonia Assay* (Sigma-Aldrich). Em seguida, os valores foram normalizados pela concentração de proteínas.

3.23. Análise estrutural das proteínas

A análise estrutural das proteínas Ndt1 de *A. fumigatus* e citrina de humanos foi realizada utilizando o software Phyre2 web portal (Kelley *et al.*, 2015).

3.24. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa *GraphPad Prism* versão 5.0 (*GraphPad Software*, Inc., San Diego, Califórnia, EUA). As análises foram realizadas utilizando o teste de variância (ANOVA) de uma via, seguido do pós-teste de Bonferroni. Foram consideradas diferenças significativas com p < 0,05.



4. **RESULTADOS**

4.1. Clonagem do gene *ndt1* de *A. fumigatus* em vetor de expressão de células de mamíferos

O gene *ndt1* de *A. fumigatus* possui 1.323 pb, após o processamento, a sequência apresenta 1.194 pb e codifica uma proteína com 397 aminoácidos e peso molecular de 44 kDa. A figura 6 apresenta a eletroforese em gel de agarose em condição desnaturante do RNA extraído de *A. fumigatus* após o tratamento com a enzima DNase, na qual, foi observado a presença de duas bandas predominantes, correspondentes as subunidades 28S e 18S do RNA ribossomal, com um arraste. Após o tratamento com a DNase não foi observado a presença de uma banda acima das bandas das subunidades do RNA ribossomal, correspondente ao DNA genômico, confirmando que o tratamento foi suficiente para eliminar possíveis contaminações com DNA genômico.



Figura 6. RNA total extraído de *A. fumigatus* após o tratamento com a DNase (1). Eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) em condição desnaturante. As setas indicam as bandas correspondentes as subunidades do RNA ribossomal 28S e 18S.

O RNA extraído foi utilizado para a síntese do cDNA utilizando a enzima transcriptase reversa. Após a síntese do cDNA, o gene *ndt1* foi amplificado utilizando os primers específicos descritos no item 3.3. A figura 7, apresenta o produto de PCR obtido com a amplificação do gene *ndt1* a partir do cDNA de *A. fumigatus*. A seta indica o produto com o tamanho esperado de 1.194 pb.



Figura 7. Produto de PCR obtido após amplificação do gene *ndt1* de *A. fumigatus* a partir do cDNA. Eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TAE. A seta indica o produto de PCR obtido com o tamanho esperado, 1.194 pb.

M: Marcador 1 Kb Plus DNA (Invitrogen); 1 – Produto de PCR após amplificação do gene *ndt1*.

A banda com o tamanho esperado, 1.194 pb, foi extraída do gel de agarose e purificada, para reação de clonagem em vetor pDONRTM/Zeo. Após a transformação das bactérias *E. coli* DH10 β , as mesmas foram selecionadas na presença de zeocina. Os clones positivos foram confirmados através de reação de PCR de colônia. A figura 8 apresenta a amplificação do gene *ndt1* dos clones das bactérias selecionadas, apenas o clone 3 não apresentou amplificação do gene *ndt1*.



1.000 pb-



O clone 6 foi selecionado, uma vez que apresentou a banda com maior intensidade. O clone foi inoculado em meio LB líquido para extração do DNA plasmidial. O DNA plasmidial do clone 6 foi extraído e submetido a reação de sequenciamento. A figura 9 apresenta os alinhamentos da sequência clonada em vetor pDONR e a sequência do gene *ndt1* depositada no *GenBank*. O clone apresentou 99% de identidade com a sequência depositada no *GenBank*, não houve formação de códon de parada, e o códon iniciador estava correto. A sequência também estava no *frame* de leitura correto. Houve a troca de quatro bases nitrogenadas, porém, ocorreu a troca de apenas um aminoácido (Tabela 1), uma alanina por uma glicina, ambos pertencentes ao mesmo grupo de aminoácidos. Dessa forma, possivelmente não houve mudança nas características da proteína, tais como ancoramento na membrana mitocondrial interna e transporte de NAD⁺, uma vez que diferentes clones sequenciados apresentaram as mesmas trocas.

ndtlc 104	ATGTTTTCCGACGGTCACGGCAATTCAGGAGCCACCAGCAGCAGCAGAAGAGCAGCAGAAA	163
ndt1b 1	ATGTTTTCCGACGGTCACGGCAATTCAGGAGCCACCAGCAGCTCTGAAGAGCAGCAGATA	60
ndtlc 164	TCGCAGTCGAACAACCTTGCGTCATCCGACATTCAAGTTCCACCTGAAGCTGCTTCCAGC	223
ndt1b 61	TCGCAGTCGAACAACCTTGCGTCATCCGACATTCAAGTTCCACCTGAAGCTGCTTCCAGC	120
ndt1c 224	CCCAAGTTCGTCACAAACCTTGAGATATGGTCCACGAAGATACCGGATTACTACGTTGCT	283
<i>ndt1b</i> 121	CCCAAGTTCGTCACAAACCTTGAGATATGGTCCACGAAGATACCGGATTACTACGTTGCT	180
ndtlc 284	CCATTCTGCGGCGCCAGTGCGGGTGTGGCCTCTGGGATTGTCACATGCCCCCTTGATGTG	343
<i>ndt1b</i> 181	CCATTCTGCGGCGCCAGTGCGGGTGTGGCCTCTGGGATTGTCACATGCCCCCTTGATGTG	240
ndt1c 344	ATCAAGACGA <mark>G</mark> GCTGCAGGCACAAGGCGGATTTCTCCGACGAGGCGGCGGAGTCGTTGAG	403
<i>ndt1b</i> 241	ATCAAGACGA	300
ndtlc 404	GCGAAAACCCTTTATCGTGGTATGCTAGGTACTGGGCGGATCATATGGCGGCAAGATGGA	463
<i>ndt1b</i> 301	GCGAAAACCCTTTATCGTGGTATGCTAGGTACTGGGCGGATCATATGGCGGCAAGATGGA	360
ndtlc 464	ATTCGGGGTCTATATCAAGGATTGGGTCCCATGCTCTTGGGATATCTGCCTACGTGGGCC	523
<i>ndt1b</i> 361	ATTCGGGGTCTATATCAAGGATTGGGTCCCATGCTCTTGGGATATCTGCCTACGTGGGCC	420
ndt1c 524	GTATATTTGGCTGTTTATGACCGATCTCGAGAATACTTCTACGAAACCACCGTGACTAAT	583
<i>ndt1b</i> 421	GTATATTTGGCTGTTTATGACCGATCTCGAGAATACTTCTACGAAACCACCGTGACTAAT	480
<i>ndt1c</i> 584	CCAATCTGGGTCATTAAAACGCGGCTTATGTCACAGAGCCTCAAGTCCAACAGTGAAGGC	643
<i>ndt1b</i> 481	CCAATCTGGGTCATTAAAACGCGGCTTATGTCACAGAGCCTCAAGTCCAACAGTGAAGGC	540
ndtlc 644	TACACGGCTCCATGGCAGTACTCAAGCACTTGGGATGCAGCCCGCAAAATGTACAGGATC	703
<i>ndt1b</i> 541	TACACGGCTCCATGGCAGTACTCAAGCACTTGGGATGCAGCCCGCAAAATGTACAGGATC	600
ndt1c 704	GAAGGGATTAGGTCATTTTATTCTGGGCTGACCCCCGCGTTACTCGGCTTAACGCACGTC	763
<i>ndt1b</i> 601	GAAGGGATTAGGTCATTTTATTCTGGGCTGACCCCGCGTTACTCGGCTTAACGCACGTC	660
ndt1c 764	GCTATTCAATTCCCGCTATACGAATACTTGAAGATGGCCTTTAC <mark>A</mark> GGGTACGGGATAGGG	823
<i>ndt1b</i> 661	GCTATTCAATTCCCGCTATACGAATACTTGAAGATGGCCTTTAC <mark>T</mark> GGGTACGGGATAGGG	720
ndt1c 824	GAACATCCTGATAACGGTGGCTCTCACTGGATTGGCATATCCTGTGCGACATTCCTAAGC	883
ndt1b 721	GAACATCCTGATAACGGTGGCTCTCACTGGATTGGCATATCCTGTGCGACATTCCTAAGC	780
<i>ndt1c</i> 884	AAAGTTTGTGCCAGCACTTTAACCTACCCGCATGAAGTGCTACGGACAAGACTTCAGACA	943
ndt1b 781	AAAGTTTGTGCCAGCACTTTAACCTACCCGCATGAAGTGCTACGGACAAGACTTCAGACA	840
ndt1c 944	CAGCAAAGAACATCTCCAGCGCCTTCTCCAGAAGGTATCTCATTTCGTGGAGGGCTAGAT	1003
<i>ndt1b</i> 841	CAGCAAAGAACATCTCCAGCGCCTTCTCCAGAAGGTATCTCATTTCGTGGAGGGCTAGAT	900

ndtlc 212	CGGATCATATGGCGGCAAGATGGAATTCGGGGTCTATATCAAGGATTGGGTCCCATGCTC	271
ndt1b 337	CGGATCATATGGCGGCAAGATGGAATTCGGGGTCTATATCAAGGATTGGGTCCCATGCTC	396
ndt1c 272	TTGGGATATCTGCCTACGTGGGCCGTATATTTGGCTGTTTATGACCGATCTCGAGAATAC	331
ndt1b 397	TTGGGATATCTGCCTACGTGGGCCGTATATTTGGCTGTTTATGACCGATCTCGAGAATAC	456
ndt1c 332	TTCTACGAAACCACCGTGACTAATCCAATCTGGGTCATTAAAACGCGGCTTATGTCACAG	391
ndt1b 457	TTCTACGAAACCACCGTGACTAATCCAATCTGGGTCATTAAAACGCGGCTTATGTCACAG	516
ndt1c 392	AGCCTCAAGTCCAACAGTGAAGGCTACACGGCTCCATGGCAGTACTCAAGCACTTGGGAT	451
ndt1b 517	AGCCTCAAGTCCAACAGTGAAGGCTACACGGCTCCATGGCAGTACTCAAGCACTTGGGAT	576
ndt1c 452	GCAGCCCGCAAAATGTACAGGATCGAAGGGATTAGGTCATTTTATTCTGGGCTGACCCCC	511
ndt1b 577	GCAGCCCGCAAAATGTACAGGATCGAAGGGATTAGGTCATTTTATTCTGGGCTGACCCCC	636
ndt1c 512	GCGTTACTCGGCTTAACGCACGTCGCTATTCAATTCCCGCTATACGAATACTTGAAGATG	571
ndt1b 637	GCGTTACTCGGCTTAACGCACGTCGCTATTCAATTCCCCGCTATACGAATACTTGAAGATG	696
ndt1c 572	gcctttac <mark>a</mark> gggtacgggataggggaacatcctgataacggtggctctcactggattggc	631
ndt1b 697	GCCTTTAC <mark>T</mark> GGGTACGGGATAGGGGAACATCCTGATAACGGTGGCTCTCACTGGATTGGC	756
ndt1c 632	ATATCCTGTGCGACATTCCTAAGCAAAGTTTGTGCCAGCACTTTAACCTACCCGCATGAA	691
ndt1b 757	ATATCCTGTGCGACATTCCTAAGCAAAGTTTGTGCCAGCACTTTAACCTACCCGCATGAA	816
ndt1c 692	GTGCTACGGACAAGACTTCAGACACAGCAAAGAACATCTCCAGCGCCTTCTCCAGAAGGT	751
ndt1b 817	GTGCTACGGACAAGACTTCAGACACAGCAAAGAACATCTCCAGCGCCTTCTCCAGAAGGT	876
ndt1c 752	ATCTCATTTCGTGGAGGGCTAGATCACCCACAAGACCGCGGGCGG	811
ndt1b 877	ATCTCATTTCGTGGAGGGCTAGATCACCCACAAGACCGCGGGCGG	936
ndt1c 812	TCATCGGACGGCATGCCCAACCGCCCTCGGTATACGGGCGTGATCCGTACATGTCAGACC	871
ndt1b 937	TCATCGGACGGCATGCCCAACCGCCCTCGGTATACGGGCGTGATCCGTACATGTCAGACC	996
ndt1c 872	ATCCTGAGGGAGGAAGGCTGGCGCGCATTCTACTCCGGCATCGGGGTGAATCTATTCCGG	931
ndt1b 997	ATCCTGAGGGAGGAAGGCTGGCGCGCGCATTCTACTCCGGCATCGGGGTGAATCTATTCCGG	1056
ndt1c 932	GCTGTGCCGGCTGCCATGACCACAATGCTTACATACGAGTATCTCCGTAAGCTGATCGGT	991
<i>ndt1b</i> 1057	GCTGTGCCGGCTGCCATGACCACAATGCTTACATACGAGTATCTCCGTAAGCTGATCGGT	1116
ndt1c 992	CACTTGCAACATGAGGGAGAGATGAAGCTGCGCATGGCAAATGATAGAGAAATAG <mark>G</mark> CTTG	1051
ndt1b 1117		1176
<i>ndt1c</i> 1052	CTGCAGCAGGATGAGTAA 1069	
ndt1b 1177	CTGCAGCAGGATGAGTAA 1194	

Figura 9. Alinhamento das sequências nucleotídicas do gene *ndt1* clonado em vetor pDNOR e do cDNA do gene *ndt1* de *A. fumigatus* depositado no *GenBank*, sob número de acesso XM_747055-1. *ndt1c* – sequência clonada; *ndt1b* – sequência depositada no *GenBank*.

Em verde a troca de uma adenina por uma guanina;

Em azul a troca de uma timina por uma adenina;

Em rosa a troca de uma citosina por uma guanina.

	ATG	TTT	TCC	GAC	GGT	CAC	GGC	AAT	TCA	GGA	GCC	ACC	AGC	AGC	TCT	
Ndt1b	Iv]	r 	5	D	G	н	G	IN	5	G	A	T	5	5	5	
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
Ndt1c	ATG M	TTT F	TCC S	GAC D	GGT G	CAC H	GGC G	AAT N	TCA S	GGA G	GCC A	ACC T	AGC S	AGC S	TCT S	
Ndt1b	GAA E	GAG E	CAG O	CAG O	ATA I	TCG S	CAG O	TCG S	AAC N	AAC N	CTT L	CGC A	TCA S	TCC S	GAC D	
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
Ndt1c	GAA E	GAG E	CAG O	CAG O	ATA I	TCG S	CAG O	TCG S	AAC N	AAC N	CTT L	CGC A	TCA S	TCC S	GAC D	
	ATT	CAA	GTT	CCA	CCT	GAA	GCT	GCT	TCC	AGC	CCC	AAG	TTC	GTC	ACA	
Ndt1b	I	Q	V	Ρ	P	Ε	A	A	S	S	Ρ	K	F	V	Т	
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
Ndt1c	ATT I	CAA O	GTT V	CCA P	CCT P	GAA E	GCT A	GCT A	TCC S	AGC S	CCC P	AAG K	TTC F	GTC V	ACA T	
NI JA JA	AAC	CTT	GAG	ATA	TGG	TCC	ACG	AAG	ATA	CCG	GAT	TAC	TAC	GTT	GCT	
Natib	N	L	Е	I	W	S	Т	K	I	Ρ	D	Y	Y	V	A	
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
Ndt1c	AAC	CTT	GAG	ATA	TGG	TCC	ACG	AAG	ATA	CCG	GAT	TAC	TAC	GTT	GCT	
	N	L	E	I	W	S	T	K	I	P	D	Y	Y	V	A	
Ndt1b	CCA P	TTC F	TGC C	GGC G	GCC A	AGT S	GCG A	GGT G	GTG V	GCC A	TCT S	GGG G	ATT I	GTC V	ACA T	
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
Ndt1c	CCA P	TTC	TGC	GGC	GCC a	AGT	GCG a	GGT	GTG	GCC a	TCT	GGG	ATT T	GTC	ACA T	
	TGC	CCC	CTT	GAT	GTG	ATC	AAG	ACG	A <mark>A</mark> G	CTG	CAG	GCA	CAA	GGC	GGA	
Ndt1b	С	Ρ	L	D	V	I	K	Т	K	L	Q	А	Q	G	G	
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
Ndt1c	TGC	CCC	CTT	GAT	GTG	ATC	AAG	ACG	A <mark>G</mark> G	CTG	CAG	GAC	CAA	GGC	GGA	
	TTT	r CTC	CGA	CGA	GGC	GGC	GGA	GTC	GTT	GAG	GCG	AAA	ACC	CTT	TAT	
Ndt1b	F	L	R	R	G	G	G	V	V	Ε	A	K	Т	L	Y	
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
Ndt1c	TTT F	CTC L	CGA R	CGA R	GGC G	GGC G	GGA G	GTC V	GTT V	GAG E	GCG A	AAA K	ACC T	CTT L	TAT Y	
Ndt1b	CGT	GGT	ATG	CTA	GGT	ACT	GGG	CGG	ATC	ATA	TGG	CGG	CAA	GAT	GGA	
110110	R	G	M	L	G	Т	G	R	I	I	W	R	Q	D	G	
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
Ndt1c	CGT R	GGT G	ATG M	CTA L	GGT G	ACT T	GGG G	CGG R	ATC I	ATA I	TGG W	CGG R	CAA O	GAT D	GGA G	
NI JEAL	ATT	CGG	GGT	CTA	TAT	CAA	GGA	TTG	GGT	CCC	ATG	CTC	TTG	GGA	TAT	
Natib	I	R	G	L	Y	Q	G	L	G	Ρ	М	L	L	G	Y	
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
Nid+1 -	ATT	CGG	GGT	CTA	TAT	CAA	GGA	TTG	GGT	CCC	ATG	CTC	TTG	GGA	TAT	
NULLC	I	R	G	L	Y	Q	G	L	G	Р	М	L	L	G	Y	
Ndt1b	CTG T.	CCT P	ACG T	TGG W	GCC A	GTA V	TAT Y	TTG T.	GCT A	GTT V	TAT Y	GAC D	CGA R	TCT	CGA R	
		*	* *	*	*	*	_ *	*	*	*	_ *	*	*	*	*	
	~					~*						- r -	~~			
Ndt1c	C'I'G T.	CC'I' P	ACG T	.T.G.G	GCC	G'I'A V	'I'A'I' Y	TTG T	GC'I' A	GI'I' V	'I'A'I' Y	GAC	CGA R	TCT	CGA R	

Tabela 1. Alinhamento das sequências nucleotídicas do gene *ndt1* clonado e da sequência depositada no banco de dados *GenBank* (número de acesso: XM_747055.1), com a dedução dos aminoácidos.

| Ndt1b | GAA
E

 | TAC | TTC
F | TAC
 | GAA
E | ACC
 | ACC
T
 | GTG
V | ACT
T
 | AAT
N
 | CCA
P
 | ATC
T | TGG
W | GTC
V
 | ATT
T | |
--
--
--|--|---
--|--

--
---|--
--
--
--|---|--
--
--|--|--|
| | *

 | * | * | *
 | * | *
 | *
 | * | *
 | *
 | *
 | * | * | *
 | * | |
| NJ44 - | GAA

 | TAC | TTC | TAC
 | GAA | ACC
 | ACC
 | GTG | ACT
 | AAT
 | CCA
 | ATC | TGG | GTC
 | ATT | |
| Natic | E

 | Y | F | Y
 | E | T
 | T
 | V | T
 | N
 | P
 | I | W | V
 | I | |
| Ndt1b | AAA
K

 | ACG
T | CGG
R | CTT
L
 | A'I'G
M | TCA
S
 | CAG
Q
 | AGC
S | CTC
L
 | AAG
K
 | TCC
S
 | AAC
N | AGT
S | GAA
E
 | GGC
G | |
| | *

 | * | * | *
 | * | *
 | *
 | * | *
 | *
 | *
 | * | * | *
 | * | |
| | AAA

 | ACG | CGG | CTT
 | ATG | TCA
 | CAG
 | AGC | CTC
 | AAG
 | TCC
 | AAC | AGT | GAA
 | GGC | |
| Natic | K

 | Т | R | L
 | М | S
 | Q
 | S | L
 | K
 | S
 | Ν | S | Е
 | G | |
| Ndt1b | TAC
Y

 | ACG
T | GCT
A | CCA
P
 | TGG
W | CAG
O
 | TAC
Y
 | TCA
S | AGC
S
 | ACT
T
 | TGG
W
 | GAT
D | GCA
A | GCC
A
 | CGC
R | |
| | *

 | * | * | *
 | * | *
 | *
 | * | *
 | *
 | *
 | * | * | *
 | * | |
| | ТЪС

 | ACG | GCT | CCA
 | ТСС | CAG
 | ͲΔС
 | тса | AGC
 | ACT
 | TGG
 | GAT | GCA | GCC
 | CGC | |
| Ndt1c | Y

 | T | A | P
 | W | Q
 | Y
 | S | S
 | T
 | W
 | D | A | A
 | R | |
| Ndt1b | AAA

 | ATG
M | TAC | AGG
 | ATC | GAA
 | GGG
 | ATT | AGG
 | TCA
 | TTT
 | TAT | TCT | GGG
 | CTG | |
| | т
*

 | M
* | ⊥
* | *
 | ⊥
* | _
★
 | ۰
۲
 | ⊥
* | т
ж
 | ی
*
 | г
*
 | ± | ی
* | ч
В
 | * | |
| |

 | | |
 | |
 |
 | |
 |
 |
 | | | •
 | | |
| Ndt1c | AAA
K

 | ATG
M | TAC
Y | AGG
R
 | ATC
I | GAA
E
 | GGG
G
 | A'I''I'
I | AGG
R
 | TCA
S
 | F
 | TAT
Y | TCT
S | GGG
G
 | CTG
L | |
| Ndt1b | ACC

 | CCC | GCG | TTA
 | CTC | GGC
 | TTA
 | ACG | CAC
 | GTC
 | GCT
 | ATT | CAA | TTC
 | CCG | |
| Natio | T

 | P | A | L
 | L | G
 | L
 | T | H
 | V
 | A
 | I | Q | F
 | P | |
| | 不

 | * | 不 | 不
 | * | *
 | *
 | ጙ | ጙ
 | *
 | ጙ
 | 不 | * | ጙ
 | ጙ | |
| Ndt1c | ACC
T

 | CCC
P | GCG
A | TTA
L
 | CTC
L | GGC
G
 | TTA
L
 | ACG
T | CAC
H
 | GTC
V
 | GCT
A
 | ATT
T | CAA | TTC
F
 | CCG
P | |
| | CTA

 | TAC | GAA | TAC
 | TTG | AAG
 | ATG
 | GCC | TTT
 | AC <mark>T</mark>
 | GGG
 | TAC | GGG | ATA
 | GGG | |
| Natib | L

 | Y | E | Y
 | L | K
 | М
 | А | F
 | Т
 | G
 | Y | G | I
 | G | |
| |

 | | |
 | |
 |
 | |
 |
 | -
 | _ | - |
 | | |
| | *

 | * | * | *
 | * | *
 | *
 | * | *
 | *
 | *
 | * | * | *
 | * | |
| Ndt1c | *
CTA

 | *
TAC | *
GAA | *
TAC
 | *
TTG | *
AAG
 | *
ATG
 | *
GCC | *
TTT
 | *
AC <mark>A</mark>
 | *
GGG
 | *
TAC | *
GGG | *
ATA
 | *
GGG | |
| Ndt1c | CTA
L
GAA

