JANAINA AREIAS PAULELA

CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS DE *Saccharomyces cerevisiae* DEFICIENTES NA BIOSÍNTESE DA COENZIMA Q

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências, pelo Programa Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Dr. Mário Henrique de Barros

Versão Original

São Paulo
2017

RESUMO

PAULELA, J. A. **Caracterização de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* deficientes na biossíntese da Coenzima Q.** 2017. 122 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Coenzima Q (CoQ) é uma molécula de função essencial na transferência de elétrons da cadeia respiratória mitocondrial. Em *Saccharomyces cerevisiae*, a CoQ é constituída por um anel de benzeno associado a uma cadeia poliprenil, com 6 unidades de repetição, sendo por isso também denominada CoQ₆ ou Q₆. Ao todo já foram identificados treze genes (*COQ1 – COQ11*, *ARH1* e *YAH1*) nucleares necessários para biossíntese da CoQ. A maioria dos produtos Coq estão fisicamente associados em um complexo biossintético ancorado na membrana mitocondrial interna. Neste projeto, tentamos descrever resíduos relevantes de Coq3p e Coq7p aliando análises de bioinformática com testes fenotípicos para balizamento funcional. Coq7p é uma proteína com dois centros de ferro com íons carboxilato e catalisa a hidroxilação de demetoxi-Q₆ (DMQ₆). Neste estudo, indicamos um grupo de resíduos que modulam a atividade e a estabilidade de Coq7p: D53, R57, V111 e S114. Enquanto R57, V111 e S114 são resíduos muito conservados, V111 e S114 estão correlacionados em comunidades de coevolução. Aqui, demonstramos também que o duplo mutante S114A, V111G e o mutante S114E apresentam deficiência respiratória em temperatura não permissiva, além de acumularem o intermediário DMQ₆ e sintetizarem baixas quantidades de Q₆, concluindo assim que o fosfomimético S114E inibe a atividade Coq7p. Dessa forma, propomos que a fosforilação do resíduo S114 promove o deslocamento de uma alça entre as hélices 2 e 3, afetando assim a atividade do centro catalítico Coq7p. Por sua vez, Coq3p atua como uma metiltransferase, catalisando diferentes passos durante a biossíntese da CoQ. Aqui, identificamos resíduos que colaboram para a atividade funcional de Coq3p: E123, S125, C131, G133, G134, H165, D203, E219, K258 e S262. Mutantes carregando as alterações E123A, H165A, D203A, E219A, K258A e S262A apresentam discreto crescimento respiratório e expressão de Coq3p similares à da linhagem selvagem, além de acumularem baixas quantidades de Q₆. Enquanto C131, G133 e G134 são resíduos altamente conservados, localizados em uma alça no espaço entre fitas beta, no provável sítio ativo da proteína, mutantes C131A, G133A e G134A se superexpressos apresentam crescimento respiratório em meio contendo fonte de carbono não fermentável, além de acumularem Q₆ compatíveis com os níveis de expressão proteica. Propomos assim um modelo para Coq3p, tendo os resíduos C131, G133 e G134 como centro catalítico de Coq3p.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*. Coenzima Q. Mutagênese sítio-dirigida. COQ7. COQ3.