 | *
TAC
Y
CAT | *
GAA
E
CCT | *
TAC
Y
GAT
 | *
TTG
L
AAC | *
AAG
K
GGT
 | *
ATG
M
GGC
 | *
GCC
A
TCT | *
TTT
F
CAC
 | *
AC <mark>A</mark>
T
 | *
GGG
G
ATT
 | *
TAC
Y
GGC | *
GGG
G
ATA | *
ATA
I
TCC
 | *
GGG
G
TGT | |
| Ndt1c
Ndt1b | *
CTA
L
GAA
E

 | *
TAC
Y
CAT
H | *
GAA
E
CCT
P | *
TAC
Y
GAT
D
 | *
TTG
L
AAC
N | *
AAG
K
GGT
G
 | *
ATG
M
GGC
G
 | *
GCC
A
TCT
S | *
TTT
F
CAC
H
 | *
AC <mark>A</mark>
T
TGG
W
 | *
GGG
G
ATT
I
 | *
TAC
Y
GGC
G | *
GGG
G
ATA
I | *
ATA
I
TCC
S
 | *
GGG
G
TGT
C | |
| Ndt1c
Ndt1b | *
CTA
L
GAA
E
*

 | *
TAC
Y
CAT
H
* | *
GAA
E
CCT
P
* | *
TAC
Y
GAT
D
*
 | *
TTG
L
AAC
N
* | *
AAG
K
GGT
G
*
 | *
ATG
M
GGC
G
*
 | *
GCC
A
TCT
S
* | *
TTT
F
CAC
H
 | *
ACA
T
TGG
W
*
 | *
GGG
G
ATT
I
*
 | *
TAC
Y
GGC
G
* | *
GGG
G
ATA
I
* | *
ATA
I
TCC
S
*
 | *
GGG
G
TGT
C
* | |
| Ndt1c
Ndt1b
Ndt1c | *
CTA
L
GAA
E
*
GAA

 | *
TAC
Y
CAT
H
*
CAT | *
GAA
E
CCT
P
* | *
TAC
Y
GAT
D
&
GAT
 | *
TTG
L
AAC
N
* | *
AAG
K
GGT
G
GGT
 | *
ATG
M
GGC
G
&
*
 | *
GCC
A
TCT
S
*
TCT | *
TTT
F
CAC
H
*
CAC
 | *
ACA
T
TGG
W
*
 | *
GGG
G
ATT
I
*
ATT
 | *
TAC
Y
GGC
G
&
* | *
GGG
G
ATA
I
*
ATA | *
ATA
I
TCC
S
*
TCC
 | *
GGG
G
TGT
C
*
TGT | |
| Ndt1c
Ndt1b
Ndt1c | *
CTA
L
GAA
E
GAA
E

 | *
TAC
Y
CAT
H
CAT
H | *
GAA
E
CCT
P
*
CCT
P | *
TAC
Y
GAT
D
&
GAT
D
 | *
TTG
L
AAC
N
*
AAC
N | *
AAG
K
GGT
G
GGT
G
 | *
ATG
M
GGC
G
&
*
GGC
G
 | *
GCC
A
TCT
S
*
TCT
S | *
TTT
F
CAC
H
*
CAC
H
 | *
ACA
T
TGG
W
*
TGG
W
 | *
GGG
G
ATT
I
*
ATT
I
 | *
TAC
Y
GGC
G
&
*
GGC
G
C | *
GGG
G
ATA
I
*
ATA
I | *
ATA
I
TCC
S
*
TCC
S
 | *
GGG
G
TGT
C
*
TGT
C | |
| Ndt1c
Ndt1b
Ndt1c
Ndt1b | *
CTA
L
GAA
E
GAA
E
GCG
A

 | *
TAC
Y
CAT
H
CAT
H
ACA
T | <pre># GAA E CCT P # CCT P TTC F</pre> | *
TAC
Y
GAT
D
*
GAT
D
CTA
L
 | *
TTG
L
AAC
N
*
AAC
N
AAC
S | *
AAG
K
GGT
G
GGT
G
AAA
K
 | *
ATG
M
GGC
G
*
GGC
G
GTT
V
 | *
GCC
A
TCT
S
*
TCT
S
TCT
S
TGT
C | *
TTT
F
CAC
H
*
CAC
H
CAC
H
GCC
A
 | *
ACA
T
GG
W
*
TGG
W
AGC
S
 | *
GGG
G
ATT
I
*
ATT
I
ACT
T
 | *
TAC
Y
GGC
G
*
GGC
G
G
TTA
L | *
GGG
G
ATA
I
*
ATA
I
ACC
T | *
ATA
I
TCC
S
*
TCC
S
TAC
Y
 | *
GGG
G
TGT
C
*
TGT
C
CCG
P | |
| Ndt1c
Ndt1b
Ndt1c
Ndt1b | *
CTA
L
GAA
E
GAA
E
GCG
A
*

 | *
TAC
Y
CAT
H
*
CAT
H
ACA
T
* | *
GAA
E
CCT
P
*
CCT
P
TTC
F
* | *
TAC
Y
GAT
D
&
GAT
D
CTA
L
*
 | *
TTG
L
AAC
N
*
AAC
N
AAC
S
* | *
AAG
K
GGT
G
*
GGT
G
AAA
K
*
 | *
ATG
M
GGC
G
*
GGC
G
TT
V
*
 | *
GCC
A
TCT
S
*
TCT
S
TCT
S
TGT
C
* | *
TTT
F
CAC
H
CAC
H
GCC
A
*
 | *
ACA
T
TGG
W
TGG
W
AGC
S
*
 | *
GGG
G
ATT
I
*
ATT
I
ATT
I
ACT
T
*
 | *
TAC
Y
GGC
G
*
GGC
G
TTA
L
* | *
GGG
G
ATA
I
*
ATA
I
ACC
T
* | *
ATA
I
TCC
S
*
TCC
S
TAC
Y
*
 | *
GGG
TGT
C
TGT
C
CCG
P
* | |
| Ndt1c
Ndt1b
Ndt1c
Ndt1b | *
CTA
L
GAA
E
GAA
E
GCG
A
*
GCG

 | *
TAC
Y
CAT
H
CAT
H
ACA
T
* | *
GAA
E
CCT
P
*
CCT
P
TTC
F
TTC | *
TAC
Y
GAT
D
&
GAT
D
CTA
L
X
CTA
 | *
TTG
L
AAC
N
*
AAC
N
AAC
S
*
AGC | *
AAG
K
GGT
G
AAA
K
*
AAA
 | *
ATG
M
GGC
G
*
GGC
G
GTT
V
*
GTT
 | *
GCC
A
TCT
S
*
TCT
S
TCT
C
TGT
C
* | *
TTT
F
CAC
H
CAC
H
CAC
H
GCC
A
&
*
GCC
 | *
ACA
T
TGG
W
*
TGG
W
AGC
S
*
AGC
 | *
GGG
G
ATT
I
*
ATT
I
ACT
T
*
ACT
 | *
TAC
Y
GGC
G
*
GGC
G
TTA
L
*
TTA | *
GGG
G
ATA
I
*
ATA
I
ACC
T
*
ACC | *
ATA
I
TCC
S
*
TCC
S
TAC
Y
*
TAC
 | *
GGG
G
TGT
C
*
TGT
C
CCG
P
*
CCG | |
| Ndt1c
Ndt1b
Ndt1c
Ndt1b
Ndt1c | *
CTA
L
GAA
E
GAA
E
GCG
A
*
GCG
A
GCG

 | *
TAC
Y
CAT
H
CAT
H
ACA
T
*
ACA
T
* | *
GAA
E
CCT
P
*
CCT
P
TTC
F
*
TTC
F | *
TAC
Y
GAT
D
&
GAT
D
CTA
L
&
CTA
L
CTA
 | *
TTG
L
AAC
N
AAC
N
AAC
S
*
AGC
S
* | *
AAG
K
GGT
G
AAA
K
K
AAA
K
 | *
ATG
M
GGC
G
GGC
G
GTT
V
V
*
GTT
V
V
 | *
GCC
A
TCT
S
*
TCT
S
TCT
C
*
TGT
C
* | *
TTT
F
CAC
H
CAC
H
GCC
A
&
*
GCC
A
 | *
ACA
T
TGG
W
TGG
W
AGC
S
*
AGC
S
 | *
GGG
ATT
I
*
ATT
I
ACT
T
*
ACT
T
 | *
TAC
Y
GGC
G
*
GGC
G
TTA
L
X
TTA
L
X
TTA | *
GGG
ATA
I
*
ATA
I
ACC
T
*
ACC
T | * ATA I TCC S TCC S TCC S TAC Y TAC Y
 | *
GGG
G
TGT
C
*
TGT
C
CCG
P
*
CCG
P | |
| Ndt1c
Ndt1b
Ndt1c
Ndt1b
Ndt1c
Ndt1c | *
CTA
L
GAA
E
GAA
E
GCG
A
&
CAT
H

 | *
TAC
Y
CAT
H
CAT
H
ACA
T
ACA
T
ACA
T
GAA
E | <pre># GAA E CCT P # CCT F TTC F TTC F GTG V</pre> | *
TAC
Y
GAT
D
*
GAT
D
CTA
L
CTA
L
CTA
L
 | *
TTG
L
AAC
N
*
AAC
N
AGC
S
AGC
S
CGG
R | *
AAG
K
GGT
G
*
GGT
G
AAA
K
*
AAA
K
AAA
K
 | *
ATG
M
GGC
G
*
GGC
G
TT
V
*
GTT
V
AGA
R
 | *
GCC
A
TCT
S
*
TCT
S
TGT
C
*
TGT
C
CTT
L | TTT
F CAC
H CAC
H GCC
A GCC
A GCC
A CAG
Q
 | *
ACA
T
TGG
W
TGG
W
AGC
S
AGC
S
ACA
 | *
GGG
G
ATT
I
*
ATT
I
ACT
T
ACT
T
CAG
Q
 | *
TAC
Y
GGC
G
*
GGC
G
TTA
L
X
TTA
L
CAA | *
GGG
ATA
I
*
ATA
I
ACC
T
*
ACC
T
ACC
T | *
ATA
I
TCC
S
TCC
S
TAC
Y
TAC
Y
ACA
T
 | *
GGG
G
TGT
C
*
TGT
C
CCG
P
*
CCG
P
TCT
S | |
| Ndt1c
Ndt1b
Ndt1c
Ndt1b
Ndt1c
Ndt1b | *
CTA
L
GAA
E
GCA
A
CAT
H
*

 | *
TAC
Y
CAT
H
CAT
H
ACA
T
ACA
T
ACA
T
ACA
T
& | *
GAA
E
CCT
P
*
CCT
P
TTC
F
TTC
F
TTC
F
GTG
V
* | *
TAC
Y
GAT
D
*
GAT
D
CTA
L
CTA
L
CTA
L
X
*
 | *
TTG
L
AAC
N
*
AAC
N
AGC
S
*
AGC
S
CGG
R
* | *
AAG
K
GGT
G
GGT
G
AAA
K
AAA
K
AAA
K
ACA
T
*
 | *
ATG
M
GGC
G
G
GTT
V
*
GTT
V
AGA
R
*
 | *
GCC
A
TCT
S
*
TCT
S
TGT
C
TGT
C
TGT
C
CTT
L
* | *
TTT
F
CAC
H
CAC
H
GCC
A
GCC
A
CAG
Q
*
 | *
ACA
T
GG
W
TGG
W
AGC
S
AGC
S
AGC
S
ACA
T
*
 | *
GGG
ATT
I
*
ATT
I
ATT
T
ACT
T
ACT
T
CAG
Q
*
 | *
TAC
Y
GGC
G
*
GGC
G
TTA
L
X
TTA
L
CAA
Q
* | *
GGG
G
ATA
I
*
ATA
I
ACC
T
*
ACC
T
AGA
R
* | *
ATA
I
TCC
S
TCC
S
TCC
S
TAC
Y
TAC
Y
ACA
T
X
 | GGG
G TGT
C TGT
C CCG
P CCG
P TCT
S * | |
| Ndt1c
Ndt1b
Ndt1c
Ndt1b
Ndt1c
Ndt1b | CTA
L GAA E GAA E GCG A GCG A GCG A CAT H * CAT

 | TAC
Y CAT
H CAT
H ACA
T ACA
T ACA ACA T ACA ACA< | CCT P CCT P CCT F TTC F TTC F GTG V TG | *
TAC
Y
GAT
D
*
GAT
D
CTA
L
CTA
L
CTA
L
X
CTA | *
TTG
L
AAC
N
*
AAC
S
AGC
S
*
AGC
S
CGG
R
*
CGG
 | *
AAG
K
GGT
G
*
AAA
K
AAA
K
AAA
K
ACA | *
ATG
M
GGC
G
*
GGC
G
GTT
V
*
GTT
V
*
AGA
R
*

 | *
GCC
A
TCT
S
TCT
S
TGT
C
TGT
C
CTT
L
* | TTT CAC H CAC H GCC A GCC A GCC A CAG Q X CAG CAG Q X | * ACA T TGG W TGG W AGC S AGC S AGC S ACA T * ACA

 | *
GGG
G
ATT
I
*
ATT
I
ACT
T
ACT
T
CAG
Q
*
CAG | *
TAC
Y
GGC
G
*
GGC
G
TTA
L
X
TTA
L
CAA
Q
*
CAA | *
GGG
ATA
I
*
ATA
I
ACC
T
*
ACC
T
AGA
R
*
 | ATA I TCC S TCC S TAC Y ACA T ACA ACA | GGG G TGT C CCG P CCG P CCG P TCT S TCT
 | |
| Ndt1c
Ndt1b
Ndt1c
Ndt1b
Ndt1c
Ndt1b
Ndt1c | CTA
L GAA GAA GCG A GCG A CAT H CAT H

 | TAC
Y CAT
H CAT
H ACA
T ACA
T ACA
T ACA
T ACA
T GAA
E GAA
E GAA
E | <pre># GAA E CCT P # CCT F TTC F GTG V GTG V GTG V</pre> | <pre>* TAC Y GAT D GAT D CTA L CTA L</pre>
 | *
TTG
L
AAC
N
*
AAC
N
AGC
S
*
AGC
S
CGG
R
*
CGG
R
* | *
AAG
K
GGT
G
AAA
K
AAA
K
AAA
K
ACA
T
ACA
T
 | *
ATG
M
GGC
G
GTT
V
&
AGA
R
AGA
R
AGA
 | *
GCC
A
TCT
S
TCT
S
TCT
C
TGT
C
CTT
L
CTT
L | TTT CAC H CAC H GCC A GCC A GCC A CAG Q CAG Q CAG Q
 | *
ACA
T
GG
W
TGG
W
AGC
S
AGC
S
AGC
S
ACA
T
*
ACA
T
 | CAGG G ATT I ATT ATT ATT ATT CAG Q CAG Q CAG Q
 | *
TAC
Y
GGC
G
*
GGC
G
TTA
L
TTA
L
CAA
Q
*
CAA
Q | *
GGG
ATA
I
*
ATA
I
ACC
T
AGA
R
AGA
R
AGA
R | *
ATA
I
TCC
S
TCC
S
TAC
Y
TAC
Y
ACA
T
ACA
T
 | GGG
G TGT
C TGT
C CCG
P CCG TCT
S TCT
S | |
| Ndt1c
Ndt1b
Ndt1c
Ndt1b
Ndt1c
Ndt1b
Ndt1c
Ndt1b | CTA
L GAA E GAA E GCG A GCG A GCG A CAT H CAT H CCA P

 | TAC
Y CAT
H CAT
H ACA
T ACA
T ACA ACA ACA T ACA A | <pre># GAA E CCT P * CCT F TTC F TTC F GTG V GTG V CCT P</pre> | *
TAC
Y
GAT
D
*
GAT
D
CTA
L
CTA
L
CTA
L
CTA
L
CTA
L
S | *
TTG
L
AAC
N
*
AAC
S
AGC
S
*
AGC
S
CGG
R
CGG
R
*
CGG
R
CGG
 | AAG GGT GGT GGT AAA AAA K AAA AAA ACA T ACA T ACA T ACA T ACA T | *
ATG
M
GGC
G
*
GGC
G
GTT
V
*
AGA
R
AGA
R
AGA
R
GGT
G

 | CCC CCT CCTT CCTT | TTT CAC H CAC H GCC A GCC A GCC A CAG Q X CAG Q X CAG Q X CAG Q X CAG S | * ACA T GG W TGG W AGC S AGC S AGC S ACA T ACA T ACA T F
 | *
GGG
G
ATT
I
*
ATT
I
ACT
T
ACT
T
CAG
Q
CAG
Q
CGT
R
 | TAC
Y
GGC
G
G
TTA
L
TTA
L
CAA
Q
K
CAA
Q
K
GGA
G
GA | *
GGG
G
ATA
I
*
ATA
I
ACC
T
*
ACC
T
AGA
R
*
AGA
R
R
GGG
G
 | * ATA I TCC S TCC S TCC Y TAC Y ACA T ACA T ACA T CTA L | GGG GGT C TGT CCG P CCG P TCT S TCT S GAT D | |
| Ndt1c
Ndt1b
Ndt1c
Ndt1b
Ndt1c
Ndt1b
Ndt1c
Ndt1b | CTA
L GAA GAA GCG A GCG A CAT H CAT H CCA P *

 | TAC
Y CAT
H CAT
A ACA
T ACA
T ACA
T ACA
A GAA
E GAA
E GCG
A * | <pre># GAA E CCT P * CCT F TTC F TTC F GTG V GTG V GTG V CCT P * </pre> | <pre>* TAC Y GAT D GAT D CTA L CTA L CTA L CTA L CTA L TCT S * </pre>
 | TTG
L AAC
N AAC
N AAC
S AGC
S CGG
R CGG
R CGG
R CCA
P * | AAG GGT GGT GGT GGT AAA K AAA K AAA ACA T T | ATG
M GGC G GGC GGC GGTT V AGA R AGA AGA

 | * GCC A TCT S TCT S TCT C TGT C TGT C TGT L ATC I ATC I * | TTT CAC H CAC H GCC A GCC A GCC A CAG Q X CAG Q X CAG Q X CAG X CAG X TCA S X | *
ACA
T
GG
W
TGG
W
AGC
S
AGC
S
AGC
S
ACA
T
T
X
ACA
T
T
TTT
F
 | * GGG ATT I * ACT T * ACT T CAG Q * CAG Q CAG Q CGT R *
 | * TAC Y GGC G * GGC GGC TTA TTA L * TTA L * CAA Q * CAA Q * GGA G * | *
GGG
G
ATA
I
*
ATA
I
ACC
T
*
ACC
T
AGA
R
R
AGA
R
R
GGG
G
K
 | ATA I TCC S TCC S TCC S TAC Y ACA T ACA ACA T ACA | CGG TGT CCG P CCG P CCG P TCT S GAT D * | |
| Ndt1c
Ndt1b
Ndt1c
Ndt1b
Ndt1c
Ndt1b
Ndt1c
Ndt1b | CTA
L GAA E % GCG
A GCG
A % GCG
A CAT
H % CCA P %

 | TAC
Y CAT
H CAT
A ACA
T < | <pre># GAA E CCT P * CCT F TTC F GTG V GTG V GTG V CCT P * CCT </pre> | * TAC Y GAT D * CTA L * CTA TCT S * TCT S * | * TTG L AAC N * AGC S * AGC S * CGG R R<th> AAG
K GGT
G AAA AAA AAA AAA ACA T T<th>*
ATG
M
GGC
G
*
GGC
G
GTT
V
*
AGA
R
AGA
R
AGA
R
GGT
G
C
K</th><th>* GCC A TCT S TCT S TCT C TGT C TGT C TGT L CTT L ATC I *</th><th> TTT CAC H CAC H GCC A GCC A GCC A CAG Q X CAG Q X CAG Q TCA S X </th><th>*
ACA
T
GG
W
TGG
W
AGC
S
AGC
S
AGC
S
ACA
T
T
TTT
F
</th><th>
GGG
G
ATT
I
*
ATT
I
ATT
T
ACT
T
*
ACT
T
CAG
Q
CGT
R
*</th><th>x
TAC
Y
GGC
G
X
GGC
G
TTA
L
X
TTA
L
CAA
Q
X
CAA
Q
X
GGA
G
G
X</th><th>*
GGG
G
ATA
I
*
ATA
I
ATA
I
ACC
T
*
ACC
T
AGA
R
R
GGG
G
G
G
G
G
G</th><th> ATA I TCC S *
TCC S TCC S * ACA T * ACA T * ACA T * ACA T * CTA L * </th><th> GGG GGT C TGT CCG P CCG P CCG P TCT S TCT S GAT D * </th><th></th></th> | AAG
K GGT
G AAA AAA AAA AAA ACA T T<th>*
ATG
M
GGC
G
*
GGC
G
GTT
V
*
AGA
R
AGA
R
AGA
R
GGT
G
C
K</th><th>* GCC A TCT S TCT S TCT C TGT C TGT C TGT L CTT L ATC I *</th><th> TTT CAC H CAC H GCC A GCC A GCC A CAG Q X CAG Q X CAG Q TCA S X </th><th>*
ACA
T
GG
W
TGG
W
AGC
S
AGC
S
AGC
S
ACA
T
T
TTT
F
</th><th>
GGG
G
ATT
I
*
ATT
I
ATT
T
ACT
T
*
ACT
T
CAG
Q
CGT
R
*</th><th>x
TAC
Y
GGC
G
X
GGC
G
TTA
L
X
TTA
L
CAA
Q
X
CAA
Q
X
GGA
G
G
X</th><th>*
GGG
G
ATA
I
*
ATA
I
ATA
I
ACC
T
*
ACC
T
AGA
R
R
GGG
G
G
G
G
G
G</th><th> ATA I TCC S * TCC S TCC S * ACA T * ACA T * ACA T * ACA T * CTA L * </th><th> GGG GGT C TGT CCG P CCG P CCG P TCT S TCT S GAT D * </th><th></th> | *
ATG
M
GGC
G
*
GGC
G
GTT
V
*
AGA
R
AGA
R
AGA
R
GGT
G
C
K
 | * GCC A TCT S TCT S TCT C TGT C TGT C TGT L CTT L ATC I *
 | TTT CAC H CAC H GCC A GCC A GCC A CAG Q X CAG Q X CAG Q TCA S X | *
ACA
T
GG
W
TGG
W
AGC
S
AGC
S
AGC
S
ACA
T
T
TTT
F
*
 | *
GGG
G
ATT
I
*
ATT
I
ATT
T
ACT
T
*
ACT
T
CAG
Q
CGT
R
*
 | x
TAC
Y
GGC
G
X
GGC
G
TTA
L
X
TTA
L
CAA
Q
X
CAA
Q
X
GGA
G
G
X | *
GGG
G
ATA
I
*
ATA
I
ATA
I
ACC
T
*
ACC
T
AGA
R
R
GGG
G
G
G
G
G
G | ATA I TCC S * TCC S TCC S * ACA T * ACA T * ACA T * ACA T * CTA L *
 | GGG GGT C TGT CCG P CCG P CCG P TCT S TCT S GAT D * | |
| Ndt1c
Ndt1b
Ndt1c
Ndt1b
Ndt1c
Ndt1b
Ndt1c
Ndt1b
Ndt1c | CTA
L GAA GAA GCG A GCG A CAT H CAT H CAT H CCA P * CCA P

 | TAC
Y CAT
H CAT
A ACA
T ACA
T ACA
T ACA
A GAA
E GAA
E GCG
A CCG
A | <pre># GAA E CCT P # CCT F TTC F TTC F GTG V GTG V GTG V CCT P # CCT P</pre> | * TAC
Y GAT
D * CTA
L * CTA
L * CTA
L * * * TCT
S *
 | TTG
L AAC
N AAC
N AAC
S AGC
S CGG
R CGG
R CGG
R CCA
P CCA
P | AAG GGT GGT GGT GGT AAA K AAA AAA AAA ACA T ACA ACA T ACA ACA T ACA ACA | *
ATG
M
GGC
G
GTT
V
*
GTT
V
AGA
R
AGA
R
AGA
R
GGT
G
G
G
G
G
G
G
G
G
G
G
G
G
G
G
G
G

 | CTT CTT CTT CTT CTT CTT ATC ATC I | TTT CAC H CAC H GCC A GCC A GCC A CAG Q CAG Q X CAG Q TCA S | *
ACA
T
GG
W
TGG
W
AGC
S
AGC
S
AGC
S
AGC
S
ACA
T
T
TTT
F
*

 | K GGG ATT I ATT ATT ATT ATT ATT CAG Q CAG Q CAG Q CGT R CGT R | x
TAC
Y
GGC
G
X
GGC
G
TTA
L
TTA
L
CAA
Q
X
CAA
Q
X
CAA
Q
CAA
GGA
G
GGA
G
GGA | *
GGG
G
ATA
I
*
ATA
I
ACC
T
*
ACC
T
AGA
R
AGA
R
R
GGG
G
G
GGG
G
 | *
ATA
I
TCC
S
TCC
S
TAC
Y
TAC
Y
ACA
T
ACA
T
ACA
T
CTA
L
CTA
L | C GGG G TGT CCG P CCG P CCG P CCG P CCG A CCT S GAT D GAT D
 | |
| Ndt1c
Ndt1b
Ndt1c
Ndt1b
Ndt1c
Ndt1b
Ndt1c
Ndt1b
Ndt1c
Ndt1b
Ndt1c | CTA
L GAA E % GCG
A % GCG
A % CCA % CCA P % CCA P % CCA P % CCA CCA % CCA %<th> TAC
Y CAT
H ACA
T ACA
T ACA A</th><th> * GAA CCT P * CCT F TTC F TTC F GTG V GTG V CCT P * CCT P * CCT P * CCT P * CCT A CCT A CCT A CCT A CCT A CCT A </th><th> * TAC Y GAT D CTA CT</th><th> * TTG
L AAC N AAC AGC S AGC S CGG R CGG CGC CGC CGC </th><th> AAG GGT GGT GGT GGT AAA K AAA K AAA ACA T ACA ACA T ACA ACA T ACA T ACA <</th><th> ATG
M GGC G GGC GGT V AGA R AGA R AGA R AGA R AGA R GGT G GGT G GGT G <l< th=""><th> CCC CCC TCT TCT TCT TCT TGT CCTT CCTT CCTT CCTT ATCC ATCC CCTT </th><th> TTT CAC H CAC H GCC A GCC A GCC A CAG Q X CAG Q X CAG Q X TCA S CAG C</th><th> * ACA
T TGG
W * AGC
S * AGC
S * ACA
T * *<th> CAGG CAGG CAGG CAGG CAGG CAGG CAGG CGT R CGT CGT<!--</th--><th>x
TAC
Y
GGC
G
X
GGC
G
TTA
L
X
TTA
L
CAA
Q
X
CAA
Q
X
GGA
G
G
GA
G
G
C
X</th><th> * GGG ATA I ATA I ATA I ACC T ACC ACC T ACC ACC<!--</th--><th> ATA I TCC S TCC S TCC S TAC Y ACA T ACA T ACA T ACA T ACA T CTA L CTA L CTA L TCC CTA L TCC <l< th=""><th> GGG GGT C TGT C CCG P CCG P CCG P TCT S TCT S GAT D GAT D GAT D GAT D GAT D GAT D C C</th><th></th></l<></th></th></th></th></l<></th> | TAC
Y CAT
H ACA
T ACA
T ACA A | * GAA CCT P * CCT F TTC F TTC F GTG V GTG V CCT P * CCT P * CCT P * CCT P * CCT A CCT A CCT A CCT A CCT A CCT A | * TAC Y GAT D CTA CT | * TTG
L AAC N AAC AGC S AGC S CGG R CGG CGC CGC CGC | AAG GGT GGT GGT GGT AAA K AAA K AAA ACA T ACA ACA T ACA ACA T ACA T ACA < | ATG
M GGC G GGC GGT V AGA R AGA R AGA R AGA R AGA R GGT G GGT G GGT G <l< th=""><th> CCC CCC TCT TCT TCT TCT TGT CCTT CCTT CCTT CCTT ATCC ATCC CCTT </th><th> TTT CAC H CAC H GCC A GCC A GCC A CAG Q X CAG Q X CAG Q X TCA S CAG C</th><th> * ACA
T TGG
W * AGC
S * AGC
S * ACA
T * *<th> CAGG CAGG CAGG CAGG CAGG CAGG CAGG CGT R CGT CGT<!--</th--><th>x
TAC
Y
GGC
G
X
GGC
G
TTA
L
X
TTA
L
CAA
Q
X
CAA
Q
X
GGA
G
G
GA
G
G
C
X</th><th> * GGG ATA I ATA I ATA I ACC T ACC ACC T ACC ACC<!--</th--><th> ATA I TCC S TCC S TCC S TAC Y ACA T ACA T ACA T ACA T ACA T CTA L CTA L CTA L TCC CTA L TCC <l< th=""><th> GGG GGT C TGT C CCG P CCG P CCG P TCT S TCT S GAT D GAT D GAT D GAT D GAT D GAT D C C</th><th></th></l<></th></th></th></th></l<> | CCC CCC TCT TCT TCT TCT TGT CCTT CCTT CCTT CCTT ATCC ATCC CCTT | TTT CAC H CAC H GCC A GCC A GCC A CAG Q X CAG Q X CAG Q X TCA S CAG C | * ACA
T TGG
W * AGC
S * AGC
S * ACA
T * *<th> CAGG CAGG CAGG CAGG CAGG CAGG CAGG CGT R CGT CGT<!--</th--><th>x
TAC
Y
GGC
G
X
GGC
G
TTA
L
X
TTA
L
CAA
Q
X
CAA
Q
X
GGA
G
G
GA
G
G
C
X</th><th> * GGG ATA I ATA I ATA I ACC T ACC ACC T ACC ACC<!--</th--><th> ATA I TCC S TCC S TCC S TAC Y ACA T ACA T ACA T ACA T ACA T CTA L CTA L CTA L TCC CTA L TCC <l< th=""><th> GGG GGT C TGT C CCG P CCG P CCG P TCT S TCT S GAT D GAT D GAT D GAT D GAT D GAT D C C</th><th></th></l<></th></th></th> | CAGG CAGG CAGG CAGG CAGG CAGG CAGG CGT R CGT CGT<!--</th--><th>x
TAC
Y
GGC
G
X
GGC
G
TTA
L
X
TTA
L
CAA
Q
X
CAA
Q
X
GGA
G
G
GA
G
G
C
X</th><th> * GGG ATA I ATA I ATA I ACC T ACC ACC T ACC ACC<!--</th--><th> ATA I TCC S TCC S TCC S TAC Y ACA T ACA T ACA T ACA T ACA T CTA L CTA L CTA L TCC CTA L TCC <l< th=""><th> GGG GGT C TGT C CCG P CCG P CCG P TCT S TCT S GAT D GAT D GAT D GAT D GAT D GAT D C C</th><th></th></l<></th></th> | x
TAC
Y
GGC
G
X
GGC
G
TTA
L
X
TTA
L
CAA
Q
X
CAA
Q
X
GGA
G
G
GA
G
G
C
X | * GGG ATA I ATA I ATA I ACC T ACC ACC T ACC ACC<!--</th--><th> ATA I TCC S TCC S TCC S TAC Y ACA T ACA T ACA T ACA T ACA T CTA L CTA L CTA L TCC CTA L TCC <l< th=""><th> GGG GGT C TGT C CCG P CCG P CCG P TCT S TCT S GAT D GAT D GAT D GAT D GAT D GAT D C C</th><th></th></l<></th> | ATA I TCC S TCC S TCC S TAC Y ACA T ACA T ACA T ACA T ACA T CTA L CTA L CTA L TCC CTA L TCC <l< th=""><th> GGG GGT C TGT C CCG P CCG P CCG P TCT S TCT S GAT D GAT D GAT D GAT D GAT D GAT D C C</th><th></th></l<> | GGG GGT C TGT C CCG P CCG P CCG P TCT S TCT S GAT D GAT D GAT D GAT D GAT D GAT D C C | |
| Ndt1c
Ndt1b
Ndt1c
Ndt1b
Ndt1c
Ndt1b
Ndt1c
Ndt1b
Ndt1c
Ndt1b
Ndt1c
Ndt1b | CTA
L GAA E GCG A GCG A GCG A CAT H CAT H CAT H CCA P * CCA P * CCA CAC H CAC

 | TAC
Y CAT
H CAT ACA
T ACA
T ACA GAA GAA GAA GCG A GCG A CCA P | CCT P CCT P TTC F TTC F GTG V GTG V CCT P CCT P CCT P CCT P CCT P CCT Q - | * TAC
Y GAT D GAT CTA CTA CTA CTA CTA CTA CTA TCT S TCT S GAC D -
 | TTG
L AAC
N AAC
N AGC
S CGG
R CGG
R CGG
R CCA
P CCA
P CCA
P CCA
CGC
R CCA CCA | AAG
K GGT
G AAA AAAA AAA AAAA AAA AAA AAA | ATG
M GGC G GGC GGC GGT V AGA R AGA R AGA R AGA R AGA R GGT G CGG R

 | CTT CTT CTT CTT CTT ATC ATC ATC ATC CTT CTT | TTT CAC H CAC H GCC A GCC A GCC A CAG Q CAG Q TCA S TCA S TCA S TCA S TCA S TCA S CCA P | *
ACA
T
TGG
W
AGC
S
AGC
S
AGC
S
AGC
S
ACA
T
T
TTT
F
ACA
T
TTT
F
GGA
G
 | ★ GGG ATT I ATT ATT ATT ATT ATT CAG Q CAG Q CAG Q CGT R CGT R GCG A
 | * TAC Y GGC G * GGC TTA L * TTA L * CAA Q * CAA Q * GGA G * GGA G * GGA G * GCT A | * GGG ATA I * ATA I ATA I ATA ATA ACC T * AGA R AGA R AGA R AGA R AGA GGG GGG GGG GGG GGG TCA S
 | ATA I TCC S TCC S TCC S TCC TAC TAC TAC TAC TCG S L | ★ GGG GGT CCG P CCG P CCG P TCT S GAT D GAT D GAC D ↓ | |

Ndt1c	CAC	CCA	CAA	GAC	CGC	GGG	CGG	CCT	CCA	GGA	GCG	GCT	TCA	TCG	GAC	
	H	P	Q		R	G	R	P	P	G	A	A	5	5	D	
Ndt1b	GGC	ATG M	DCCC	AAC	DGC	D	DGG	TAT V	ACG	GGC	GTG	ATC	CGT	ACA	TGT	
	9	141	E .	14	IX.		1	1	1	G	v	1	IX.	1		
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
	GGC	ATG	CCC	AAC	CGC	ССТ	CGG	ТАТ	ACG	GGC	GTG	ATC	CGT	ACA	ТGТ	
Ndt1c	G	M	P	N	R	P	R	Y	Т	G	V	I	R	Т	C	
Al ded h	CAG	ACC	ATC	CTG	AGG	GAG	GAA	GGC	TGG	CGC	GCA	TTC	TAC	TCC	GGC	
Natio	Q	Т	I	L	R	Ε	Ε	G	W	R	А	F	Y	S	G	
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
	CAG	ACC	ATC	CTG	AGG	GAG	GAA	GGC	TGG	CGC	GCA	TTC	TAC	TCC	GGC	
Ndt1c	Q	Т	I	L	R	E	E	G	W	R	A	F	Y	S	G	
	ATC	GGG	GTG	AAT	CTA	TTC	CGG	GCT	GTG	CCG	GCT	GCC	ATG	ACC	ACA	
Ndt1b	I	G	V	Ν	L	F	R	A	V	P	А	А	М	Т	Т	
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ndt1c	ATC	GGG	GTG	AAT	CTA	TTC	CGG	GCT	GTG	CCG	GCT	GCC	ATG	ACC	ACA	
	I	G	V	Ν	L	F	R	A	V	P	A	A	М	Т	Т	
Ndt1b	ATG	CTT	ACA	TAC	GAG	TAT	CTC	CGT	AAG	CTG	ATC	GGT	CAC	TTG	CAA	
	М	Г	т	Y	E	Y	Г	R	K	Г	T	G	Н	Г	Q	
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
Ndt1c	ATG	CTT	ACA	TAC	GAG	TAT	CTC	CGT	AAG	CTG	ATC	GGT	CAC	TTG	CAA	
	М	L	Т	Y	Ε	Y	L	R	K	L	I	G	Н	L	Q	
Ndt1b	CAT	GAG	GGA	GAG	ATG	AAG	CTG	CGC	ATG	GCA	AAT	GAT	AGA	GAA	ATA	
	Н	Ε	G	Ε	М	K	L	R	М	A	Ν	D	R	Ε	I	
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
Nid+1 c	СЪТ	GAG	CCA	CAC	ΔTC	AAC	CTC	CCC	ЪТС	CCA	<u> </u>	САТ	ACA	CDD	ልጥል	
NULLC	Н	E	G	E	M	K	L	R	M	A	N	D	R	E	I	
Ndt1b	G <mark>C</mark> C	ΤΤG	CTG	CAG	CAG	GAT	GAG	ТАА								
NULLD	A	L	L	0	0	D	E	Sto	qc							
		*	*	*	*	*	*	*	-							
	-		-		-											
Ndt1c	G <mark>G</mark> C	TTG	CTG	CAG	CAG	GAT	GAG	TAA								
	G	Ц	Ц	Q	Q	D	E	Sto	p							

ndt1c - sequência clonada;

ndt1b – sequência depositada no GenBank.

Em verde a troca de uma adenina por uma guanina;

Em azul a troca de uma timina por uma adenina;

Em rosa a troca de uma citosina por uma guanina.

Os asteriscos representam os aminoácidos idênticos, houve apenas a troca de um aminoácido, uma alanina por uma glicina.

Após confirmar que a sequência do gene *ndt1* clonada em vetor pDONR, estava correta, o DNA plasmidial do clone selecionado foi submetido a reação de recombinação com o vetor pcDNA3.1/nV5-DEST^M. As bactérias *E.coli* DH10 β foram transformadas, e selecionadas na presença do antibiótico ampicilina. Os clones selecionados foram submetidos a reação de PCR de colônia para confirmar a recombinação. A figura 10 apresenta a eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR de colônia da construção *ndt1*/pcDNA obtidos a partir dos clones de bactéria. Todos os clones selecionados foram positivos, apresentaram a amplificação do gene *ndt1* com o tamanho esperado.



Figura 10. Produtos da PCR de colônia após transformação das bactérias com a construção *ndt1*/pcDNA. Eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TAE. A seta indica o produto de PCR com o tamanho esperado, 1.194 pb. M: Marcador 1 Kb DNA Plus (Invitrogen); 1-5: Clones positivos.

O DNA plasmidial do clone 3 foi extraído e submetido a reação de sequenciamento. A sequência obtida a partir dessa clonagem foi a mesma apresentada na figura 9 e tabela 1, dessa forma, o DNA plasmidial foi utilizado para transfecção das células HEK293.

4.2. Knockdown do gene SLC25A13 utilizando shRNA em células HEK293

O gene *SLC25A13* codifica a proteína citrina, a deficiência dessa proteína causa CTLN2. Para mimetizar as condições da CTLN2 *in vitro* utilizamos a técnica de shRNA, para redução da expressão do gene que codifica a citrina. As células transduzidas foram selecionadas na presença do antibiótico puromicina durante 15 dias. Em seguida, essa linhagem denominada como linhagem estável foi utilizada nos experimentos. A figura 11 apresenta a eletroforese em gel de agarose em condição desnaturante do RNA total extraído das linhagens HEK293, sh (*knockdown* para o gene da citrina), e shControle, ambos após o tratamento com a DNase, foi observado a presença das bandas correspondentes as subunidades 28S e 18S do RNA ribossômico, sem arrastes, demonstrando um RNA íntegro (Figura 11).



Figura 11. RNA total extraído das células HEK293 após o tratamento com a DNase. Eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) em condição desnaturante. As setas indicam as bandas correspondentes as subunidades do RNA ribossomal 28S e 18S.

- 1 RNA total das células HEK293;
- 2 RNA total das células sh, com knockdown do gene SLC25A13;
- 3 RNA total das células shControle.

O RNA extraído foi utilizado para a síntese do cDNA. A expressão do gene *SLC25A13* foi analisado por qRT-PCR. A figura 12 apresenta a expressão relativa do gene *SLC25A13*, houve uma redução de 56% na expressão do gene *SLC25A13* (sh) comparado com as linhagens HEK293 e shControle. A linhagem shControle, é uma construção da partícula lentiviral controle (shRNA Controle) não possuindo nenhum alvo específico no genoma das células, porém, é utilizada para controlar todas as variáveis experimentais. Essa linhagem apresentou o mesmo nível de expressão do gene *SLC25A13* que a linhagem HEK293. O nível dos transcritos foi normalizado pelo gene constitutivamente expresso, β -actina.



Figura 12. Análise da expressão relativa do gene *SLC25A13* nas diferentes linhagens: HEK293, shControle e sh. O nível dos transcritos do gene *SLC25A13* foram normalizados pelo nível dos transcritos do gene da β -actina. O gráfico representa a média ± erro padrão de três experimentos independentes.

Em seguida, analisamos o nível da proteína citrina em mitocôndrias isoladas de células HEK293 utilizando a técnica de Western blot e anticorpo primário anti-*SLC25A13* (citrina). A figura 13 apresenta a imagem do Western blot, e mostra que houve uma redução no nível da proteína citrina apenas na linhagem sh quando comparada com as linhagens HEK293 e shControle. A linhagem shControle apresentou os mesmos níveis da proteína citrina que a linhagem HEK293.



Figura 13. Análise do Western blot de mitocôndria isolada das linhagens HEK293, shControle e sh. A proteína citrina (74 kDa) apresentou redução apenas na linhagem sh. A proteína VDAC (31 kDa) foi utilizada como proteína *housekeeping*. Imagem representativa. Resultados similares foram obtidos de três experimentos independentes.

4.3. Expressão heteróloga da proteína Ndt1 de *A. fumigatus* em células HEK293 e HEK293 com deficiência da citrina

Após a obtenção das linhagens estáveis com o *knockdown* do gene *SLC25A13* que codifica a citrina, foi realizada a transfecção das células com a construção *ndt1*/pcDNA e com o vetor pcDNA vazio (pcDNAØ), como controle, utilizando o reagente *PolyFect*

(Qiagen). As células foram selecionadas por 15 dias na presença do antibiótico geneticina. Em seguida, a expressão da proteína recombinante Ndt1 foi confirmada pela análise de Western blot, utilizando anticorpo primário anti-V5, uma vez que o vetor de expressão utilizado adiciona na porção N-terminal um epítopo com 9 ou 14 aminoácidos, GKPIPNPLLGLDST, que é reconhecido por esse anticorpo. A figura 14 apresenta o Western blot do extrato proteico total das células HEK293, e mostra que todas as linhagens que foram transfectadas com a construção *ndt1*/pcDNA apresentam a banda correspondente a proteína Ndt1, 44 kDa, confirmando a sua expressão. Enquanto, as células transfectadas com o vetor vazio (pcDNAØ) não apresentam banda correspondente a proteína Ndt1.



Figura 14. Análise do Western blot do extrato proteico total das linhagens obtidas. A proteína Ndt1 (44 kDa) foi marcada utilizando anticorpo primário anti-V5, e a proteína foi detectada apenas nas linhagens transfectadas com a construção *ndt1*/pcDNA. A proteína β-actina (42 kDa) foi utilizada como proteína *housekeeping*. Imagem representativa. Resultados similares foram obtidos de três experimentos independentes.

Transportadores mitocondriais são codificados pelo DNA nuclear e após a síntese e processamento no citosol são endereçados para as mitocôndrias. A proteína Ndt1 estava sendo expressa, porém, para confirmar se a mesma estava sendo endereçada corretamente para as mitocôndrias das células de mamífero, foi realizado isolamento das mitocôndrias, e em seguida, o Western blot. A figura 15 apresenta o Western blot de mitocôndrias isoladas. Novamente, apenas as linhagens transfectadas com a construção *ndt1*/pcDNA apresentaram a banda com o tamanho esperado, 44 kDa, correspondente a proteína Ndt1. Confirmando dessa forma, que a proteína estava

sendo expressa e endereçada corretamente para as mitocôndrias de células de mamíferos.



Figura 15. Análise do Western blot de mitocôndria isolada das linhagens obtidas. A proteína Ndt1 (44 kDa) foi marcada utilizando anticorpo primário anti-V5, e a proteína foi detectada apenas nas linhagens transfectadas com a construção *ndt1*/pcDNA. A proteína VDAC (31 kDa) foi utilizada como proteína *housekeeping*. Imagem representativa. Resultados similares foram obtidos de três experimentos independentes.

Em seguida, foi a realizada a microscopia confocal das linhagens celulares. A figura 16 apresenta as imagens obtidas com a microscopia confocal. As linhagens transfectadas com a construção *ndt1*/pCDNA [Ndt1; sh/Ndt1 e shC/Ndt1 (shControle)] apresentaram co-localização da proteína Ndt1 com as mitocôndrias marcadas com *MitoTracker*, cor laranja no painel merge. Enquanto, as linhagens transfectadas com o vetor vazio [Controle; sh/Controle e shC/Controle (shControle)] não apresentaram expressão da proteína Ndt1, bem como, não apresentaram co-localização com as mitocôndrias. As marcações em verde observadas nessas células são devido a marcação inespecífica e background, não é possível observar a cor laranja resultado da sobreposição das cores vermelha (mitocôndrias) e verde (proteína Ndt1).


Figura 16. Microscopia confocal das linhagens obtidas. As imagens da sobreposição (merge, cor laranja) apresentam a co-localização da proteína Ndt1 com as mitocôndrias. As imagens apresentam: DAPI, núcleo (azul); *MitoTracker*, mitocôndrias (vermelho); Anticorpo primário Anti-V5 e anticorpo secundário anti-*mouse* Alexa Fluor 555, proteína Ndt1 (verde); Merge, sobreposição das marcações. Objetiva de imersão de 63x, zoom óptico 3x. Barra de escala, 30 μM. Controle – células transfectadas com o vetor pcDNA vazio, controle; Ndt1 – células transfectadas com a construção *ndt1*/pcDNA;

sh/Controle – células com *knockdown* da citrina e transfectadas com o vetor pcDNA vazio; sh/Ndt1 - células com *knockdown* da citrina e transfectadas com a construção *ndt1*/pcDNA; shC/Controle – células transduzidas com o shControle e transfectadas com o vetor pcDNA vazio; shC/Ndt1 - células transduzidas com o shControle e transfectadas com a construção *ndt1*/pcDNA. A tabela 2 apresenta todas as linhagens celulares obtidas nesse trabalho.

Linhagem Celular	Transdução	Transfecção
Controle	-	vetor pcDNA vazio (pcDNAØ)
Ndt1	-	ndt1/pcDNA
shC/Controle	shRNA controle	vetor pcDNA vazio (pcDNAØ)
shC/Ndt1	shRNA controle	ndt1/pcDNA
sh/Controle	shRNA SLC25A13	vetor pcDNA vazio (pcDNAØ)
sh/Ndt1	shRNA SLC25A13	ndt1/pcDNA

Tabela 2. Linhagens celulares obtidas nesse trabalho.