ABSTRACT

PAULELA, J. A. **Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains deficient in the biosynthesis of Coenzyme Q.** 2017. 122 f. Ph. D. Thesis (Doctorate in Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Coenzyme Q (CoQ) is a molecule of essential function in the transfer of electrons of the mitochondrial respiratory chain. In *Saccharomyces cerevisiae*, CoQ is constituted by a benzene ring associated with a polyprenyl chain with 6 repetition units, being therefore also denominated CoQ₆ or Q₆. Thirteen nuclear genes have already been identified (*COQ1 – COQ11*, *ARH1* and *YAH1*) required for coenzyme Q biosynthesis. Most of Coq products are physically associated in a biosynthetic complex anchored at the mitochondrial internal membrane. In this project, we identified Coq3p and Coq7p residues relevant for their respective role in CoQ synthesis combining bioinformatics analyzes with phenotypic tests for functional mapping. Coq7p is a carboxylate-bridged di-iron protein that catalyzes the hydroxylation of demethoxy-Q₆ (DMQ₆), the last monooxygenase step in the synthesis of CoQ. In this study, we found a group of residues that modulate the activity and stability of Coq7p: D53, R57, V111 and S114. While R57, V111 and S114 are highly conserved residues, V111 and S114 are correlated in communities of coevolution. We also demonstrate that the double mutant S114A, V111G and the mutant S114E have respiratory deficiency at non-permissive temperature, in addition to accumulating of the intermediate DMQ₆ and low amounts of Q₆, thus concluding that phosphomimetic S114E inhibits the activity of Coq7p. Hence, we propose that the phosphorylation of S114 is required to move a loop between helices 2 and 3, thus affecting the activity of the catalytic center Coq7p. For its part, Coq3p acts as a methyltransferase, catalyzing different steps during biosynthesis of CoQ. Here we identified residues that collaborate for functional activity of Coq3p: E123, S125, C131, G133, G134, H165, D203, E219, K258 and S262. Mutants E123A, H165A, D203A, E219A, K258A and S262A, have mild respiratory growth, and expression of Coq3p levels similar to the wild strain, in addition to accumulating low amounts of Q₆. While C131, G133, and G134 are residues highly conserved, located in a loop in the space between beta sheets, the overexpression of the mutants C131A, G133A and G134A present respiratory growth in medium containing non-fermentable carbon source, in addition to accumulate Q₆ compatible with the levels of protein expression. We propose a model for Coq3p, with residues C131, G133 and G134 as part of Coq3p catalytic center.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*. Coenzyme Q. Site-directed mutagenesis. COQ7. COQ3.

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudo da biogênese mitocondrial

Saccharomyces cerevisiae é um fungo unicelular leveduriforme, utilizado há mais de 6.000 anos antes de Cristo, nas primeiras civilizações humanas, para a produção de bebidas como vinho e cerveja e na fermentação de massas (FELDMANN, 2010).

A levedura foi introduzida como um organismo experimental por Hershel Roman, em 1930 (FELDMANN, 2010). ÖWinge foi o primeiro a demonstrar a alternância de gerações de *S. cerevisiae* em fases haplóide e diplóide; as haplóides existindo em dois tipos sexuais: “a” e “α” (WINGE, 1935). Foi Lindegren o primeiro a identificar a existência de cepas heterotáticas, isto é, que mantinham o seu tipo sexual; também descreveu as mudanças morfológicas pelas quais passam células de levedura durante seu ciclo de vida (LINDEGREN, 1943). Já em 1949, Boris Ephrussi percebeu a existência de colônias pequenas e brancas que surgiam espontaneamente, as quais nomeou “*petites*”; além do tamanho, essas colônias também se caracterizavam pela incapacidade de crescimento em meio de cultura contendo fonte de carbono não fermentável (EPHRUSSI, 1949). Ao final da década de 70, os estudos genéticos usando *S. cerevisiae* como modelo ganharam grande impulso com o desenvolvimento de técnicas de transformação com DNA recombinante exógeno, tal qual já era realizado em *Escherichia coli* (FELDMANN, 2010; SHERMAN, 1992).

Figura 1 – Células de *Saccharomyces cerevisiae*.

Em A é possível observar células diploides da levedura expressando proteínas nucleares, através de microscopia de fluorescência. Em B as leveduras estão sofrendo divisão. As células têm diâmetro de aproximadamente 5µm. Adaptado de: Duina; Miller e Keeney (2014).

Com organização celular semelhante às demais células eucariotas, as leveduras pertencem ao grupo dos ascomicetos, e apresentam parede celular composta por quitina e outros açúcares; membrana celular composta por ergosterol; não apresentam centríolos e a divisão celular ocorre por brotamento. Cada broto de levedura recebe uma cópia de todos os cromossomos nucleares da célula-mãe, incluindo parte do citoplasma, mitocôndrias e outras organelas. Como mencionado anteriormente, as células de *S. cerevisiae*, na forma haplóide, possuem dois tipos sexuais, designados “a” e “α”, que ao entrarem em contato físico têm parte de seus núcleos fundidos, gerando zigotos diplóides. Imediatamente em seguida, ocorrem duas meioses, originando quatro núcleos haplóides, que se dividem por mitose, produzindo quatro esporos haplóides, estes ficam arranjados no interior do asco em tetraedro, refletindo as duas divisões meióticas e a única divisão mitótica (Figura 1B). Em laboratório é possível estimular o processo formador de esporos haplóides, através do uso de meio de cultura contendo acetato de potássio (KAc) como fonte de carbono e, após dois dias nessa condição de cultura, há ascas suficientes para dissecação e separação dos esporos por micromanipulação (HERSKOWITZ, 1988).