4.4. Similaridades entre as proteínas citrina e Ndt1

A família de transportadores mitocondriais apresentam algumas características altamente conservadas durante a evolução. A figura 17 apresenta o alinhamento das proteínas Ndt1 de A. fumigatus e da citrina isoforma 1 e 2, presente em humanos. As sequências estão depositadas no GenBank sob número de acesso: XP_752148.1, NP_001153682.1 e NP_055066.1, respectivamente. O alinhamento apresenta as duas isoformas da proteína citrina, disponível no banco de dados, a diferença entre as isoformas é de apenas um aminoácido. Em rosa, estão os aminoácidos altamente conservados entre as proteínas, sublinhado estão as sequências de assinatura de transferência de energia mitocondrial, do inglês METS (mitochondrial energy transfer signature). Os METS são de extrema importância para caracterizar e classificar os transportadores mitocondriais, como pertencentes a essa família de proteínas. As caixas cinzas e pretas, indicam as seis hélices transmembranas presentes nas proteínas, Ndt1 e citrina, respectivamente. As hélices são importantes para o ancoramento dos transportadores mitocondriais na membrana mitocondrial interna, e a presença dessas hélices é outra característica presente na família de transportadores mitocondriais.



Figura 17. Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas Ndt1 de *A. fumigatus* (XP_752148.1), citrina isoforma 1 (NP_001153682.1) e isoforma 2 (NP_055066.1). Em rosa estão indicados os aminoácidos altamente conservados entre as proteínas; sublinhado estão as três sequências correspondentes aos METS; as caixas cinzas indicam as hélices transmembranas presentes na proteína Ndt1, enquanto as caixas pretas indicam as hélices transmembranas presentes nas isoformas da citrina.

A figura 18 apresenta a modelagem estrutural das proteínas citrina isoforma 1 e 2 (Figura 18A e 18B), e Ndt1 (Figura 18C). Ambas proteínas, citrina e Ndt1 não apresentam peptídeo sinal, dessa forma, o endereçamento dessas proteínas para as mitocôndrias ocorre devido à presença de sequência sinalizadora interna. A proteína citrina apresenta sete hélices transmembranas, responsáveis pelo ancoramento dessa proteína na membrana mitocondrial interna. Enquanto, a proteína Ndt1 apresenta apenas seis hélices transmembrana. O tamanho dessas hélices é conservado entre as proteínas. Ambas proteínas apresentam hélices com tamanhos muito próximos, o tamanho dessas hélices varia de 22 a 28 aminoácidos. As únicas exceções presentes, são a hélice transmembrana 7 na proteína citrina com 16 aminoácidos, e a hélice transmembrana 3 na proteína Ndt1 com 17 aminoácidos. No entanto, as principais mutações encontradas em pacientes com CTLN2 são encontradas nos loops da proteína citrina. Esses loops são sequências de aminoácidos que não são conservados entre as espécies, no caso das proteínas analisadas. Na proteína citrina existe uma grande variedade de tamanho dos loops, entre 19 e 30 aminoácidos, enquanto na proteína Ndt1 os tamanhos variam entre 26 e 59 aminoácidos, sendo que o loop 2 apresenta apenas 7 aminoácidos. Não há relatos de mutações presentes nos loops da proteína Ndt1.



Figura 18. Modelagem estrutural das proteínas citrina isoformas 1 e 2, e Ndt1, utilizando o software Phyre2. MMI – Membrana Mitocondrial Interna.

- A Proteína Citrina isoforma 1, número de acesso: NP_001153682.1
- B Proteína Citrina isoforma 2, número de acesso: NP_055066.1
- C Proteína Ndt1, número de acesso: XP_752148.1

4.5. Análise do metabolismo celular

4.5.1. Determinação das concentrações celular e mitocondrial de NADH, NAD⁺, e razão NADH/NAD⁺

A principal forma de entrada de equivalentes redutores nas mitocôndrias de mamíferos é através da lançadeira malato-aspartato. Em organismos como A. fumigatus, leveduras e plantas, a entrada desses equivalentes redutores pode ocorrer através de outras proteínas, como o Ndt1. Dessa forma, a atividade da proteína Ndt1 pode promover um aumento nas concentrações mitocondriais de NAD⁺. Para avaliar se a expressão de Ndt1 em células de mamíferos altera o balanco redox, foi realizada a quantificação das concentrações celulares totais de NADH, NAD+ e da razão NADH/NAD⁺. A figura 19 apresenta as concentrações desses equivalentes redutores. A figura 19A e B apresentam o aumento nas concentrações de NAD⁺ e NADH, respectivamente, nas linhagens expressando a proteína Ndt1 (Ndt1, shC/Ndt1 e sh/Ndt1) e nas células com deficiência da citrina (sh/Controle e sh/Ndt1). Nas células transfectadas com o pcDNAØ (Controle) e shC/Controle não há diferença nas concentrações de NAD⁺ e NADH, respectivamente. A razão NADH/NAD⁺ aumentou nas células com deficiência da citrina da citrina (sh/Controle), porém, a expressão da proteína Ndt1 reduziu os valores dessa razão (Figura 19C). A linhagem Ndt1 apresenta um aumento na razão NADH/NAD+.







Em seguida, para determinar quanto a proteína Ndt1 e a deficiência da citrina contribuem para alteração do *pool* de NAD⁺ e NADH nas mitocôndrias, foi quantificado esses cofatores em mitocôndrias isoladas de células HEK293. A figura 20 apresenta as concentrações de NAD⁺, NADH e a razão NADH/NAD⁺ em mitocôndrias isoladas das linhagens celulares obtidas nesse trabalho. A figura 20A e B mostra que todas as linhagens que expressam a proteína Ndt1 apresentam um aumento nas concentrações desses equivalentes redutores (Ndt1, shC/Ndt1 e sh/Ndt1). A razão NADH/NAD⁺ também foi alterada em todas as linhagens expressando a proteína Ndt1, as quais apresentaram aumento na razão NADH/NAD⁺ mitocondrial (Figura 20C). A deficiência da citrina reduziu a razão NADH/NAD⁺ mitocondrial.



Figura 20. Concentração de NAD⁺, NADH e razão NADH/NAD⁺ em mitocôndrias isoladas. A expressão de Ndt1 altera as concentrações de NAD⁺, NADH e da razão NADH/NAD⁺ em mitocôndrias isoladas. A – Concentração de NAD⁺; B – Concentração de NADH; C – Razão NADH/NAD⁺.

Os valores foram normalizados pela concentração de proteína mitocondrial. Os gráficos representam média ± erro padrão de três experimentos independentes. * p < 0,01 *versus* Controle; #, p < 0,01 *versus* sh.

4.5.2. Determinação do metabolismo oxidativo e via glicolítica

Para determinar o metabolismo celular das linhagens foram analisadas as taxas de consumo de oxigênio (OCR) e a acidificação extracelular (ECAR), utilizando equipamento SeaHorse XF24 Analyzer. OCR é um indicador de respiração

mitocondrial e, o ECAR é em grande parte resultado da glicólise. As taxas são determinadas em tempo real utilizando um volume pequeno, aproximadamente 2 µL do meio de cultura, acima da monocamada celular dentro da microplaca. A respiração, OCR, e a excreção de prótons, ECAR (glicólise) causam mudanças rápidas e facilmente determinadas nas concentrações de oxigênio dissolvido e prótons livres na microcâmara, que são medidos a cada poucos segundos por sondas sensoras em estado sólido.

Os gráficos referentes as linhagens transduzidas com o shControle são apresentados no apêndice, uma vez que essas linhagens celulares apresentaram resultados similares as linhagens controle e Ndt1. A figura 21 apresenta a respiração mitocondrial nas linhagens celulares em meio com glicose, 5 mM (Figura 21A e B) ou 25 mM (Figura 21C e D). Em ambas condições, a respiração basal das células expressando a proteína Ndt1 (Ndt1 e sh/Ndt1) é menor quando comparado com a linhagem controle. No entanto, a linhagem sh/Controle, deficiente da citrina, apresenta respiração menor quando comparada com as demais linhagens em meio de cultura com glicose 5 mM. Porém, a expressão da proteína Ndt1 foi capaz de aumentar a respiração basal nas células com deficiência da citrina (sh/Ndt1). A adição de oligomicina, um inibidor da ATP sintase, apresenta um consumo de oxigênio independente da fosforilação oxidativa, escape de prótons. Em ambas condições de cultura, meio com glicose 5 mM e 25 mM, as células apresentaram os mesmos valores de escape de prótons que as células controle. A adição de CCCP, desacoplador da cadeia respiratória, apresenta a respiração máxima ou OCR máximo. Em ambas as condições, as células apresentaram o mesmo perfil, mostrando uma redução da capacidade respiratória comparado com as células controle. No entanto, a expressão de Ndt1 aumentou essa taxa em células com deficiência da citrina e em meio com glicose 5 mM. Finalmente, a adição de rotenona, inibidor do complexo I, e antimicina A, inibidor do complexo III, demonstra o consumo de oxigênio independente da respiração mitocondrial. Nestes experimentos, foi observado uma redução significativa dessa taxa apenas em meio de cultura com glicose 5 mM. Em meio de cultura com glicose 25 mM, as células apresentaram o mesmo perfil.



Figura 21. OCR em células com deficiência da citrina e expressando a proteína Ndt1. A respiração mitocondrial foi determinada pelo OCR após a adição sequencial de oligomicina (oligo) 3 μM, CCCP 1 μM, rotenona (Rot) 1 μM acrescido com antimicina A (AA) 1 μM.

A - Respiração mitocondrial em meio de cultura com glicose 5 mM;

B – Respiração mitocondrial quantificada a partir dos dados obtidos em A;

C – Respiração mitocondrial em meio de cultura com glicose 25 mM;

D – Respiração mitocondrial quantificada a partir dos dados obtidos em C.

Os valores foram normalizados pela concentração de proteína total. Os dados representam média ± erro padrão de três experimentos independentes. *, p < 0,01 versus Controle; # p < 0,01 versus sh.

As células foram cultivadas em meio de cultura suplementado com piruvato 2 mM, e nas concentrações de glicose descritas anteriormente. Em meio de cultura com glicose 5 mM (Figura 22A e B), as linhagens celulares apresentaram redução na respiração mitocondrial comparada com a linhagem controle, o mesmo perfil foi observado após adição de todos os inibidores. A proteína Ndt1 foi capaz de recuperar a respiração mitocondrial nas linhagens celulares com deficiência da citrina (sh/Ndt1). Em meio de cultura com glicose 25 mM, as linhagens Ndt1 e sh/Controle apresentaram redução na respiração mitocondrial basal, e após a adição dos inibidores não houve diferença quando comparado com a linhagem controle. Porém, a linhagem sh/Ndt1, apresentou valores de respiração mitocondrial maiores que a linhagem controle. A expressão de Ndt1 e a suplementação de piruvato aumentou a respiração mitocondrial. De forma geral, a suplementação de piruvato reduziu a respiração mitocondrial quando comparado com os experimentos realizados sem suplementação.



Figura 22. OCR em células com deficiência da citrina e expressando a proteína Ndt1, suplementação com piruvato 2 mM. A respiração mitocondrial foi determinada pelo OCR após a adição sequencial de oligomicina (oligo) 3 μM, CCCP 1 μM, rotenona (Rot) 1 μM acrescido com antimicina A (AA) 1 μM. **A** – Respiração mitocondrial em meio de cultura com glicose 5 mM;

B - Respiração mitocondrial quantificada a partir dos dados obtidos em A;

C – Respiração mitocondrial em meio de cultura com glicose 25 mM;

D - Respiração mitocondrial quantificada a partir dos dados obtidos em C.

Os valores foram normalizados pela concentração de proteína total. Os dados representam média \pm erro padrão de três experimentos independentes. *, p < 0,01 *versus* Controle; # p < 0,01 *versus* sh.

A figura 23 apresenta OCR das linhagens celulares com a suplementação do aminoácido aspartato 2 mM. As figuras 23A e B apresentam os valores de OCR utilizando meio de cultura com glicose 5 mM, e mostra que todas as linhagens apresentaram redução nos valores de respiração mitocondrial (respiração basal, escape de prótons e respiração máxima), porém, a respiração não mitocondrial não apresentou alteração entre as linhagens. No entanto, a linhagem sh/Ndt1 apresentou aumento da respiração basal, escape de elétrons e respiração máxima quando

comparada com a linhagem sh/Controle. Dessa forma, a expressão de Ndt1 foi capaz de recuperar a respiração mitocondrial nas células com deficiência da citrina. Em meio de cultura com glicose 25 mM, as linhagens celulares apresentaram respiração mitocondrial menor que em meio de cultura com glicose 5 mM. Apenas a linhagem sh/Controle apresentou redução na respiração mitocondrial basal quando comparado com a linhagem controle, no entanto, a expressão da proteína Ndt1 foi capaz de aumentar essa taxa quando comparada com a linhagem sh/Controle. Em meio de cultura com glicose 5 mM, as células apresentaram respiração mitocondrial similar aos valores obtidos com a suplementação de piruvato.



Figura 23. OCR em células com deficiência da citrina e expressando a proteína Ndt1, suplementação com aspartato 2 mM. A respiração mitocondrial foi determinada pelo OCR após a adição sequencial de oligomicina (oligo) 3 μM, CCCP 1 μM, rotenona (Rot) 1 μM acrescido com antimicina A (AA) 1 μM. **A** – Respiração mitocondrial em meio de cultura com glicose 5 mM;

B – Respiração mitocondrial em meio de cultura com gicose o mito;
B – Respiração mitocondrial quantificada a partir dos dados obtidos em A;

C - Respiração mitocondrial em meio de cultura com glicose 25 mM;

D – Respiração mitocondrial em meio de cultura com gineose 25 mili,
D – Respiração mitocondrial quantificada a partir dos dados obtidos em C.

Os valores foram normalizados pela concentração de proteína total. Os dados representam média \pm erro padrão de três experimentos independentes. *, p < 0,01 *versus* Controle; # p < 0,01 *versus* sh.

Arginina 2 mM também foi utilizada para suplementar os meios de cultura utilizados para os experimentos de consumo de oxigênio. A figura 24 apresenta a respiração mitocondrial após a suplementação com arginina em meios de cultura com glicose 5 mM ou 25 mM. Todas as células apresentaram redução na respiração basal em meio de cultura com glicose 5 mM. No entanto, apenas as linhagens sh/Controle e sh/Ndt1 apresentaram redução nos parâmetros de escape de prótons e respiração máxima,

enquanto a respiração não mitocondrial não apresentou alteração nas linhagens quando comparada com a linhagem controle. A suplementação com arginina, foi capaz de melhorar a respiração mitocondrial nas células com deficiência da citrina, porém a expressão da proteína Ndt1 nessas células não aumentou todas as taxas da respiração mitocondrial, apenas aumentou a respiração máxima. No entanto, foi observado um perfil diferente quando meio de cultura com glicose 25 mM foi utilizado. A linhagem Ndt1 apresentou aumento em todas as taxas analisadas, enquanto a linhagem sh/Controle apresentou redução da respiração mitocondrial, todos os parâmetros analisados apresentaram redução. A linhagem sh/Ndt1 apresentou maiores valores de respiração mitocondrial, e foi capaz de recuperar todas as taxas analisadas na linhagem com deficiência da citrina. Em comparação com as demais suplementações, o uso de piruvato e arginina (2 mM) foram capazes de recuperar melhor a respiração mitocondrial em células com deficiência da citrina.



Figura 24. OCR em células com deficiência da citrina e expressando a proteína Ndt1, suplementação com arginina 2 mM. A respiração mitocondrial foi determinada pelo OCR após a adição sequencial de oligomicina (oligo) 3 μM, CCCP 1 μM, rotenona (Rot) 1 μM acrescido com antimicina A (AA) 1 μM.

A – Respiração mitocondrial em meio de cultura com glicose 5 mM;

B – Respiração mitocondrial quantificada a partir dos dados obtidos em A;

C – Respiração mitocondrial em meio de cultura com glicose 25 mM;

D – Respiração mitocondrial quantificada a partir dos dados obtidos em C.

Os valores foram normalizados pela concentração de proteína total. Os dados representam média ± erro padrão de três experimentos independentes. *, p < 0,01 *versus* Controle; # p < 0,01 *versus* sh.

A glicólise foi medida através da quantificação da taxa de acidificação extracelular (ECAR) no meio de cultura, após a secreção de ácido lático por unidade ao longo do tempo após a sua conversão em piruvato (Wu *et al.*, 2007). A glicose é usada para alimentar a glicólise, as primeiras leituras do equipamento é chamada de glicólise

basal ou ECAR basal. A adição de oligomicina, diminui a razão ADP/ATP e direciona o metabolismo para glicólise. A adição de oligomicina corresponde a capacidade glicolítica das células, ou glicólise máxima. A adição de 2-deoxiglicose (2-DG), um análogo da glicose inibe a glicólise por meio da sua ação na enzima hexoquinase, um passo limitante da glicólise. A 2-DG é fosforilada pela hexoquinase em 2-deoxiglicosefosforilada (2-DG-P), esse produto não pode ser metabolizado pela glicose-6-fosfato isomerase (GPI). Dessa forma, a adição de 2-DG fornece a medida do ECAR nãoglicolítico. Todas as taxas foram calculadas segundo TeSlaa e Teitell (2014), onde:

- Glicólise = ECAR basal ECAR após adição de 2-DG;
- Capacidade glicolítica= ECAR após adição de oligo-ECAR após adição de 2-DG;
- Acidificação não-glicolítica= ECAR após adição de 2-DG.

Os experimentos de determinação de glicólise foram realizados em meio de cultura com glicose 5 mM ou 25 mM.

A figura 25 apresenta o ECAR das células em meio de cultura com glicose 5 mM (Figura 25A e B) e glicose 25 mM (Figura 25C e D). Em meio de cultura com glicose 5 mM, as células com deficiência da citrina (sh/Controle) apresentaram redução na glicólise, em todas as taxas analisadas. A expressão da proteína Ndt1, linhagens Ndt1 e sh/Ndt1, aumentou a glicólise e a capacidade glicolítica comparado com a linhagem controle, porém não houve diferença após a adição de 2-DG, acidificação não-glicolítica. Em meio de cultura com glicose 25 mM (Figura 25C e D), não houve redução na glicólise na linhagem sh/Controle. No entanto, nas células expressando Ndt1 houve aumento na glicólise e novamente, a linhagem sh/Ndt1 apresentou aumento na glicólise comparada com as células sh/Controle. Estes resultados demonstram que, em ambas as condições de cultura (glicose 5 mM ou 25 mM), a expressão de Ndt1 recupera a glicólise em linhagens com deficiência da citrina.



Figura 25. ECAR em células com deficiência da citrina e expressando a proteína Ndt1. A glicólise foi determinada pelo ECAR após a adição sequencial de oligomicina (oligo) 3 µM e 2-deoxiglicose (2DG) 100 mM.

A – ECAR em meio de cultura com glicose 5 mM;

B - ECAR quantificado a partir dos dados obtidos em A;

C – ECAR em meio de cultura com glicose 25 mM;

D - ECAR quantificado a partir dos dados obtidos em C.

Os valores foram normalizados pela concentração de proteína total. Os dados representam média \pm erro padrão de três experimentos independentes. *, p < 0,01 *versus* Controle; # p < 0,01 *versus* sh.

A adição de piruvato 2 mM em meio de cultura com glicose 5 mM ou 25 mM, respectivamente, também alterou a via glicolítica nas linhagens. A figura 26 apresenta o ECAR na presença de piruvato. Em meio de cultura com glicose 5 mM (Figura 26A e B), as células expressando a proteína Ndt1 não apresentaram diferença na via glicolítica comparada com a linhagem controle. As células com deficiência da citrina apresentaram redução significativa em todas as taxas analisadas, glicólise,

capacidade glicolítica e acidificação não-glicolítica, comparada com a linhagem controle. No entanto, a expressão da proteína Ndt1 nas células com deficiência da citrina (sh/Ndt1) aumentou os valores de glicólise e capacidade glicolítica comparado com as células controle e sh/Controle. Entretanto, apenas a acidificação não-glicolítica apresentou aumento comparado com a linhagem sh/Controle.

A análise da via glicolítica na presença de glicose 25 mM é apresentada na figura 26C e D. Nessa condição, a adição de piruvato reduziu a via glicolítica (glicólise, capacidade glicolítica e acidificação não-glicolítica) em todas linhagens analisadas, Ndt1, sh/Controle, sh/Ndt1 comparado com a linhagem controle. Porém, a expressão da proteína Ndt1 na linhagem com deficiência da citrina foi capaz de recuperar a via glicolítica.



Figura 26. ECAR em células com deficiência da citrina e expressando a proteína Ndt1, suplementação com piruvato 2 mM. A glicólise foi determinada pelo ECAR após a adição sequencial de oligomicina (oligo) 3 µM e 2-deoxiglicose (2DG) 100 mM.

A – ECAR em meio de cultura com glicose 5 mM;

B - ECAR quantificado a partir dos dados obtidos em A;

C – ECAR em meio de cultura com glicose 25 mM;

D – ECAR quantificado a partir dos dados obtidos em C.

Os valores foram normalizados pela concentração de proteína total. Os dados representam média \pm erro padrão de três experimentos independentes. *, p < 0,01 *versus* Controle; # p < 0,01 *versus* sh.

A figura 27 apresenta o ECAR em meio de cultura com glicose 5 mM ou 25 mM e suplementado com aspartato 2 mM. A figura 27A e B, apresenta o ECAR em glicose 5 mM, e mostra que a expressão da proteína Ndt1 (Ndt1 e sh/Ndt1) aumentou a glicólise e a capacidade glicolítica comparado com a linhagem controle. Na linhagem sh/Controle não houve diferença nas taxas analisadas, enquanto, a expressão de Ndt1 nas células com deficiência da citrina foi capaz de aumentar a taxa glicolítica.

Em meio de cultura com glicose 25 mM e aspartato 2 mM, as linhagens apresentaram resultados diferentes dos obtidos no meio de cultura com glicose 5 mM. As linhagens, Ndt1, sh/Controle e sh/Ndt1 apresentaram redução na glicólise e capacidade glicolítica, porém apenas a linhagem sh/Controle apresentou redução na acidificação não-glicolítica. A expressão de Ndt1 nas células com deficiência da citrina aumentou a via glicolítica comparada com a linhagem sh/Controle.



Figura 27. ECAR em células com deficiência da citrina e expressando a proteína Ndt1, suplementação com aspartato 2 mM. A glicólise foi determinada pelo ECAR após a adição sequencial de oligomicina (oligo) 3 µM e 2-deoxiglicose (2DG) 100 mM.

- A ECAR em meio de cultura com glicose 5 mM;
- B ECAR quantificado a partir dos dados obtidos em A;
- C ECAR em meio de cultura com glicose 25 mM;

D - ECAR quantificado a partir dos dados obtidos em C.

Os valores foram normalizados pela concentração de proteína total. Os dados representam média \pm erro padrão de três experimentos independentes. *, p < 0,01 *versus* Controle; # p < 0,01 *versus* sh.