Assim, diversas características favoreceram o estabelecimento de *S. cerevisiae* como modelo para funcionamento da célula eucariótica: os dois tipos sexuais opostos permitem cruzamentos diretos, extremamente úteis em estudos genéticos de alelismo e dominância; a disponibilidade de diferentes tipos de plasmídeos e a recombinação homóloga criaram um versátil e único sistema em possibilidades para manipulação genética; é facilmente cultivada em meio definido, favorecendo o controle sobre interferências químicas e físicas; seu tempo de geração na fase exponencial de crescimento é de aproximadamente 90 minutos em meio rico, permitindo a alta disponibilidade de indivíduos para realização de experimentos e acarretando em um baixo custo para a manutenção das linhagens (OHLMEIER et al., 2003; SCHWIMMER et al., 2006). Finalmente, *S. cerevisiae* foi o primeiro eucarioto a ter seu genoma totalmente sequenciado (GOFFEAU et al., 1996) levando ao pioneirismo nos estudos "ômicos" (FELDMANN, 2010; GERSHON; GERSHON, 2000; GOFFEAU et al., 1996).

Além de permitir nosso melhor entendimento sobre as diversas funções de uma célula eucariótica, por ser um organismo aeróbio facultativo, *S. cerevisiae* é um modelo amplamente utilizado em estudos sobre a biogênese mitocondrial; mutantes mitocondriais deste organismo podem sobreviver em fontes de carbono fermentáveis,

usando a energia formada na conversão de glicose em piruvato, durante o processo de glicólise, e dessa forma não dependem do ATP gerado pela fosforilação oxidativa. A maioria dos genes que codificam proteínas mitocondriais são altamente conservados entre os eucariotos (KRUFTH et al., 2001; RABILLOUD et al., 1998), assim, o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na biogênese mitocondrial em levedura auxilia a compreensão desse processo em eucariotos mais complexos (FOURY; KUCEJ, 2001; GOFFEAU et al., 1996; OHLMEIER et al., 2004).

1.2 A mitocôndria

A mitocôndria (Figura 2) é uma organela que desempenha função central em diversos processos celulares, sendo mais conhecida pelo suprimento celular de energia metabólica na forma de ATP, gerado pelo sistema de fosforilação oxidativa (SARASTE, 1999), além de atuar em diversas reações catabólicas e anabólicas, incluindo o ciclo do ácido cítrico, a β -oxidação de ácidos graxos, a biossíntese dos grupamentos heme e ferro-enxofre (BONAWITZ et al., 2007; HOLZENBERGER et al., 2003; WINDE; GRIVELL, 1993), além de atuar como regulador-chave da morte celular programada (TAIT; GREEN, 2010) e do envelhecimento celular (LARSSON, 2010; WALLACE, 2005).

Figura 2 - Morfologia Mitocondrial.

1 – Célula eucariótica; (a) - Esquema representativo de uma mitocôndria, indicando seus compartimentos: matriz, crista, membrana interna e membrana externa; (b) – Microscopia eletrônica de mitocôndria, indicando seus compartimentos, assim como no esquema (a). Adaptado de Tortora; Funke; Case (2017).

De acordo com a teoria endossimbionte, proposta inicialmente em 1967 por Lynn-Margulis (SAGAN, 1967), as mitocôndrias presentes em organismos eucariontes resultam da simbiose entre uma α -proteobactéria, capaz de utilizar o oxigênio da atmosfera, e uma arquea anaeróbica metanogênica, que obtinha energia exclusivamente através da via glicolítica (DOLEZAL et al., 2006), ocorrendo o intercâmbio do ATP produzido aerobicamente pelo simbiote e compostos orgânicos fornecidos pelo hospedeiro anaeróbico, resultando na transferência de genes mitocondriais para o núcleo do hospedeiro, como resultado da seleção natural contrária aos efeitos lesivos dos radicais livres produzidos pela nova organela (ALLEN; RAVEN, 1996).