A figura 28 apresenta o ECAR em meio de cultura com glicose 5 mM ou 25 mM, e suplementação com arginina 2 mM. A figura 28A e B apresenta o ECAR em meio de cultura com glicose 5 mM. A expressão de Ndt1 aumentou a glicólise e a capacidade glicolítica nas linhagens Ndt1 e sh/Ndt1 comparado com a linhagem controle. A linhagem sh/Controle não apresentou diferença na via glicolítica, no entanto, a expressão de Ndt1 foi capaz de aumentar a via glicolítica nas células com deficiência da citrina. Em meio de cultura com glicose 25 mM (Figura 28C e D), a linhagem Ndt1 não apresentou diferença na acidificação não-glicolítica, foi observado

uma redução apenas na capacidade glicolítica. A linhagem sh/Controle apresentou redução no ECAR basal e na capacidade glicolítica. Porém, a expressão da proteína Ndt1 nas células com deficiência da citrina (sh/Ndt1) apresentou redução na glicólise e na capacidade glicolítica comparado com a linhagem controle, mas essa proteína foi capaz de recuperar a via glicolítica em células com deficiência da citrina. A expressão de Ndt1 aumentou a glicólise, a capacidade glicolítica e a acidificação não-glicolítica.



Figura 28. ECAR em células com deficiência da citrina e expressando a proteína Ndt1, suplementação com arginina 2 mM. A glicólise foi determinada pelo ECAR após a adição sequencial de oligomicina (oligo) 3 µM e 2-deoxiglicose (2DG) 100 mM.

A – ECAR em meio de cultura com glicose 5 mM;

B – ECAR quantificado a partir dos dados obtidos em A;

C – ECAR em meio de cultura com glicose 25 mM;

D – ECAR quantificado a partir dos dados obtidos em C.

Os valores foram normalizados pela concentração de proteína total. Os dados representam média \pm erro padrão de três experimentos independentes. *, p < 0,01 *versus* controle; # p < 0,01 *versus* sh.

Nossos dados em conjunto de respiração mitocondrial e via glicolítica, sugerem que ocorre uma mudança metabólica de respiração mitocondrial para aumento da atividade da via glicolítica nas células expressando a proteína Ndt1. A expressão dessa proteína em células com deficiência da citrina foi capaz de recuperar a respiração mitocondrial e a atividade glicolítica que está prejudicada (sh/Ndt1). Em meio de cultura com glicose 5 mM, a análise da respiração mitocondrial e atividade glicolítica ficaram melhores, uma vez que, as taxas apresentaram melhores diferenças

entre as linhagens celulares nessa condição. A suplementação do meio de cultura com piruvato ou arginina melhoram a respiração mitocondrial e a atividade glicolítica.

Como algumas linhagens celulares apresentaram diferenças na atividade glicolítica comparada com a linhagem controle, foi determinado a concentração de lactato extracelular após 72 horas de cultura, e nas mesmas condições de cultura utilizadas nos experimentos de ECAR, em meio de cultura com glicose 5 mM ou 25 mM, e as diferentes suplementações, piruvato, aspartato e arginina (2 mM).

A figura 29 apresenta a concentração de lactato em meio de cultura com glicose 5 mM (Figura 29A) e glicose 25 mM (Figura 29B). A linhagem com deficiência da citrina (sh/Controle), apresentou redução na concentração de lactato comparado com a linhagem controle. Porém, a expressão de Ndt1 em ambas as linhagens (Ndt1 e sh/Ndt1), apresentou aumento na concentração de lactato comparado com a linhagem controle e sh/Controle. Nessas linhagens, os valores de lactato são praticamente duas vezes maiores após 72 horas. A expressão de Ndt1 em células com deficiência da citrina aumentou a produção de lactato, corroborando nossos dados de atividade glicolítica, onde essa proteína foi capaz de recuperar a glicólise em células com deficiência da citrina. Em meio de cultura com alta concentração de glicose (Figura 29B), as linhagens controle e sh/Controle apresentaram as mesmas concentrações de lactato. Novamente, as células Ndt1 e sh/Ndt1 apresentaram maiores concentrações de lactato comparada com as demais linhagens, controle e sh/Controle, respectivamente, aproximadamente duas vezes mais lactato que as células controle. Em meio de cultura com glicose 25 mM, as células apresentam maiores concentrações de lactato quando comparadas com meio de cultura com glicose 5 mM.



Figura 29. Concentração de lactato extracelular em células com deficiência da citrina e expressando a proteína Ndt1.

A – Concentração de lactato extracelular em meio de cultura com glicose 5 mM;

B - Concentração de lactato extracelular em meio de cultura com glicose 25 mM.

Os valores foram normalizados pela concentração de proteína total. Os dados representam média \pm erro padrão de três experimentos independentes. *, p < 0,01 *versus* controle; # p < 0,01 *versus* sh.

A figura 30A apresenta a concentração de lactato em meio de cultura com glicose 5 mM e piruvato 2 mM. As células com deficiência da citrina (sh/Controle) apresentaram uma menor concentração de lactato comparado com a linhagem controle. As linhagens controle, Ndt1 e sh/Ndt1 não apresentaram diferença na concentração de lactato, mas as células sh/Ndt1 apresentaram mais lactato que as demais linhagens.

A figura 30B apresenta a concentração de lactato em meio de cultura com glicose 25 mM e piruvato 2 mM. As linhagens controle, Ndt1 e sh/Ndt1 não apresentaram nenhuma diferença na concentração de lactato, mas as células com deficiência da citrina (sh/Controle) apresentaram redução na concentração de lactato.



Figura 30. Concentração de lactato extracelular em células com deficiência da citrina e expressando a proteína Ndt1, suplementação com piruvato 2 mM.

A - Concentração de lactato extracelular em meio de cultura com glicose 5 mM;

B – Concentração de lactato extracelular em meio de cultura com glicose 25 mM.

Os valores foram normalizados pela concentração de proteína total. Os dados representam média \pm erro padrão de três experimentos independentes. *, p < 0,01 *versus* controle; # p < 0,01 *versus* sh.

A figura 31 apresenta a concentração de lactato em meio de cultura com glicose 5 mM ou 25 mM, e suplementação com aspartato 2 mM. A figura 31A apresenta a concentração de lactato em meio de cultura com glicose 5 mM, as células sh/Controle apresentam uma redução na concentração de lactato. A linhagem Ndt1 apresenta um aumento na concentração de lactato, enquanto, a linhagem sh/Ndt1 não apresenta diferença na concentração de lactato comparado com a linhagem controle, mas houve um aumento quando comparada com a linhagem sh/Controle. A figura 31B apresenta a concentração de lactato em meio de cultura com glicose 25 mM, não há diferença na concentração de lactato nas linhagem sh/Controle. A figura 31B apresenta a concentração de lactato nas linhagens controle, Ndt1 e sh/Ndt1, no entanto, a linhagem sh/Controle apresenta as menores concentrações de lactato. A expressão de Ndt1 nas células com deficiência da citrina, aumentou a concentração de lactato no mesmo nível que as células controle.



Figura 31. Concentração de lactato extracelular em células com deficiência da citrina e expressando a proteína Ndt1, suplementação com aspartato 2 mM.

A - Concentração de lactato extracelular em meio de cultura com glicose 5 mM;

B – Concentração de lactato extracelular em meio de cultura com glicose 25 mM.

Os valores foram normalizados pela concentração de proteína total. Os dados representam média \pm erro padrão de três experimentos independentes. *, p < 0,01 *versus* controle; # p < 0,01 *versus* sh.

A concentração de lactato em meios de cultura com suplementação de arginina 2 mM, e diferentes concentrações de glicose é apresentada na figura 32. Não houve diferença na concentração de lactato nas linhagens controle e sh/Controle. Apenas a linhagem Ndt1 apresentou uma concentração de lactato maior que as demais linhagens. As células com deficiência da citrina (sh/Ndt1) que expressam Ndt1 não apresentaram aumento de lactato, e apresentaram a mesma concentração que as linhagens controle e sh/Controle. A figura 32B apresenta as concentrações de lactato em meio de cultura com glicose 25 mM e arginina 2 mM. As células da linhagem controle e Ndt1 apresentaram a mesma concentração de lactato, houve redução apenas nas linhagens sh/Controle e sh/Ndt1 comparada com a linhagem controle. No entanto, a expressão da proteína Ndt1 aumentou a secreção de lactato comparada com as células sh/Controle.





A – Concentração de lactato extracelular em meio de cultura com glicose 5 mM;

B – Concentração de lactato extracelular em meio de cultura com glicose 25 mM.

Os valores foram normalizados pela concentração de proteína total. Os dados representam média \pm erro padrão de três experimentos independentes. *, p < 0,01 *versus* controle; # p < 0,01 *versus* sh.

Nossos resultados de concentração de lactato utilizando diferentes concentrações de glicose e suplementações (piruvato, aspartato ou arginina 2 mM) corroboram nossos dados de atividade glicolítica. As células com deficiência da citrina apresentaram redução da atividade glicolítica e redução na secreção de lactato, porém a expressão da proteína Ndt1 foi capaz de recuperar o metabolismo dessas células, o que foi acompanhado pelo aumento da concentração de lactato extracelular.

4.5.3. Análise das concentrações de ureia e amônia

A formação de ureia é um processo dependente do transporte de aspartato da matriz mitocondrial para o citosol. Dessa forma, em células com deficiência de citrina, o bombeamento de aspartato está comprometido, prejudicando a formação de argininosuccinato e consequentemente reduzindo a ureia produzida, bem como aumentando os níveis de amônia (Saheki, 2004). Assim, para validar o nosso modelo de CTLN2, ou seja, células com *knockdown* para o gene *SLC25A13* que codifica a citrina realizamos a determinação das concentrações de ureia e amônia.

A figura 33 apresenta as concentrações de ureia extracelular obtidas utilizando diferentes concentrações de glicose (5 mM ou 25 mM) e suplementações, piruvato, aspartato ou arginina 2 mM.

A figura 33A-D apresenta as concentrações de ureia em meio de cultura com glicose 5 mM e com as diferentes suplementações realizadas, A - não houve suplementação no meio de cultura, B - suplementação com piruvato 2 mM, C - suplementação com aspartato 2 mM e D - suplementação com arginina 2 mM. Em todas as condições analisadas, as células apresentaram o mesmo perfil. A linhagem controle e Ndt1 não apresentam diferença na concentração de ureia, enquanto, as células com deficiência da citrina, sh/Controle e sh/Ndt1 apresentam redução na concentração de ureia extracelular quando comparadas com o controle.



Figura 33. Concentração de ureia extracelular em células com deficiência da citrina e expressando a proteína Ndt1 em meio de cultura com glicose 5 mM.

A – Sem suplementação;

B – Suplementação com piruvato 2 mM;

C – Suplementação com aspartato 2 mM;

D – Suplementação com arginina 2 mM.

Os valores foram normalizados pela concentração de proteína total. Os dados representam média ± erro padrão de três experimentos independentes. * p < 0,01 *versus* Controle.

A figura 34A-D apresenta as concentrações de ureia extracelular em meio de cultura com glicose 25 mM e diferentes suplementações, A - não houve suplementação, B - piruvato 2 mM, C - aspartato 2 mM e D - arginina 2 mM. Nas condições analisadas foi observado o mesmo perfil descrito acima, ou seja, redução da concentração de ureia apenas nas linhagens com deficiência da citrina, sh/Controle e sh/Ndt1.



Figura 34. Concentração de ureia extracelular em células com deficiência da citrina e expressando a proteína Ndt1 em meio de cultura com glicose 25 mM.

A – Sem suplementação;

B - Suplementação com piruvato 2 mM;

C - Suplementação com aspartato 2 mM;

D – Suplementação com arginina 2 mM.

Os valores foram normalizados pela concentração de proteína total. Os dados representam média ± erro padrão de três experimentos independentes. * p < 0,01 *versus* Controle.

Em todas as condições analisadas, a expressão de Ndt1 e as diferentes suplementações realizadas, não recuperaram os níveis de ureia extracelular nas células com deficiência da citrina no mesmo nível que as células controle.

Além disso, foi determinada a concentração de amônia intracelular, uma vez que a amônia também é um importante produto metabólico para confirmar nosso modelo *in vitro* de CTLN2. Uma vez que uma das principais alterações bioquímicas encontradas em pacientes com CTLN2 é a hiperamonemia, responsável pelos sintomas clínicos.

A figura 35A-D apresenta as concentrações de amônia em meio de cultura com glicose 5 mM e diferentes condições de suplementação, A - sem suplementação no meio de cultura, B - piruvato 2 mM, C - aspartato 2 mM e D - arginina 2 mM. As células

106

com deficiência da citrina apresentaram aumento nas concentrações de amônia intracelular quando comparadas com as células controle e Ndt1. No entanto, as suplementações com piruvato, aspartato e arginina 2 mM (Figura 35B-D) reduziram as concentrações de amônia comparado com o meio de cultura sem suplementação (Figura 35A).



Figura 35. Concentração de amônia intracelular em células com deficiência da citrina e expressando a proteína Ndt1 em meio de cultura com glicose 5 mM.

- A Sem suplementação;
- B Suplementação com piruvato 2 mM;
- C Suplementação com aspartato 2 mM;
- D Suplementação com arginina 2 mM.

Os valores foram normalizados pela concentração de proteína total. Os dados representam média ± erro padrão de três experimentos independentes. * p < 0,01 *versus* Controle.

A figura 36A-D apresenta as concentrações de amônia em meio de cultura com glicose 25 mM e diferentes suplementações, A - meio de cultura sem suplementação, B - piruvato 2 mM, C - aspartato 2 mM, D - arginina 2 mM. Todas as células com deficiência da citrina apresentaram aumento na concentração de amônia intracelular comparado com as células controle. A expressão de Ndt1 nas células com deficiência da citrina aconcentração de amônia nessas células. A suplementação

com piruvato ou aspartato nessa condição reduziram as concentrações de amônia intracelular nas células com deficiência da citrina.





A – Sem suplementação;

B - Suplementação com piruvato 2 mM;

C - Suplementação com aspartato 2 mM;

D – Suplementação com arginina 2 mM.

Os valores foram normalizados pela concentração de proteína total. Os dados representam média ± erro padrão de três experimentos independentes. * p < 0,01 *versus* Controle.


5. DISCUSSÃO

As funções celulares dependem de inúmeros cofatores e coenzimas, dentre elas a coenzima NAD⁺, apresenta um papel central em diversas reações enzimáticas e em inúmeros processos celulares redox e não redox. A sua forma reduzida, NADH também apresenta funções essenciais para as células. Ambas, NAD⁺ e NADH desempenham papel em inúmeras vias envolvidas no metabolismo celular, tais como a glicólise, ciclo do ácido tricarboxílico e produção de ATP. Além disso, ambas apresentam funções biológicas, como modulação do metabolismo energético, participação na morte celular, homeostase de cálcio e expressão gênica. NAD⁺ é a precursora das demais isoformas de nicotinamida adenina dinucleotídeo, NADP⁺ e NADPH, ambas utilizadas na via pentose fosfato, assim como durante o estresse oxidativo. Sendo assim, a disponibilidade e compartimentalização de NAD⁺ nas células de mamíferos possui uma relação direta em praticamente todas as principais vias metabólicas mitocondriais.

5.1. Expressão heteróloga da proteína Ndt1 e *knockdown* do gene *SLC25A13* que codifica a proteína citrina

O cDNA do gene *ndt1* de *A. fumigatus* foi utilizado para clonagem e expressão em célula de mamífero.

Para a expressão da proteína Ndt1 em células HEK293 foi utilizada o vetor pcDNA3.1/nV5-DEST[™] da plataforma de clonagem *Gateway*[®] (Invitrogen). Os mapas dos vetores são apresentados em Anexos. Essa plataforma possui algumas características que resultou na sua escolha, tais como: alta eficiência na clonagem, compatibilidade na obtenção de vetores de expressão e possibilidade de transferir por recombinação *in vitro* o inserto a diferentes vetores. A clonagem é dividida em duas reações de recombinação, a reação BP e a reação LR. Em ambas reações os sítios *attachment* (*att*), presentes nos vetores e no inserto são recombinados, e a partir do clone destino obtido é possível a expressão da proteína Ndt1 em células de mamíferos.

Nesse estudo foi escolhido as células de mamífero HEK293, essas são células embrionárias de rim humano, amplamente utilizadas para expressão de proteínas recombinantes, uma vez que possuem a capacidade de processamento, quando necessário para a síntese de proteínas funcionais. Essas células são muito utilizadas para expressão heteróloga, porque são de fácil manutenção e propagação, alta eficiência de transfecção independentemente do método escolhido, e processamento

das proteínas recombinantes (Thomas e Smart, 2005). Além disso, não há descrição na literatura de modelos *in vitro* da CTLN2, sendo que os trabalhos publicados até o momento estudaram principalmente as alterações hepáticas em camundongos, uma vez que essas são as responsáveis pelos principais sintomas de CLTN2. No entanto, o rim dos pacientes com CTLN2 também é um órgão afetado pela doença. Estudos prévios demonstraram que o rim apresenta um papel muito importante para o metabolismo, atuando principalmente no metabolismo da glicose, além de participar em outras vias metabólicas tais como: lactato, glicerol e ácidos graxos (Stumvoll *et al.*, 1999). Dessa forma, a célula HEK293 foi escolhida para demonstrar as possíveis alterações causadas pela CTLN2 em células renais, uma vez que a funcionalidade desse órgão é essencial para a homeostase do organismo (Saheki e Kobayashi, 2002; Saheki *et al.*, 2007; Sinasac *et al.*, 2004; Komatsu *et al.*, 2015).

Após a transfecção das células HEK293 e seleção na presença de geneticina, a expressão da proteína Ndt1 foi confirmada por Western blot, demonstrando que a construção ndt1/pcDNA e a transfecção foram eficientes para a expressão heteróloga da proteína Ndt1 em células HEK293. Uma vez que os transportadores mitocondriais, como a proteína Ndt1, são proteínas codificadas pelo DNA nuclear e, após a síntese no citosol são processadas e endereçadas às mitocôndrias. O transporte dessas proteínas para as mitocôndrias pode ocorrer devido à presença de um peptídeo sinal, que é uma sequência de aminoácidos normalmente encontrada na porção N-terminal das proteínas, ou pode ocorrer através de sequências sinalizadoras internas (Palmieri e Pierri, 2009; Kulawiaki et al., 2012). A proteína Ndt1 não apresenta um peptídeo sinal na sua sequência de aminoácidos, dessa forma, seu endereçamento às mitocôndrias ocorre através de sinalização interna (Balico et al., 2017). As análises de Western blot em mitocôndrias isoladas e as imagens de microscopia confocal demonstraram que a proteína Ndt1 estava sendo expressa e a proteína estava localizada nas mitocôndrias, sugerindo que a sequência de sinalização interna direcionou o transportador Ndt1 de A. fumigatus para as mitocôndrias das células HEK293, sem a necessidade de otimização de códons para expressão em células humanas.

A citrina é uma isoforma do AGC, localizada na membrana mitocondrial interna, essa proteína é responsável pela troca de aspartato da matriz mitocondrial por glutamato citosólico e um próton (H⁺), um processo eletrogênico (Palmieri *et al.*, 2001). A citrina é encontrada principalmente nos órgãos que possuem a expressão de genes envolvidos no ciclo da ureia, dessa forma, é altamente expressa no fígado, rins e pâncreas (Yasuda *et al.*, 2000; Begum *et al.*, 2002). Como mencionado anteriormente, o modelo de CTLN2 obtido nesse estudo é importante, uma vez que utilizamos células embrionárias de rim humano, um dos órgãos que possui alta expressão de citrina, muito importante para o metabolismo e homeostase do organismo.

A deficiência da citrina ocorre devido a mutações no gene *SLC25A13* e têm sido descritas inúmeras mutações, sendo que as principais são as mutações de *frameshit*, onde um nucleotídeo é trocado por outro, formando um códon de parada, e dessa forma, uma proteína truncada e sem atividade funcional. Além dessa mutação, outro tipo de mutação muito comum são as mutações onde ocorre alteração no *splicing* do gene *SLC25A13*, levando a deleção de éxon, perda de aminoácidos, e finalmente a uma proteína truncada prematuramente (Kobayashi *et al.*, 1999; Yasuda *et al.*, 2000). Em nosso modelo, utilizamos a técnica de RNA de interferência (RNAi) para obtermos células com deficiência da citrina. O RNAi pode ser induzido através da introdução de uma pequena molécula de RNA (siRNA) ou então, pela geração intracelular dessa molécula siRNA, a partir da expressão de precursores de curtos *hairpins* (sh) de RNA em vetores.

No caso de shRNA, a construção deve apresentar os seguintes itens: um oligonucleotídeo contendo uma sequência do siRNA para o gene alvo, seguido por um *loop* de aproximadamente 9 nucleotídeos, e um reverso complementar da sequência de siRNA. Essas sequências são clonadas em vetores plasmidiais ou virais, que após a transfecção das células, expressarão endogenamente o shRNA que em seguida, será processado no citoplasma a siRNA. As modificações gênicas que utilizam shRNA possuem efeitos mais longos comparados com siRNA, uma vez que o shRNA é continuamente processado pelas células. Os vetores mais utilizados são os virais, adenovírus, adenovírus-associado ou lentivirais. Neste modelo, foi utilizado o shRNA clonado em vetor lentiviral, dado que esses vetores infectam ativamente as células em divisão e as demais células. Os vetores lentivirais são utilizados para expressão do shRNA em longo prazo, e para silenciamento de genes, uma vez que o DNA incorpora no genoma da célula hospedeira. No entanto, esses vetores podem apresentar toxicidade para as células associado com a expressão desregulada do shRNA (Manjunath *et al.*, 2009; Rao *et al.*, 2009; Moore *et al.*, 2010).

Nesse estudo foi obtido a linhagem estável com redução da expressão do gene *SLC25A13*, a qual foi obtida após a seleção das células transduzidas com puromicina,

sendo que a redução da expressão da citrina foi de 56%. Existem diferentes genótipos para a CTLN2, tais como: mutação em apenas um alelo do gene que codifica a citrina apresentando dessa forma, uma redução parcial nos níveis da proteína citrina; mutação em ambos alelos e nenhuma expressão do gene que codifica a citrina, e ainda pode ser encontrado mutações no gene, porém, nenhuma característica fenotípica da CTLN2 (Kobayashi *et al.*, 1999; Yasuda *et al.*, 2000). Assim, o *knockdown* do gene da citrina obtido nesse trabalho foi capaz de mimetizar algumas das condições bioquímicas da CTLN2.

A citrina de mamíferos e o transportador Ndt1 de A. fumigatus pertencem à mesma família de proteínas, a família dos transportadores mitocondriais. Visto que ambas transportam substratos para a matriz mitocondrial, que serão utilizados em vias metabólicas relacionadas as diversas funções celulares (Wohlrab, 2005). A família de transportadores mitocondriais, principalmente a família SLC25, a qual a citrina pertence, apresenta algumas características estruturais muito importantes. Essas características são preservadas em proteínas da família de transportadores mitocondriais de outras espécies, tais como os transportadores mitocondriais Ndt1 e Ndt2 de S. cerevisiae e A. thaliana, e Ndt1 de A. fumigatus. Ambas proteínas apresentam três METS altamente conservados, que são as assinaturas de transferência de energia importantes para classificar os transportadores mitocondriais. No entanto, as sequências não são completamente conservadas, podendo ocorrer alguns aminoácidos diferentes, mas segundo Palmieri e colaboradores (2004), as sequências dos METs podem ser parcialmente modificadas em uma, duas ou até três repetições, como é o caso da citrina e Ndt1. Além disso, ambas possuem hélices transmembrana, com sequências de aminoácidos conservados, os quais são importantes para o correto ancoramento desses transportadores na membrana mitocondrial interna. A citrina apresenta sete hélices transmembrana com tamanho variados, enquanto, a proteína Ndt1 apresenta apenas seis hélices transmembrana também com tamanhos variados. Em ambos os casos não tem sido relatadas mutações nessas regiões (Kobayashi et al., 1999; Yasuda et al., 2000; Balico et al., 2017).

A proteína citrina possui em sua sequência uma região susceptível a mutações, as cinco principais mutações encontradas em pacientes com CTLN2 foram identificadas em regiões entre as hélices transmembranas (Figura 37), os *loops*. Esses *loops* apresentam tamanho e sequência de aminoácidos variáveis, sendo que as mutações

descritas nessa região provavelmente, levam a proteína a não ser endereçada corretamente para a membrana mitocondrial interna (Kobayashi *et al.*, 1999), possivelmente essas mutações ocorrem na sequência de endereçamento da proteína para as mitocôndrias. A proteína Ndt1 também possui os *loops*, estes também apresentando tamanho e sequências variadas, porém não foram descritas mutações nessas regiões (Balico *et al.*, 2017).

A identidade entre a citrina e o Ndt1 é de aproximadamente 27%, sendo que as sequências conservadas responsáveis por essa identidade são todas as hélices transmembranas e consequentemente os METS. Dessa forma, as regiões que apresentam as mutações mais encontradas em pacientes com CTLN2 não são conservadas na proteína Ndt1, dessa forma, possivelmente tornando a proteína Ndt1 menos suscetível a mutações, como as encontradas na citrina.

As mutações encontradas em pacientes com CTLN2 podem ser devido a mutações do tipo *hotspot*, uma vez que, esse tipo de mutação é frequente em determinadas posições de nucleotídeos. As mutações *hotspots* podem refletir um mecanismo especifico para geração de mutações em sítios particulares, dessa forma, a análise desse tipo de mutação pode revelar informações sobre domínios funcionais em proteínas alvos (Rogozin e Pavlov, 2003). Na citrina as mutações encontradas alteram principalmente a inserção da proteína na membrana mitocondrial interna, dessa forma, as mutações afetam a sequência de sinalização da proteína para as mitocôndrias, gerando alterações metabólicas. Mutação do tipo *hotspot* foi identificada em canais de potássio. Essa mutação foi encontrada no domínio C-terminal na porção citoplasmática, sendo que, essa região está localizada logo após um *loop*. Essa mutação encontrada levou a consequências metabólicas principalmente, no domínio citoplasmático (Pattnaik *et al.*, 2012). Essa mutação descrita é bem semelhante as mutações encontradas na citrina, causando também alterações metabólicas.



Figura 37. Estrutura predita da proteína citrina e as cinco principais mutações encontradas em pacientes com CTLN2. Adaptado de Yasuda *et al.*, 2000.

5.2. Caracterização metabólica das células HEK293 expressando a proteína Ndt1 e com deficiência da citrina

A CTLN2 é uma doença autossômica recessiva, de início tardio, e segundo Yasuda e colaboradores (2000) pode existir uma possível relação entre os efeitos da regulação hormonal e fatores ambientais. Nesse estudo foi possível identificar diferenças importantes na incidência de CTLN2 entre homens e mulheres, sendo mais incidente em homens. Além disso, a média de idade de início da doença em mulheres é maior do que em homens, ou seja, a CTLN2 acomete as mulheres mais tarde do que homens.

As células HEK293 com deficiência da citrina (sh) apresentaram as principais alterações metabólicas da CTLN2 *in vivo*, tais como: aumento na concentração de amônia; aumento da razão NADH/NAD⁺ e redução/inibição da glicólise (Sinasac *et al.*, 2004; Saheki *et al.*, 2007). No entanto, não foram avaliadas todas as alterações bioquímicas comuns em pacientes com CTLN2, como o aumento da concentração de citrulina, aumento na secreção de argininosuccinato e aumento da razão treonina/serina (Kobayashi *et al.*, 1999; Yasuda *et al.*, 2000).

A citrina é importante para manutenção do ciclo da ureia, na sua ausência ocorre uma disfunção neste ciclo, que leva a hiperamonemia, e aumento da razão NADH/NAD⁺ citosólico. Como a glicólise e lipogênese hepática são acopladas ao bombeamento de NADH, no caso de aumento da razão NADH/NAD⁺ ocorre a inibição da glicólise e lipogênese (Kobayashi *et al.*, 1999; Yasuda *et al.*, 2000; Saheki *et al.*, 2002; Hayasaka *et al.*, 2014). A função mitocondrial é muito importante para manutenção da homeostase e funcionamento celular, na CTLN2 alguns sintomas dependem intimamente da função mitocondrial. A lançadeira-malato aspartato é a principal via de transporte de equivalentes redutores do citosol para a mitocôndria. Essa lançadeira é composta por diferentes transportadores mitocondriais, dentre eles o AGC (Palmieri *et al.*, 2001). Dessa forma, a deficiência da citrina leva a um desequilíbrio no transporte de NADH para a matriz mitocondrial e, consequentemente acumulo no citosol, causando aumento na razão NADH/NAD⁺ citosólico. O aumento nessa razão pode afetar a razão ATP/ADP intramitocondrial, uma vez que essa última é dependente da concentração de NAD⁺ (La Noue e Williamson, 1971; Saheki *et al.*, 2002; Saheki *et al.*, 2007). A proteína Ndt1 foi escolhida para a expressão heteróloga em células com deficiência da citrina, uma vez que é um transportador mitocondrial de NAD⁺ de *A. fumigatus* e participa do seu balanço redox.

A expressão da proteína Ndt1 foi capaz de aumentar a concentração de NADH, NAD⁺ e da razão NADH/NAD⁺ nas células obtidas, esse parâmetro foi utilizado para determinar a atividade dessa proteína em células de mamíferos. Em células HEK293 com deficiência da citrina houve um aumento na razão NADH/NAD⁺ citosólica, enquanto, as células que expressam a proteína Ndt1 alterou a concentração de NADH, NAD⁺ e a razão NADH/NAD⁺ citosólica e mitocondrial. Por outro lado, as células sh/Ndt1 apresentaram uma diminuição da razão NADH/NAD⁺.

O aumento de nucleotídeos de pirimidina altera o metabolismo celular e a produção de energia, uma vez que o NAD⁺ e suas formas regulam várias reações redox que formam o metabolismo celular compartimento específico, como a glicólise, o TCA, a oxidação de ácidos graxos e aminoácidos (Srivastava, 2016). A entrada de equivalentes redutores do citosol para as mitocôndrias através da citrina é indispensável para o metabolismo mitocondrial na oxidação do piruvato formado na glicólise. Uma vez que esse piruvato é transportado para a matriz mitocondrial e oxidado pela enzima piruvato desidrogenase a oxaloacetato. Esse produto será utilizado pelo TCA para geração de substratos redutores e manutenção do metabolismo mitocondrial. Além disso, o mesmo ocorre na gliconeogênese gerando lactato e glicerol. Dessa forma, a expressão da proteína Ndt1 em células com deficiência de citrina foi capaz de restabelecer o equilíbrio redox e o metabolismo celular, principalmente pela redução da razão NADH/NAD⁺ citosólica, e consequente aumento de NADH e NAD⁺ intramitocondrial.

A taxa de consumo de oxigênio pode ser utilizada como um indicador da respiração mitocondrial. Em células cultivadas, a medida dos prótons produzidos indiretamente

através do lactato liberado pode ser utilizada como um indicador de glicólise, e é fornecida através do ECAR. A expressão da proteína Ndt1 recuperou o metabolismo celular, principalmente aumentando o OCR e ECAR nas células com deficiência de citrina. A proteína Ndt1 pode manter o equilíbrio redox nas células com deficiência de citrina, onde há alteração na lançadeira malato-aspartato, uma vez que essa proteína catalisa o transporte de NAD⁺ para a matriz mitocondrial, mantendo o balanço redox. Esse NAD⁺ será utilizado para geração de substratos oxidáveis durante o TCA, recuperando dessa forma a respiração mitocondrial em células com deficiência da citrina, onde o balanço redox está alterado.

Estudos anteriores demonstraram que pode ocorrer toxicidade da glicose em casos de CTLN2, além disso esse substrato pode interferir na determinação do metabolismo celular (Saheki et al., 2008; Sinasac et al., 2004; Zeidler et al., 2017). Dessa forma, os experimentos de OCR e ECAR foram realizados utilizando duas concentrações de glicose, 5 mM ou 25 mM. Os resultados obtidos demonstram que as diferenças metabólicas ficaram mais evidentes em meio de cultura com a menor concentração de glicose (5 mM). Uma vez que, para avaliar processos fisiológicos, como o observado no modelo obtido alguns nutrientes presentes no meio de cultura ou estoques endógenos de substratos podem alterar a capacidade da mitocôndria em oxidar alguns substratos, e dessa forma não podemos observar claramente as alterações metabólicas. A glicose é um dos nutrientes exógenos/endógenos que podem influenciar na determinação do metabolismo celular, dessa forma, utilizando dois meios de cultura diferentes podemos obter melhores diferenças no metabolismo celular, visto que no meio de cultura com menor concentração de glicose, as células reduzem a oxidação dos estoques de glicose endógenos e aumentam a respiração mitocondrial utilizando a oxidação de ácidos graxos (Zeidler et al., 2017).

A administração oral de piruvato, aspartato ou arginina tem sido utilizado no tratamento de pacientes com CTLN2 (Mutoh *et al.*, 2008). Nesse sentido, foram realizadas suplementações com esses compostos nos meios de cultura utilizados nesse estudo, para análise da contribuição dessas suplementações para o metabolismo. O aspartato mitocondrial tem sido demonstrado como uma fonte preferida para a enzima ASS condensar citrulina e aspartato formando argininosuccinato. Na deficiência de citrina o aspartato citosólico formado a partir do oxaloacetato ou da asparagina pode se tornar fonte essencial (Meijer *et al.*, 1978). A suplementação de piruvato, aspartato ou arginina podem ser uma alternativa

terapêutica para a deficiência de citrina, uma vez que estes foram capazes de recuperar as alterações do metabolismo. O piruvato tem sido descrito como principal fonte de energia nestes pacientes, e tem demonstrado capacidade aumentar o metabolismo celular (Hedden e Buse, 1982; Petkova *et al.*, 2000).

No nosso modelo, a suplementação com aspartato não foi capaz de promover uma melhoria na função mitocondrial, uma vez que não houve aumento nas taxas de respiração mitocondrial e via glicolítica, corroborando os resultados encontrados em ratos *knockout*, onde foi demonstrado que o aspartato mitocondrial não era essencial para a reação do ASS, e o déficit de ureogênese foi resultado da geração de aspartato citosólico (Moriyama *et al.*, 2006). Essa geração de aspartato citosólico também poderia limitar a re-oxidação de equivalentes redutores, o que poderia explicar os resultados obtidos.

A suplementação com piruvato foi mais eficiente para recuperar o metabolismo celular quando comparado com aspartato e arginina. Uma vez que, o piruvato favorece principalmente a re-oxidação mitocondrial de NADH e dessa forma, fornece energia para a célula. O piruvato deve ser transportado através da membrana mitocondrial interna para a matriz mitocondrial, onde é oxidado pela piruvato desidrogenase a acetil-coA, mantendo o ciclo do ácido tricarboxílico e consequentemente a cadeia respiratória (Kane, 2014). Em ratos com *knockout* de citrina a infusão de piruvato também melhorou o metabolismo hepático, diminuiu a razão lactato/piruvato, e aumentou a ureogênese (Moriyama *et al.*, 2006; Saheki *et al.*, 2011).

Nossos resultados de ECAR e concentração de lactato extracelular, demonstram que a expressão de Ndt1 nas células com ou sem deficiência da citrina altera a via glicolítica. O aumento na concentração de lactato extracelular, ocorre porque o lactato é formado e oxidado continuamente pelas células. A mesma célula que forma o lactato no citosol, oxida o mesmo na mitocôndria. Em estudo prévio VanLinden e colaboradores (2015) expressaram o transportador de NAD⁺ de *A. thaliana,* e observaram uma mudança metabólica de fosforilação oxidativa para glicólise, nossos dados sugerem que o mesmo ocorre quando a proteína Ndt1 de *A. fumigatus* foi expressa em células HEK293. Quando a proteína foi expressa em células com deficiência da citrina, essa mudança metabólica foi benéfica, uma vez que estas células apresentaram inibição da glicólise e a expressão de Ndt1 foi capaz de recuperar a glicólise nas mesmas. A redução de NAD⁺ a NADH mantém a glicólise, e

essa regeneração de NAD⁺ é catalisada pela lactato desidrogenase, a qual, pode levar a um aumento na concentração de lactato, como observado em células expressando a proteína Ndt1.

Na deficiência da citrina ocorre comprometimento da síntese da ureia. Isto seria decorrente do comprometimento no bombeamento de aspartato mitocondrial para o citosol, prejudicando dessa forma a formação de argininosuccinato, e reduzindo a síntese de ureia e com consequente aumento nos níveis de amônia (Saheki e Kobayashi, 2002; Saheki *et al.*, 2002; Saheki *et al.*, 2007). A redução na concentração de ureia no meio de cultura foi observada no modelo obtido nesse estudo, assim como, um aumento na concentração de amônia. A expressão de Ndt1 não foi capaz de aumentar a síntese de ureia e reduzir a concentração de amônia através do transporte de NAD⁺ para a mitocôndria. Assim, estes dados sugerem que a redução na concentração da razão NADH/NAD⁺ e aumento da via glicolítica, mas pode envolver outros mecanismos de re-oxidação de NADH.

No modelo *in vitro* de CTLN2 desse estudo, foi possível identificar e demonstrar as principais alterações bioquímicas que comprometem o metabolismo celular, tais como: aumento da razão NADH/NAD⁺ citosólica, inibição da glicólise, redução da concentração de ureia e aumento na concentração de amônia. A expressão heteróloga da proteína Ndt1 foi capaz de recuperar a respiração mitocondrial e aumentar a glicólise nas células com deficiência da citrina, melhorando dessa forma o metabolismo celular através do transporte de NAD⁺ para a matriz mitocondrial, e correção da razão NADH/NAD⁺ citosólica. No entanto, a expressão de Ndt1 não foi capaz de melhorar a concentração de amônia, ou seja reduzir as concentrações de amônia que é a principal alteração bioquímica que causa os sintomas e a morte dos pacientes. Nesse caso, a expressão heteróloga de Ndt1 pode ser uma alternativa para CTLN2, principalmente devido a melhora do metabolismo celular.



6. CONCLUSÃO

Nossos resultados permitem concluir:

- A proteína Ndt1 foi expressa e endereçada corretamente para as mitocôndrias das células HEK293;
- O knockdown do gene SLC25A13 que codifica a proteína citrina foi eficiente, reduzindo em 56% a expressão desse gene;
- Nosso modelo *in vitro* da CTLN2 possui algumas das principais características da CTLN2, tais como: aumento da razão NADH/NAD⁺; inibição da glicólise; redução na concentração de ureia e aumento na concentração de amônia;
- A expressão de Ndt1 em células com deficiência da citrina melhorou o metabolismo mitocondrial alterando principalmente:
 - redução da razão NADH/NAD+;
 - aumento da respiração mitocondrial;
 - aumento da atividade glicolítica.
- A expressão de Ndt1 e a suplementação do meio de cultura com piruvato 2 mM foi a melhor condição para recuperar o metabolismo mitocondrial e a atividade glicolítica;
- A expressão de Ndt1 não foi capaz de aumentar a concentração de ureia e reduzir a concentração de amônia;
- A expressão heteróloga de Ndt1 pode ser uma alternativa para a CTLN2, uma vez que recupera o metabolismo mitocondrial e a glicólise.

7 - Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amigo, I.; da Cunha, F.M.; Forni, M.F.; Garcia-Neto, W.; Kakimoto, P.A.; Luévano-Martínez, L.A.; Macedo, F.; Menezes-Filho, S.L.; Peloggia, J.; Kowaltowski, A.J., 2016. Mitochondrial form, function and signalling in aging. Biochemical Journal, v. 473, p. 3421-3449.
- Amora, Y.; Chevionb, M.; Levinea, A., 2000. Anoxia pretreatment cell death: possible involvement of peroxidases and of alternative oxidase. FEBS Letters, v. 477, p. 175-180.
- Anderson, R. M.; Bitterman, K.J.; Wood, J.G.; Medvedik, O.; Cohen, H.; Lin, S.S.; Manchester, J.K.; Gordon, J.I.; Sinclair, D.A., 2002. Manipulation of a nuclear NAD+ salvage pathway delays aging without altering steady-state NAD⁺ levels. The Journal of Biological Chemistry, v.277, p. 18881-18890.
- Anderson, R.G.; Ghiraldeli, L.P.; Pardee, T.S., 2018. Mitochondria in cancer metabolism, an organelle whose time has come? Biochimica Biophysica Acta – Reviews on Cancer.
- Archibald, J.M., 2015. Endosymbiosis and Eukaryotic Cell Evolution. Current Biology, v. 25; R911-R921.
- Baertling, F.; Sánchez-Caballero, L.; van den Brand, M.A.M.; Wintjes, L.T.; Brink, M.; van den Brandt, F.A.; Wilson, C.; Rodenburg, R.J.T.; Nijtmans, L.G., 2017.
 NDUFAF4 variants are associated with Leigh syndrome and cause a specific mitochondrial complex I assembly defect. European Journal of Human Genetics, v. 25, p. 1273-1277.
- Bakker, B. M.; Overkamp, K.M.; van Maris, A.J.; Kötter, P.; Luttik, M.A.; van Dijken,
 J.P.; Pronk, J.T., 2001. *et al.* Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiology Reviews, v.25, p.15-37.

- Balico, L.L.L.; Santos, E.S.; Suzuki-Hatano, S.; Sousa, L.O.; Azzolini, A.E.C.S.;
 Lucisano-Valim, Y.M.; Dinamarco, T.M.; Kannen, V.; Uyemura, S.A., 2017.
 Heterologous expression of mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide
 transporter (Ndt1) from *Aspergillus fumigatus* rescues impaired growth in
 Δ*ndt1*Δ*ndt1 Saccharomyces cerevisiae* strain. Journal of Bioenergetics and
 Biomembranes, v. 49, p. 423-435.
- Begum, L.; Jalil, M. A.; Kobayashi, K.; Iijima, M.; Li, M. X.; Yasuda, T.; Horiuchi, M.; del Arco, A.; Satrústegui, J.; Saheki, T., 2002. Expression of three mitochondrial solute carriers, citrin, aralar1 and ornithine transporter, in relation to urea cycle in mice. Biochimica et Biophysica Acta, v. 1574, p. 283-292.
- Bergmeyer, H.U., 1985. Methods of Enzymatic Analisis. VCH Puclishers, v. 9, p. 449-453, Florida.
- Bertero, E.; Maack, C., 2018. Calcium signaling and reactive oxygen species in mitochondria. Circulation Research, v. 122, p. 1460-1478.
- Blair, N.F.; Cremer, P.D.; Tchan, M.C., 2015. Urea cycle disorders: a life-threatening yet treatable cause of metabolic encephalopathy in adults. Practical Neurology, v. 15, p. 45-48.
- Bonitz, S.G.; Homison, G.; Thalenfels, B.E.; Tzagoloff, A.; Nobrega, F.G., 1982. Assembly of the mitochondrial membrane System: Processing of the apocytochrome *b* precursor RNAs in *Saccharomyces cerevisiae* D273-10B. The Journal of Biological Chemistry, v.257, n.11, p.6268-6274.
- Boyer, P. D.; Chance, B.; Ernster, L.; Mitchell, P.; Racker, E.; Slater, E.C., 1977.
 Oxidative phosporilation and photophosphorylation. Annual Reviews of Biochemistry, v.46, p.955-1026.

- Calegario, F.F.; Cosso, R.G.; Fagian, M.M.; Almeida, F.V.; Jardim, W.F.; Jezek, P.; Arruda, P.; Vercesi, A.E., 2003. Simulation of potato tuber respiration by cold stress is associated with an increased capacity of both plant uncoupling mitochondrial protein (PUMP) and alternative oxidase. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, v. 35., p. 211-220.
- Cavalheiro, R.A.; Fortes, F.; Borecký, J.; Faustinoni, V.C.; Schreiber, A.Z.; Vercesi,
 A.E., 2004. Respiration, oxidative phosphorylation, and uncoupling protein in *Candida albicans*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 37, p. 1455-1461.
- Crombez, E.A.; Cederbaum, S.D., 2007. Urea Cycle Disorders. Neurology and Clinical Neuroscience.
- Dassa, E. P.; Dufour, E.; Gonçalves, S.; Paupe, V.; Hakkaart, G. A. J.; Jacobs, H. T.; Rustin, P., 2008. Expression of the alternative oxidase complements cytochrome c oxidase deficiency in human cells. EMBO Molecular Medicine, v. 1, p. 30-36.
- David, J.; Okiro, J.O.; Murphy, K.; Elamin, M., 2017. Uncommon mutation in mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS). BMJ Case Reports.
- De Mello, A.H.; Costa, A.B.; Engel, J.D.G.; Rezin, G.T., 2018. Mitochondrial dysfunction in obesity. Life Science, v. 192, p. 26-32.
- Denu, J. M., 2003. Linking chromatin function with metabolic networks: Sir2 family of NAD⁺-dependent deacetylases. Trends in Biochemical Sciences, v. 28, p.41-48.
- Dimmock, D.; Kobayashi, K.; Iijima, M.; Tabata, A.; Wong, L-J.; Saheki, T.; Lee, B.; Scaglia, F., 2007. Citrin Deficiency: A novel cause of failure to thrive that responds to a high-protein, low-carbohydrate diet. Pediatrics 119, e773-e777.

- Di STEFANO, M.; CONFORTI, L., 2013. Diversification of NAD biological role: the importance of location. The FEBS Journal, v.280, p. 4711-4728.
- Du, L.; Zhang, X.; Han, Y.Y.; Burke, N.A.; Kochanek, P.M.; Watkins, S.C.; Graham, S.H.; Carcillo, J.A.; Szabó, C.; Clark, R.S., 2003. Intra-mitochondrial poly (ADPribosylation) contributes to NAD+ depletion and cell death induced by oxidative stress. The Jounal of Biological Chemistry, v.278, p.18426-18433.
- El-Khoury, R.; Dufour, E.; Rak, M.; Ramanantsoa, N.; Grandchamp, N.; Csaba, Z.;
 Duvillié, B.; Bénit, P.; Gallego, J.; Gressens, P.; Sarkis, C.; Jacobs, H. T.; Rustin,
 P., 2013. Alternative oxidase expression in the mouse enables bypassing cytochrome *c* oxidase blockade and limits mitochondrial ROS overproduction. Plos Genetics, v. 9.
- Farmer, T.; Naslavsky, N.; Caplan, S., 2018. Tying trafficking to fusion and fission at the mighty mitochondria. Traffic, v. 19, p. 569-577.
- Finkel, T.; Holbrook, N.J., 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature, v. 408, p. 239-247.
- Frezza, C.; Cipolat, S.; Scorrano, L., 2007. Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. Nature Protocol, v. 2, p. 287-295.
- Hadj-Moussa, H.; Green, S.R.; Storey, K.B., 2018. The living dead: mitochondria and metabolic arrest. IUBMB Life.
- Hanqing, F.; Kun, S.; Mingquan, L.; Hongyu, L.; Xin, L.; Yan, L.; Yifeng, W., 2010. The expression, function and regulation of mitochondrial alternative oxidase under biotic stresses. Molecular Plant Pathology, v. 11, p. 429-440.
- Hartley, J.L.; Temple, G.F.; Brasch, M.A., 2000. DNA cloning using *in vitro* site-specific recombination. Genome Research, v. 10, p. 1788-1795.

- Hatefi, Y., 1985. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorilation system. Annual Review of Biochemistry, v. 54, p.1015-1069.
- Hayasaka, K.; Numakura, C.; Toyota, K.; Kakizaki, S.; Watanabe, H.; Haga, H.;
 Takahashi, H.; Takahashi, Y.; Kaneko, M.; Yamakawa, M.; Nunoi, H.; Kato, T.; Ueno,
 Y.; Mori, M., 2014. Medium-chain triglyceride supplementation under a low-carbohydrate formula is a promising therapy for adult-onset type II citrullinemia.
 Molecular Genetics and Metabolism Reports, v. 1, p. 42-50.
- Hayasaka, K.; Numakura, C.; Yamakawa, M.; Mitsui, T.; Watanabe, H.; Haga, H.;
 Yazaki, M.; Ohira, H.; Ochiai, Y.; Tahara, T.; Nakahara, T.; Yamashiki, N.;
 Nakayama, T.; Kon, T.; Mitsubuchi, H.; Yoshida, H., 2018. Medium-chain triglycerides supplement therapy with a low-carbohydrate formula can supply energy and enhance ammonia detoxification in the hepatocytes of patients with adult-onset type II citrullinemia. Journal of Inherited Metabolic Disease, v. 41, p. 777-784.
- Hedden, M. P.; Buse, M. G., 1982. Effects of glucose, pyruvate, lactate, and amino acids on muscle protein synthesis. American Journal of Physiology, v. 242, p. E184-E192.
- Herrero-Yraola, A.; Bakhit, S.M.A.; Franke, P.; Weise, C.; Schweiger, M.; Jorcke, D.; Ziegler, M., 2001. Regulation of glutamate dehydrogenase by reversible ADPribosylation in mitochondria. The EMBO Journal, v.20, p.2404-2412.
- Iwata, S.; Lee, J. W.; Okada, K.; Lee, J.K.; Iwata, M.; Rasmussen, B.; Link, T.A.; Ramaswamy, S.; Jap, B.K., 1998. Complete Structure of the 11-Subunit Bovine Mitochondrial Cytochrome bc1 Complex. Science Magazine, v.281, p.64-71.

- Jarmuszkiewicz, W.; Sluse-Goffart, C. M.; Hryniewiecka, L.; Sluse, F.E., 1999. Identification and characterization of a protozoan uncoupling protein in *Acanthamoeba castellani.* Journal of Biological Chemistry, v. 274, p. 23198-23202.
- Jarmuszkiewicz, W.; Behrendt, M.; Navet, R.; Sluse, F.E., 2002. Uncoupling protein and alternative oxidase of *Dictyostelium discoideum*: occurrence, properties and protein expression during vegetative life and starvation-induced early development. FEBS Letters, v. 532, p. 459-444.
- Jarmuszkiewicz, W.; Milani, G.; Fortes, F.; Schreiber, A.Z.; Sluse, F.E; Vercesi, A.E., 2000. First evidence and characterization of an uncoupling protein in fungi kingdom: CpUCP of *Candida parapsilosis.* FEBS Letters, v. 467, p. 145-149.
- Jarmuszkiewicz, W.; Woyda-Ploszczyca, A.; Antos-Krzeminska, N.; Sluse, F.E., 2010. Mitochondrial uncoupling proteins in unicellular eukaryotes. Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics, v. 1797, p. 792-799.
- Kane, D. A., 2014. Lactate oxidation at the mitochondria: a lactate-malate-aspartate shuttle at work. Frontiers in Neuroscience, v. 8.
- Kelley, L.A.; Mezulis, S.; Yates, C.M.; Wass, M.N.; Sternberg, M.J., 2015. The Phyre2 web portal for the protein modeling, prediction and analysis. Nature Protocols, v. 10, p. 845-858.
- Kerscher, S.J., 2000. Diversity and origin of alternative NADH:ubiquinone oxidoreductases. Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics, v. 1459, p. 274-283.
- Kikuchi, A.; Arai-Ichinoi, N.; Sakamoto, O.; Matsubara, Y.; Saheki, T.; Kobayashi, K.;
 Ohura, T.; Kure, S., 2012. Simple and rapid genetic testing for citrin deficiency by screening 11 prevalent mutations in *SLC25A13*. Molecular Genetics and Metabolism, v. 105, p. 553-558.

- Kimura, K.; Kuwayama, H.; Amagai, A.; Maeda, Y., 2010. Developmental significance of cyanide-resistant respiration under stressed conditions: experiments in Dictyostelium cells. Development, Growth & Differentiation, v. 52, p. 645-656.
- Kobayashi, K.; Sinasac, D.S.; Iijima, M.; Boright, A.P.; Begum, L.; Lee, J.R.; Yasuda, T.; Ikeda, S.; Hirano, R.; Terazono, H.; Crackower, M.A.; Kondo, I.; Tsui, L.-C.; Scherer, S.W.; Saheki, T., 1999. The gene mutated in adult-onset type II citrullinemia encodes a putative mitochondrial carrier protein. Nature Genetics, v. 22, p. 159-163.
- Komatsu, M.; Kimura, T.; Yazaki, M.; Tanaka, N.; Yang, Y.; Nakajima, T.; Horiuchi, A.;
 Fang, Z.Z.; Joshita, S.; Matsumoto, A.; Umemura, T. Tanaka, E.; Gonzalez, F.J.,
 Ikeda, S.; Aoyama, T., 2015. Steatogenesis in adult-onset type II citrullinemia is
 associated with down-regulation of PPARα. Biochimica et Biophysica Acta, v. 1852,
 p. 473-481.
- Kowaltowski, A.J.; de Souza-Pinto, N.C.; Castilho, R.F.; Vercesi, A.E., 2009.
 Mitochondria and reactive oxygen species. Free Radical Biology and Medicine, v. 47, p. 333-343.
- Krebs, H.A., 1932. The discovery of the ornithine cycle of urea synthesis. Biochemical Education, v. 1, p. 19-23.
- Kulawiak, B.; Höpker, J.; Gebert, M.; Guiard, B.; Wiedemann, N.; Gebert, N., 2012. The mitochondrial protein import machinery has multiple connections to the respiratory chain. Biochimica et Biophysica Acta, v. 1827, p. 612-626.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, v. 227, p. 680-685.
- Landy, A., 1989. Dynamic, Structural, and Regulatory aspects of lambda site-specific recombination. Annual Review of Biochemistry, v. 58, p. 913-949.

- La Noue, K.F.; Williamson, J.R., 1971. Interrlation between malate-aspartate shuttle and citric acid cycle in rat heart mitochondria. Metabolism: Clinical and Experimental, v. 20, p. 119-140.
- Larsen, S.B.; Hanss, Z.; Krüger, R., 2018. The genetic architecture of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. Cell and Tissue Research, v. 373, p. 31-37.
- Lehninger, A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M. M., 1993. Oxidative phosphorylation and photophosphorylation. In: Princyples of Biochemistry. New York, Worth Publishers, Inc., p. 542-597.
- Leonard, J.V.; Morris, A.A.M., 2002. Urea cycle disorders. Seminars in Neonatology, v. 7, p. 27-35.
- Lin, H.; Kwan, A. L.; Dutcher, S. K., 2010. Synthesizing and Salvaging NAD⁺: Lessons Learned from *Chlamydomonas reinhardtii*. PLOS Genetics, v.6, p.1-15.
- Lin, S. J.; Guarente, L., 2003. Nicotinamide adenine dinucleotide, a metabolic regulator of transcription, longevity and disease. Current Opinion in Cell Biology, v.15, p.241-246.
- Lu, Y. B.; Kobayashi, K.; Ushikai, M.; Tabata, A.; Iijima, M.; Li, M. X.; Lei, L.; Kawabe,
 K.; Taura, S.; Yang, Y.; Liu, T-T.; Chiang, S-H.; Hsiao, K-J.; Lau, Y-L.; Tsui, L-C.;
 Lee, D. H.; Saheki, T., 2005. Frequency and distribution in East Asia of 12 mutations
 identified in the *SLC25A13* gene of Japanese patients with citrin deficiency. Journal
 of Human Genetics, v. 50, p. 338-346.
- Luévano-Martínez, L.A.; Moyano, E.; de Lacoba, M.G.; Rial, E.; Uribe-Carvajar, S., 2010. Identification of the mitochondrial carrier that provides *Yarrowia lipolytica* with a fatty acid-induced and nucleotide-sensitive uncoupling protein-like activity. Biochimica et Biophysica Acta, v. 1797, p. 81-88.

- Macdonald, R.; Barnes, K.; Hastings, C.; Mortiboys, H., 2018. Mitochondrial abnormalities in Parkinson's disease and Alzheimer's disease: can mitochondria be targeted therapeutically? Biochemical Society Transactions, v. 46, p. 891-909.
- McDonell. M.W., Simon, M.N.; Studier, F.W., 1977. Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral alkaline gels. Journal of Molecular Biology, v. 110, p. 119-146.
- Magnani, T.; Soriani, F.M.; Martins, V.P.; Nascimento, A.P.; Tudella, V.G.; Curti, C.; Uyemura, S.A., 2007. Cloning and functional expression. Of the mitochondrial alternative oxidase of *Aspergillus fumigatus* and its induction by oxidative stress. FEMS Microbiology Letters, v. 271, p. 230-238.
- Manjunath, N.; Wu, H.; Subramanya, S.; Shankar, P., 2009. Lentiviral delivery of short hairpin RNAs. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 61, p. 732-745.
- Manickam, A.H.; Michael, M.J.; Ramasamy, S., 2017. Mitochondrial genetics and therapeutic overview of Leber's hereditary optic neuropathy. Indian Journal of Ophthalmology, v. 65, p. 1087-1092.
- Marella, M.; Seo, B. B.; Nakamaru-Ogiso, E.; Greenamyre, J. T.; Matsuno-Yagi, A.; Yagi, T., 2008. Protection by the *NDI1* gene against neurodegeneration in a rotenone rat model of Parkinson's disease. Plos One.
- Marella, M.; Seo, B. B.; Yagi, T.; Matsuno-Yagi, A., 2009. Parkinson's disease and mitochondrial complex I: a perspective on the Ndil therapy. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, v. 41, p. 493-497.
- Marella, M.; Seo, B. B.; Flotte, T. R.; Matsuno-Yagi, A.; Yagi, T., 2011. No immune responses by the expression of the yeast Ndi1 protein in rats. Plos One.
- Margulis, L. On the Origin of Mitosing Cells, 1967. Journal of Theoretical Biology, v. 14, p. 225-274.

- Martins, V.P.; Soriani, F.M.; Magnani, T.; Tudella, V.G.; Goldman, G.H.; Curti, C.;
 Uyemura, S.A., 2008. Mitochondrial function in the yeast formo f the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, v. 40, p. 297-305.
- Martins, V.P.; Dinamarco, T.M.; Curti, C.; Uyemura, S.A., 2011. Classical and alternative components of the mitochondrial respiratory chain in pathogenic fungi as potential therapeutic targets. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, v. 43, p. 81-88.
- McKenna, M. C.; Hopkins, I. B.; Lindauer, S. L.; Bamford, P., 2006. Aspartate aminotransferase in synaptic and nonsynaptic mitochondria: Differential effect of compounds that influence transient hetero-enzyme complex (metabolon) formation. Neurochemistry International v.48, p.629-636.
- McMurray, W. C.; Mohyuddin, F.; Rossiter, R. J.; Rathbun, J. C.; Valentine, G. H.; Koegler, S. J.; Zarfas, D. E., 1962. Citrullinuria, a new aminoacidura associated with mental retardation. The Lancet, v.1, pp. 138.
- Meijer, A. J.; Gimpel, J. A.; Deleeuw, G.; Tischler, M. E.; Tager, J. M.; Williamson, J.
 R., 1978. Interrelationships between gluconeogenesis and ureogenesis in isolated hepatocytes. The Journal of Biological Chemistry, v. 253, p. 2308-2320.
- Meyer, A.; Laverny, G.; Bernardi, L.; Charles, A.L.; Alsaleh, G.; Pottecher, J.; Sibilia,J.; Geny, B., 2018. Mitochondria: an organelle of bacterial origin controlling inflammation. Frontiers in Immunology, v. 9.
- Mitchell, P., 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. Nature, v.191, p. 144-148.
- Miyazaki, T.; Nagasaka, H.; Komatsu, H.; Inui, A.; Morioka, I.; Tsukahara, H.; Kaji, S.; Hirayama, S.; Miida, T.; Kondou, H.; Ihara K.; Yagi, M.; Kizaki, Z.; Bessho, K.;

Kodama, T.; Iijima, K.; Yorifuji, T.; Matsuzaki, Y.; Honda, A., 2018. Serum Amino acid profiling in citrin-deficient children exhibiting normal liver function during the apparently healthy period. JIMD Reports.

- Mondzaac, A.; Ehrlich, G.E.; Seegmiller, J.E., 1965. An enzymatic determination of ammonia in biological fluids. The Journal of Laboratory and Clinical Medicine, v. 66, p. 526-531.
- Moore, A.L.; Siedow, J.N., 1991. The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. Biochimica et Biophysica Acta Bioenergetics, v. 1059, p.121-140.
- Moore, C.B.; Guthrie, E.H.; Huang, M.T.-H.; Taxman, D.J., 2010. Short Hairpin RNA (shRNA): design, delivery, and assessment of gene knockdown. Methods in Molecular Biology, v. 629, p. 141-158.
- Moriyama, M.; Li, M. X.; Kobayashi, K.; Sinasac, D. S.; Kannan, Y.; Iijima, M.; Horiuchi,
 M.; Tsui, L-C.; Tanaka, M.; Nakamura, Y.; Saheki, T., 2006. Pyruvate ameliorates
 the defect in ureogenesis from ammonia in citrin-deficient mice. Journal of
 Hepatology, v. 44, p. 930-938.
- Mutoh, K.; Kurokawa, K.; Kobayashi, K.; Saheki, T., 2008. Treatment of a citrindeficient patient at the early stage of adult-onset type II citrullinemia with arginine and sodium pyruvate. Journal of Inherited Metabolic Disease. v. 31, p. S343-S347.
- Naini, A.B.; Lu, J.; Kaufmann, P.; Bernstein, R.A.; Mancuso, M.; Bonilla, E.; Hirano, M; DiMauro, S., 2005. Novel Mitochondrial DNA ND5 mutation in a patient with clinical features of MELAS and MERRF. JAMA Neurology, v. 62, p. 473-476,.
- Nicholls, D.G.; Darley-Usmar, V.M.; Wu, M.; Jensen, P.B.; Rogers, G.W.; Ferrick, D.A.,
 2010. Bioenergetic Profile Experiment using C2C12 Myoblast Cells. Journal of
 Visualized Experiments, v. 46.

- Nielsen, T.T.; Støttrup, N.B.; Løfgren, B.; Bøtker, H.E., 2011. Metabolic fingerprint of ischaemic cardioprotection: importance of the malate-aspartate shuttle. Cardiovascular Research, v. 91, p. 3421-3449.
- Olson, A.; Anfinsen, C.B., 1953. Kinetic and equilibrium studies on crystalline Lglutamic acid dehydrogenase. The Journal of Biological Chemistry, v. 202, p. 841-856.
- Onyango, P.; Celic, I.; McCaffery, J.M.; Boeke, J.D.; Feinberg, A., 2002. SIRT3, a human SIR2 homologue, is an NAD-dependent deacetylase localized to mitochondria. Proceedings of the National Academy of Science, v.99, p.13653-13658.
- Palmieri, F.; Pierri, C.L.; De Grassi, A..; Nunes-Nesi, A.; Fernie, A.R., 2011. Evolution, structure and function of mitochondrial carriers: review with new insights. The Plant Journal, v. 66, p. 161-181.
- Palmieri, F.; Pierri, C. L., 2009. Structure and function of mitochondrial carriers role of the transmembrane helix P and G residues in the gating and transport mechanism.
 FEBS Letters, v. 584, p. 1931-1939.
- Palmieri, F.; Rieder, B.; Ventrella, A.; Blanco, E.; Do, P. T.; Nunes-Nesi, A.; Trauth, A. U.; Fiermonte, G.; Tjaden, J.; Agrimi, G.; Kirchberger, S.; Paradies, E.; Fernie, A. R.; Neuhaus, H. E., 2009. Molecular Identification and Functional Characterization of *Arabidopsis thaliana* Mitochondrial and Chloroplastic NAD⁺ Carrier Proteins. The Journal of Biological Chemistry, v. 284, p. 31249-31259.
- Palmieri, F., 2008. Diseases caused by defects of mitochondrial carriers: a review. Biochimica et Biophysica Acta, v. 1777; p. 564-578.
- Palmieri, L.; Pardo, B.; Lasorsa, F. M.; Arco, A. del; Kobayashi, K.; Iijima, M.; Runswick,M. J.; Walker, J. E.; Saheki, T.; Satrústegui, J.; Palmieri, F., 2001. Citrin and aralar

are Ca²⁺-stimulated aspartate/glutamate transporters in mitochondria. The EMBO Journal, v. 20, p. 5060-5069.

- Panel, M.; Ghaleh, B.; Morin, D., 2018. Mitochondria and aging: a role for the mitochondrial transition pore? Aging Cell, v. 17, p. 1-15.
- Park, J. S.; Li, Y.; Bai, Y., 2007. Yeast NDI1 improve oxidative phosphorylation capacity and increases protection against oxidative stress and cell death in cells carrying a Leber's hereditary optic neuropathy mutation. Biochimica et Biophysica Acta, v. 1772, p. 533-542.
- Pattnaik, B.R.; Asuma, M.P.; Spott, R.; Piller, D.-A., 2012. Genetic defects in the hotspot of inwardly rectifying K+ (Kir) channels and their metabolic consequences: a review. Molecular Genetics Metabolism, v. 105, p. 64-72.
- Penfound, T.; Foster, J. W., 1996. NAD-Dependent DNA-Binding Activity of the Bifunctional NadR Regulator of *Salmonella typhimurium*. Journal of Bacteriology, v.181, p.648-655.
- Perales-Clemente, E.; Bayona-Bafaluy, M. P.; Pérez-Martos, A.; Barrientos, A.; Fernández-Silva, P.; Enriquez, J. A., 2008. Restoration of electron transport without proton pumping in mammalian mitochondria. PNAS. V. 105, p. 18735-18739.
- Petkova, I.; Mateva, L.; Beniozef, D.; Petrov, K.; Thorn, W., 2000. Sodium pyruvate infusions in patients with alcoholic liver disease. Acta Physiologica Pharmacology, v. 25, p. 103-108.
- Rabier, D.; Kamoun, P., 1995. Metabolism of citrulline in man. Amino Acids, v. 9, p. 299-316.
- Rao, D.D.; Vorhies, J.S.; Senzer, N.; Nemunaitis, J., 2009. siRNA vs. shRNA: Similarities and differences. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 61, p. 746-759.

- Rasmusson, A. G.; Muller, I. M., 2006. Multiple Energy-Conservation Bypasses in Oxidative Phosphorylation of Plant Mitochondria. Plant Phisiology.
- Ricquier, D.; Bouillaud, F., 2000. The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. Biochemical Journal, v. 345, p. 161-179.
- Rogozin, I.B.; Pavlov, Y.I., 2003. Theoretical analysis of mutation hotspots and their DNA sequence context specificity. Mutation Research, v. 544, p. 65-85.
- Saheki, T.; Iijina, M.; Li, M.X.; Kobayashi, K.; Horiuchi, M.; Ushikai, M.; Okumura, F.;
 Meng, X.J.; Inoue, I.; Tajima, A.; Moriyama, M.; Eto, K.; Kadowaki, T.; Sinasac, D.S.;
 Tsui, L-C.; Tsuji, M.; Kobayashi, T., 2007. Citrin/Mitochondrial glycerol-3-phosphate
 dehydrogenase double knock-out mice recapitulate features of human citrin
 deficiency. The Journal of Biological Chemistry, v. 282, p. 25041-25052.
- Saheki, T.; Inoue, K.; Ono, H.; Tushima, a.; Katsura, N.; Yokogawa, M.; Yoshidumi, Y.;
 Kuhara, T.; Ohse, M.; Eto, K.; Kadowaki, T.; Sinasac, D. S.; Kobayashi, K., 2011.
 Metabolomic analysis reveals hepatic metabolite pertubations in citrin/mitochondrial
 glycerol-3-phosphate dehydrogenase double-knockout mice, a model of human
 citrin deficiency. Molecular Genetics and Metabolism, v. 104, p. 492-500.
- Saheki, T.; Inoue, K.; Tushima, A.; Mutoh, K.; Kobayashi, K., 2010. Citrin deficiency and current treatment concepts. Molecular Genetics and Metabolism, v. 100, p. S59-S64.
- Saheki, T.; Kobayashi, K.; Terashi, M.; Ohura, T.; Yanagawa, Y.; Okano, Y.; Hattori,
 T.; Fujimoto, H.; Mutoh, K.; Kizaki, Z.; Inui, A., 2008. Reduced carbohydrate intake
 in citrin-deficient subjects. Journal of Inherited Metabolic Disease, v. 31, p. 386-394.
- Saheki, T.; Iijina, M.; Li, M.X.; Kobayashi, K.; Horiuchi, M.; Ushikai, M.; Okumura, F.; Meng, X.J.; Inoue, I.; Tajima, A.; Moriyama, M.; Eto, K.; Kadowaki, T.; Sinasac, D.S.; Tsui, L-C.; Tsuji, M.; Kobayashi, T., 2007. Citrin/Mitochondrial glycerol-3-phosphate

dehydrogenase double knock-out mice recapitulate features of human citrin deficiency. The Journal of Biological Chemistry 282, 25041-25052.

- Saheki, T.; Kobayashi, K., 2002. Mitochondrial aspartate glutamate carrier (citrin) deficiency as the cause of adult-onset type II citrullinemia (CTLN2) and idiopathic neonatal hepatitis (NICCD). Journal of Human Genetics, v. 33, p. 333-341.
- Saheki, T.; Kobayashi, K.; Iijima, M.; Horiuchi, M.; Begum, L.; Jalil, M.A.; Li, M.X.; Lu, Y.B.; Ushikai, M.; Tabata, A.; Moriyama, M.; Hsiao, K-J.; Yang, Y., 2004. Adult-onset type II citrullinemia and idiopathic neonatal hepatitis caused by citrin deficiency: involvement of the aspartate glutamate carrier for urea synthesis and maintenance of the urea cycle. Molecular Genetics and Metabolism, v. 81, p. S20-S26.
- Saheki, T.; Kobayashi, K.; Iijima, M.; Nishi, I.; Yasuda, T.; Yamaguchi, N.; Gao, H. Z.;
 Jalil, M. A.; Begum, L.; Li, M. X., 2002. Pathogenesis and pathophysiology of citrin
 (a mitochondrial aspartate glutamate carrier) deficiency. Metabolic Brain Diseases,
 v. 17, p. 335-346.
- Saheki, T.; Song, Y.Z., 2005. Citrin Deficiency. In Adam, M.P.; Ardinger, H.H.; Pagon,R.A.; Wallace, S.E.; Bean, L.J.H.; Stephens, K.; Amemiya, A., editors.GeneReviews, Seattle (WA): University of Washington.
- Saiki, R.K.; Scharf, S.; Faloona, F.; Mullis, K.B.; Horn, G.T.; Erlich, H.A.; Arnheim, N, 1985. Enzymatic amplification of β-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science, v.230, p.1350-1354.
- Sakamuri, S.S.V.P.; Sperling, J.A.; Sure, V.N.; Dholakia, M.H.; Peterson, N.R.; Rutkai,
 I.; Mahalingam, P.S.; Satou, R.; Katakam, P.V.G., 2018. Measurement of respiratory
 function in isolated cardiac mitochondria using SeaHorse XFe24 Analyzer:
 applications for aging research. GeroScience, v. 40, p. 347-356.

- Sambrook, J.; Green, M.R., 1989. Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R., 1977. DNA sequencing with chains-terminating inhibitors. PNAS, v. 74, p. 5463-5467.
- Savory, J.; Kaplan, A., 1966. A gas chromatographic method for the determination of lactic acid in blood. Clinical Chemistry, v. 12, p. 559-569.
- Schon, E. A.; DiMauro, S.; Hirano, M.; Gilkerson, R.W., 2010. Therapeutic prospects for mitochondrial disease. Trends Molecular Medicine, v. 16, p.268-276.
- Semighini, C.P.; Marins, M.; Goldman, M.H.S.; Goldman, G.H., 2002. Quantitative analysis of the relative transcript levels of ABC transporter Atr genes in *Aspergillus nidulans* by real-time reverse transcription-PCR assay. Applied Environmental Microbiology, v. 68, p. 1351-1357.
- Seo, B. B.; Nakamaru-Ogiso, E.; Flotte, T. R.; Matsuno-Yagi, A.; Yagi, T., 2006. *In vivo* complementation of complex I by the yeast Ndi1 enzyme. The Journal of Biological Chemistry, v. 281, p. 14250-14255.
- Silzer, T.K.; Phillips, N.R., 2018. Etiology of type 2 diabetes and Alzheimer's disease: Exploring the mitochondria. Mitochondrion.
- Sinasac, D.S.; Moriyama, M.; Jalil, M.A.; Begum, L.; Li, M.X.; Iijima, M.; Horiuchi, M.; Robinson, B.H.; Kobayashi, K.; Saheki, T.; Tsui, L-C., 2004. *Slc25a13*-knockout mice harbor metabolic deficits but fail to display hallmark of adult-onset type II citrullinemia. Molecular and Cellular Biology, v. 24, p. 527-536.
- Smith, P.K.; Krohn, R.I.; Hermanson, G.T.; Mallia, A.K.; Gartner, F.H.; Provenzano,
 M.D.; Fujimoto, E.K.; Goeke, N.M.; Olson, B.J.; Klenk, D.C., 1985. Measurement of
 protein using bicinchoninic acid. Anal Biochemistry, v. 150, p. 76-85.

- Song, Y.-Z.; Deng, M.; Chen, F.-P.; Wen, F.; Guo, L.; Cao, S.-L.; Gong, J.; Xu, H.; Jiang, G.Y.; Zhong, L.; Kobayashi, K.; Saheki, T.; Wang, Z.-N., 2011. Genotypic and phenotypic features of citrin deficiency: five-year experience in a Chinese pediatric center. International Journal of Molecular Medicine, v. 28, p. 33-40.
- Srivastava, S., 2016. Emerging therapeutic roles for NAD⁺ metabolism in mitochondrial and age-related disorders. Clinical and Translational Medicine, v. 5.
- Stumvoll, M.; Meyer, C.; Mitrakou, A.; Gerich, J.E., 1999. Important role of the kidney in human carbohydrate metabolism. Medical Hypotheses, v. 52, p. 363-366.
- Summar M., 2001. Current strategies for the management of neonatal urea cycle disorders. Journal of Pediatrics, v. 138, p.S30–39.
- Tamamori, A.; Okano, Y.; Ozaki, H.; Fujimoto, A.; Kajiwara, M.; Fukusa, K.; Kobayashi,
 K.; Saheki, T.; Tagami, Y.; Yamano, T., 2002. Neonatal intrahepatic cholestasis
 caused by citrin deficiency: severe hepatic dysfunction in an infant requiring liver
 transplantation. European Journal of Pediatrics, v. 161, p. 609-613.
- TeSlaa, T.; Teitell, M.A., 2014. Techniques to Monitor Glycolysis. Methods Enzymology, v. 542, p. 91-114.
- Thomas, P.; Smart, T.G., 2005. HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, v. 51, p. 187-200.
- Thorbun, D.R., 2004. Mitochondrial diseases: not so rare after all. Internal Medicine Journal, v.34, p.3-5.
- Todisco, S.; Agrimi, G.; Castegna, A.; Palmieri, F., 2006. Identification of the mitochondrial NAD⁺ transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. The Journal of Biological Chemistry, v. 281, p. 1524-1531.

- Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, T., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, v. 76, p. 4350-4354.
- Tudella, V.G.; Curti, C.; Soriani, F.M.; Santos, A.C.; Uyemura, S.A., 2004. In situ evidence of na alternative oxidase and na uncoupling protein in the respiratory chain of *Aspergillus fumigatus*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, v. 36, p. 162-172.
- Uyemura, S.A.; Luo, S.; Moreno, S.N.J.; Docampo, R., 1999. Oxidative phosphorylation, Ca²⁺ transport, and fatty acid-induced uncoupling in malaria parasites mitochondria. The Journal of Biological Chemistry, v. 275, p. 9709-9715.
- VanLinden, M. R.; Dölle, C.; Pettersen, I. K. N.; Kulikova, V. A.; Niere, M.; Agrimi, G.;
 Dyrstad, S. E.; Palmieri, F.; Nikiforov, A. A.; Tronstad, K. J.; Ziegler, M., 2015.
 Subcellular distribution of NAD⁺ between cytosol and mitochondria determines the metabolic profile of human cells. The Journal of Biological Chemistry, v. 290, p. 27644-27659.
- Vercesi, A.E.; Kowaltowski, A.J.; Grijalba, M.T.; Meinicke, A.R.; Castilho, R.F., 1997. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. Bioscience Reports, v. 17.
- Vercesi, A.E.; Castilho, R.F.; Kowaltowski, A.J.; de Oliveira, H.C.F.; de Souza-Pinto, N.C.; Figueira, T.R.; Busanello, E.N.B., 2018. Mitochondrial calcium transport and the redox nature of the calcium-induced membrane permeability transition. Free Radical Radical Biology & Medicine, v. 129, p. 1-24.
- Wakino, S.; Hasegawa, K.; Itoh, H., 2015. Sirtuin and metabolic kidney disease. Kidney International, v. 88, p. 691-698.

- Wallace, D.C., 1999. Mitochondrial Diseases in Man and Mouse. Science, v. 283, p.1482-1488.
- Wallace, D.C., 2005. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. Annual Review of Genetics, v. 39, p. 359-407.
- Watford, M., 2003. The urea cycle. Biochemistry and Molecular Biology Education, v. 31, p. 289-297.
- Westgard, J.O.; Lahmeyer, B.L.; Birnbaum, M.L., 1972. Use of the Du Pont "Automatic Clinical Analyzer" in Direct Determination of Lactic Acid in Plasma Stabilized with Sodium Fluoride. Clinical Chemistry, v. 18, p. 1334-1338.
- Williamson, J. R., 1976. Role of anion transport in the regulation of metabolism. In: Hanson, R. W. and Mehlman, M. A. (eds.), Gluconeogenesis: Its Regulation in Mammalian Species, Wiley, New York, p. 165-238.
- Wohlrab, H., 2005. The human mitochondrial transport protein family: identification and protein regions significant for transport function and substrate specificity. Biochimica et Biophysica Acta, v. 1709, p. 157-168.
- Woo, H.I.; Park, H.-D.; Lee, Y.-W., 2014. Molecular genetics of citrullinemia type I and II. Clinica Chimica Acta, v. 431, p. 1-8.
- Wu, M.; Neilson, A.; Swift, A. L.; Moran, R.; Tamagnine, J.; Parslow, D.; Armistead, S.; Lemire, K.; Orrell, J.; Teich, J.; Chomicz, S.; Ferrick, D. A., 2007. Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells. American Journal of Physiology, v. 292, p. C125-C136.

- Yagi, T.; Seo, B. B.; Nakamaru-Ogiso, E.; Marella, M.; Barber-Singh, J.; Yamashita,
 T.; Matsuno-Yagi, A., 2006. Possibility of transkingdom gene therapy for Complex I diseases. Biochimica et Biophysica Acta, v.1757, p. 708-714.
- Yagi, T.; Seo, B. B.; Nakamaru-Ogiso, E.; Marella, M.; Barber-Singh, J.; Yamashita,
 T.; Kao, M. C.; Matsuno-Yagi, A., 2006. Can a single subunit yeast NADH dehydrogenase (Ndi1) remedy diseases caused by respiratory complex I defects?
 Rejuvenation Research, v. 9, p. 191-197.
- Yang, S.J.; Huh, J.W.; Lee, J.E.; Choi, S.Y.; Kim, T.U.; Cho, S.W., 2003. Inactivation of human glutamate dehydrogenase by aluminum. Cellular and Molecular Life Sciences, v. 60, p.2538-2546.
- Yasuda, T.; Yamaguchi, N.; Kobayashi, K.; Nishi, I.; Horinouchi, H.; Jalil, M.A.; Li, M.X.;
 Ushikai, M.; Iijima, M.; Kondo, I.; Saheki, T., 2000. Identification of two novel mutations in the SLC25A13 gene and detection of seven mutations in 102 patients with adult-onset type II citrullinemia. Human Genetics, v. 107, p. 537-545.
- Ying, W., 2008. NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in Cellular Functions and Cell Death: Regulation and Biological Consequences. Antioxidants & Redox Signaling, v. 10, p. 179-198.
- Yun, J.; Finkel, T., 2014. Mitohormesis. Cell Metabolism, v. 19, p. 757-766.
- Zeidler, J.D.; Fernandes-Siqueira, L.O.; Carvalho, A.S.; Cararo-Lopes, E.; Dias, M.H.S.; Ketzer, L.A.; Galina, A.; Poian, A.T., 2017. Short-term starvation is a strategy to unravel the cellular capacity of oxidizing specific exogenous/endogenous substrates in mitochondria. Journal of Biological Chemistry, v. 292, p. 14176-14187.
- Zhou, W.; Ramachandran, D.; Mansouri, A.; Dailey, M.J., 2017. Glucose stimulates intestinal epithelial crypt proliferation by modulating cellular energy metabolism. Cellular Physiology, p. 1-11.

8 - Apéndices

8. APÊNDICES

8.1. OCR, ECAR e concentração de lactato das linhagens shC/Controle e shC/Ndt1

As figuras 38 a 41 apresentam os dados de OCR das linhagens celulares shC/Controle e shC/Ndt1.



Figura 38. OCR em células shC/Controle e shC/Ndt1. A respiração mitocondrial foi determinada pelo OCR após a adição sequencial de oligomicina (oligo) 3 μ M, CCCP 1 μ M, rotenona (Rot) 1 μ M acrescido com antimicina A (AA) 1 μ M.

- A Respiração mitocondrial em meio de cultura com glicose 5 mM;
- B Respiração mitocondrial quantificada a partir dos dados obtidos em A;
- C Respiração mitocondrial em meio de cultura com glicose 25 mM;

D - Respiração mitocondrial quantificada a partir dos dados obtidos em C.

Os valores foram normalizados pela concentração de proteína total. Os dados representam média ± erro padrão de três experimentos independentes. *, p < 0,01 *versus* Controle.


Figura 39. OCR em células shC/Controle e shC/Ndt1, suplementação com piruvato 2mM. A respiração mitocondrial foi determinada pelo OCR após a adição sequencial de oligomicina (oligo) 3 μM, CCCP 1 μM, rotenona (Rot) 1 μM acrescido com antimicina A (AA) 1 μM.

A – Respiração mitocondrial em meio de cultura com glicose 5 mM;

B – Respiração mitocondrial quantificada a partir dos dados obtidos em A;

C – Respiração mitocondrial em meio de cultura com glicose 25 mM;

D - Respiração mitocondrial quantificada a partir dos dados obtidos em C.



Figura 40. OCR em células shC/Controle e shC/Ndt1, suplementação com aspartato 2mM. A respiração mitocondrial foi determinada pelo OCR após a adição sequencial de oligomicina (oligo) 3 μ M, CCCP 1 μ M, rotenona (Rot) 1 μ M acrescido com antimicina A (AA) 1 μ M.

A – Respiração mitocondrial em meio de cultura com glicose 5 mM;

B – Respiração mitocondrial quantificada a partir dos dados obtidos em A;

C - Respiração mitocondrial em meio de cultura com glicose 25 mM;

D - Respiração mitocondrial quantificada a partir dos dados obtidos em C.



Figura 41. OCR em células shC/Controle e shC/Ndt1, suplementação com arginina 2mM. A respiração mitocondrial foi determinada pelo OCR após a adição sequencial de oligomicina (oligo) 3 μ M, CCCP 1 μ M, rotenona (Rot) 1 μ M acrescido com antimicina A (AA) 1 μ M.

A – Respiração mitocondrial em meio de cultura com glicose 5 mM;

B - Respiração mitocondrial quantificada a partir dos dados obtidos em A;

C – Respiração mitocondrial em meio de cultura com glicose 25 mM;

D – Respiração mitocondrial quantificada a partir dos dados obtidos em C.

Α В 150 Glicólise Capacidade Glicolítica ECAR (mpH/min/mg proteina) Acidificação Não-glicolítica 200 2DG Oligo ECAR (mpH/min/mg proteína) shC/Controle 100 150 shC/Ndt1 100 50 50 0 0 30 60 90 shC/Controle shC/Ndt1 Tempo (minutos) С D 150 Glicólise Capacidade Glicolítica ECAR (mpH/min/mg proteína) Acidificação Não-glicolítica 200 Oligo 2DG ECAR (mpH/min/mg proteína) shC/Controle 100 150 shC/Ndt1 100 50 50 0 0-30 60 90 shC/Controle shC/Ndt1 Tempo (minutos)

As figuras 42 a 45 apresentam os dados de ECAR das linhagens shC/Controle e shC/Ndt1.

Figura 42. ECAR em células shC/Controle e shC/Ndt1. A glicólise foi determinada pelo ECAR após a adição sequencial de oligomicina (oligo) 3 µM e 2-deoxiglicose (2DG) 100 mM.

A - ECAR em meio de cultura com glicose 5 mM;

B – ECAR quantificado a partir dos dados obtidos em A;

C - ECAR em meio de cultura com glicose 25 mM;

D - ECAR quantificado a partir dos dados obtidos em C.



Figura 43. ECAR em células shC/Controle e shC/Ndt1, suplementação com piruvato 2 mM. A glicólise foi determinada pelo ECAR após a adição sequencial de oligomicina (oligo) 3 µM e 2-deoxiglicose (2DG) 100 mM.

A – ECAR em meio de cultura com glicose 5 mM;

B - ECAR quantificado a partir dos dados obtidos em A;

C - ECAR em meio de cultura com glicose 25 mM;

D – ECAR quantificado a partir dos dados obtidos em C.



Figura 44. ECAR em células shC/Controle e shC/Ndt1, suplementação com aspartato 2 mM. A glicólise foi determinada pelo ECAR após a adição sequencial de oligomicina (oligo) 3 µM e 2-deoxiglicose (2DG) 100 mM.

A – ECAR em meio de cultura com glicose 5 mM;

B – ECAR quantificado a partir dos dados obtidos em A;

C – ECAR em meio de cultura com glicose 25 mM;

D – ECAR quantificado a partir dos dados obtidos em C.



Figura 45. ECAR em células shC/Controle e shC/Ndt1, suplementação com arginina 2 mM. A glicólise foi determinada pelo ECAR após a adição sequencial de oligomicina (oligo) 3 µM e 2-deoxiglicose (2DG) 100 mM.

A – ECAR em meio de cultura com glicose 5 mM;

B – ECAR quantificado a partir dos dados obtidos em A;

C – ECAR em meio de cultura com glicose 25 mM;

D – ECAR quantificado a partir dos dados obtidos em C.



As figuras 46 e 47 apresentam a concentração de lactato extracelular linhagens shC/Controle e shC/Ndt1.

Figura 46. Concentração de lactato extracelular em células shC/Controle e shC/Ndt1.

A – Concentração de lactato extracelular em meio de cultura com glicose 5 mM;

B - Concentração de lactato extracelular em meio de cultura com glicose 25 mM;

C – Concentração de lactato extracelular em meio de cultura com glicose 5 mM e piruvato 2mM;

D – Concentração de lactato extracelular em meio de cultura com glicose 25 mM e piruvato 2mM.





Figura 47. Concentração de lactato extracelular em células shC/Controle e shC/Ndt1, suplementação com aspartato ou arginina.

A - Concentração de lactato extracelular em meio de cultura com glicose 5 mM e aspartato 2 mM;

B - Concentração de lactato extracelular em meio de cultura com glicose 25 mM e aspartato 2 mM;

C – Concentração de lactato extracelular em meio de cultura com glicose 5 mM e arginina 2mM;

D - Concentração de lactato extracelular em meio de cultura com glicose 25 mM e arginina 2mM.

Os valores foram normalizados pela concentração de proteína total. Os dados representam média ± erro padrão de três experimentos independentes.

8.2. Concentração de ureia e amônia das linhagens shC/Controle e shC/Ndt1

As figuras 48 e 49 apresentam a concentração de ureia extracelular das linhagens shC/Controle e shC/Ndt1.



Figura 46. Concentração de ureia extracelular em células shC/Controle e shC/Ndt1 em meio de cultura com glicose 5 mM.

A - Sem suplementação;

B - Suplementação com piruvato 2 mM;

C - Suplementação com aspartato 2 mM;

D – Suplementação com arginina 2 mM.



Figura 49. Concentração de ureia extracelular em células shC/Controle e shC/Ndt1 em meio de cultura com glicose 25 mM.

A – Sem suplementação;

B - Suplementação com piruvato 2 mM;

C - Suplementação com aspartato 2 mM;

D – Suplementação com arginina 2 mM.



As figuras 50 e 51 apresentam a concentração de amônia intracelular das linhagens shC/Controle e shC/Ndt1.

Figura 50. Concentração de amônia intracelular em células shC/Controle e shC/Ndt1 em meio de cultura com glicose 5 mM.

A - Sem suplementação;

B - Suplementação com piruvato 2 mM;

C - Suplementação com aspartato 2 mM;

D – Suplementação com arginina 2 mM.



Figura 51. Concentração de amônia intracelular em células shC/Controle e shC/Ndt1 em meio de cultura com glicose 25 mM.

A - Sem suplementação;

B - Suplementação com piruvato 2 mM;

C - Suplementação com aspartato 2 mM;

D - Suplementação com arginina 2 mM.

8.3. Meios de Cultivo

8.3.1. YG

Glicose	2,0% (p/v)
Extrato de levedura	0,5% (p/v)
Solução de elementos traços	0,1% (v/v)

As substâncias que compõem o meio foram dissolvidas em água destilada e o pH foi ajustado para 7,0. O meio foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 kgf/cm² por 20 minutos. Para o meio sólido (YAG) foi acrescentado ágar 2,0% (p/v) antes da autoclavagem.

8.3.2. LB (Lúria Bertani)

Triptona	1,0% (p/v)
Extrato de levedura	0,5% (p/v)
NaCl	1,0% (p/v)

As substâncias que compõem o meio foram dissolvidas em água destilada e o pH foi ajustado para 7,0. O meio foi esterilizado por calor úmido em a 120°C e 1 Kgf/cm² por 20 minutos. Para o meio sólido foi acrescentado ágar 1,5% (p/v) antes da autoclavagem.

8.3.3. SOC

Triptona	2,0% (p/v)
Extrato de levedura	0,5,% (p/v)
NaCl	10,0 mmol/L
KCI	2,0 mmol/L
MgCl ₂	10,0 mmol/L
Glicose	20,0 mmol/L

O meio SOB é o meio SOC sem a adição de glicose.

As substâncias que compõem, exceto MgCl₂ e glicose, foram dissolvidas em água destilada. O meio foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 Kgf/cm² por 20 minutos. Na hora do uso, foram adicionados MgCl₂ e glicose, a partir de soluções estoque previamente esterilizadas.

8.3.4. TB

Extrato de levedura	2,4% (p/v)
Triptona	1,2% (p/v)
Glicerol	0,4% (p/v)
KH ₂ PO ₄	17,0 mmol/L
K2HPO4	72,0 mmol/L

As substâncias que compõem o meio foram dissolvidas em água destilada. O meio foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 kgf/cm² por 20 minutos. Após o resfriamento, foi adicionado ao meio uma solução estéril de KH₂PO₄ 0,17 M/K₂HPO₄ 0,72 M previamente esterilizada.

8.4. Soluções, tampões e reagentes

8.4.1. Tampão salina fosfato (PBS)

NaCl	0,14 mol/L
KCI	2,7 mmol/L
Na ₂ HPO ₄	8,1 mmol/L
KH2PO4	1,5 mmol/L

As substâncias que compõem o tampão foram dissolvidas em água destilada e o pH foi ajustado para 7,4. O tampão foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 kgf/cm² por 20 minutos.

8.4.2. Tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE)

EDTA	10,0 mmol/L
Tris-acetato pH 8,0	40,0 mmol/L

As substâncias que compõem o tampão foram dissolvidas em água destilada e o pH foi ajustado para 8,0. Em seguida o tampão foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120ºC e 1 kgf/cm² por 20 minutos.

8.4.3. Tampão de amostra para DNA

EDTA	10,0 mmol/L
Tris-HCI pH 7,5	10,0 mmol/L
Azul de bromofenol	0,25% (p/v)
Xileno Cianol FF	0,25% (p/v)
Orange G	0,25% (p/v)
Sacarose	0,65% (p/v)

8.4.4. Tampão de amostra para SDS-PAGE

B-mercaptoetanol	2,0% (v/v)
Tris-HCl pH 6,8	62,5 mmol/L
Glicerol	10,0% (v/v)
SDS	2,0% (p/v)
Azul de bromofenol	0,1% (p/v)

8.4.5. SDS-PAGE

Gel de empilhamento 5%

Acrilamida/Bis-acrilamida	5,0% (p/v)
Tris-HCl pH 6,8	125,0 mmol/L
SDS	0,1% (p/v)
Persulfato de amônio	0,1% (p/v)
TEMED	0,1% (v/v)

Gel de separação 10%

Acrilamida/Bis-acrilamida	10,0% (p/v)
Tris-HCl pH 8,8	400,0 mmol/L
SDS	0,1% (p/v)
Persulfato de amônio	0,1% (p/v)
TEMED	0,1% (v/v)

8.4.6. Tampão de corrida Tris-Glicina pH 8,3 Tris-HCl pH 8,3..... 25,0 mmol/L Glicina..... 250,0 mmol/L SDS..... 0,1% (p/v)

8.4.7. Tampão de transferência

Na ₂ CO ₃	50,0 mmol/L
NaHCO ₃	50,0 mmol/L

8.4.8. TBS-T

Tris-HCl pH 7,6	0,02 mol/L
NaCl	140,0 mmol/L
Tween 20	0,1% - 0,5% (v/v)

9 - Anexos

9. ANEXOS

9.1. Mapa dos vetores

As figuras 52 e 53 apresentam os mapas dos vetores utilizados para as clonagens em células de mamíferos.



Figura 52. Mapa do vetor pDONR™/Zeo (Invitrogen).



Figura 53. Mapa do vetor pcDNA3.1/nV5-DEST™ (Invitrogen).