A mitocôndria é envolta por duas membranas que delimitam compartimentos distintos. A membrana interna delimita a matriz mitocondrial, enquanto o espaço entre elas é conhecido como espaço intermembranas. A membrana externa permite a livre difusão de moléculas de até ~5 KDa, e contém moléculas da proteína de transporte porina e outras proteínas que formam os complexos TOM (do inglês, "*Translocase Outer Membrane*" – transportador de membrana externa), que importam as proteínas necessárias ao funcionamento da organela, além de regular o mecanismo de fissão (quando há divisão celular) e fusão (quando duas células se tocam e trocam material genético). A membrana interna, impermeável a íons, possui os complexos respiratórios responsáveis pela fosforilação oxidativa (Complexo I a V) e possui as proteínas TIM (do inglês, "*Translocase Inner Membrane*" – transportador de membrana interna) que regulam a importação de proteínas e metabólitos da membrana interna para a matriz mitocondrial (RYAN; HOOGENRAAD, 2007).

O espaço intermembranas possui fatores que controlam a apoptose (morte celular programada) (SUSIN et al., 1999), e é o local onde se forma o gradiente de prótons durante o processo de transferência de elétrons da cadeia respiratória (ALBERTS et al., 2002; RYAN; HOOGENRAAD, 2007).

Nas invaginações formadas na membrana interna, chamadas cristas mitocondriais, está localizado o sistema de fosforilação oxidativa (SCHAFFER; SULEIMAN, 2007; TZAGOLOFF, 1982), abrigando proteínas que controlam a passagem de metabólitos, além da ATP-sintase e outras proteínas dos complexos respiratórios, responsáveis pela captação de elétrons dos substratos NADH e FADH₂, gerados pelo ciclo de Krebs (DIMMER et al., 2002; RYAN; HOOGENRAAD, 2007).

A matriz mitocondrial é solúvel, e é onde ocorre a replicação e transcrição do DNA mitocondrial (mtDNA); a síntese dos centros Ferro/Enxofre (BONAWITZ et al., 2007; HOLZENBERGER et al., 2003); o ciclo de degradação de proteínas (ALBERTS et al., 2002; LEHNINGER et al., 2004), além de ser também onde se encontram as enzimas como, por exemplo, as envolvidas no ciclo do ácido cítrico, da β -oxidação de ácidos graxos e da oxidação de aminoácidos.

1.2.1 DNA mitocondrial (mtDNA)

Uma das principais características da mitocôndria é possuir genoma próprio, que codifica poucos peptídeos componentes essenciais dos complexos da cadeia respiratória (BARRIENTOS, 2003; BARROS, 2010; WALLACE et al., 2005; XING et al., 2007).

Conforme mencionado anteriormente, estudos realizados por Boris Ephrussi, em 1949, através do emprego do composto mutagênico acriflavina, resultaram na descoberta de uma mutação, herdada citoplasmaticamente, que promovia uma deficiência da função respiratória, o que permitiu concluir que a morfogênese mitocondrial é controlada por um elemento genético não cromossomal, denominado fator (*rho*). Células *rho*⁰ são caracterizadas por apresentar ausência total de DNA mitocondrial, enquanto células que apresentam genoma mitocondrial contendo grandes deleções são denominadas *rho*-. Mutantes *rho*- ou *rho*⁰ são deficientes respiratórios e incapazes de crescer em um meio com fonte de carbono não fermentável, como o etanol e o glicerol.

Observado e relatado pela primeira vez por Schatz e colaboradores, em 1964, o DNA mitocondrial (mtDNA) de *S. cerevisiae* codifica três subunidades da citocromo c oxidase (COX1, COX2 e COX3), três subunidades da ATP-sintase (ATP6, ATP8 e ATP9), uma subunidade da ubiquinol citocromo c redutase (COB1), uma proteína ribossomal (VAR1), além dos RNAs ribossomais e transportadores, que permitem a síntese de uma pequena fração de suas proteínas, dependendo da importação das demais, codificadas pelo DNA nuclear (SCHWIMMER et al., 2006; XING et al., 2007).

Mamíferos possuem DNA mitocondrial com tamanho médio de 16 kb, que codifica 37 genes, sendo 2 rRNA (RNA ribossômico), 22 tRNA (RNA transportador) e 13 polipeptídeos, incluindo a ATP-sintase 6 e ATP-sintase 8 e componentes dos complexos I, III e IV (COX1, 2 e 3, CytB e 7 subunidades NADH-CoQ redutase) (ROTIG, 2010; SCHWIMMER et al., 2006). *S. cerevisiae* apresenta um DNA

mitocondrial com aproximadamente 85 kb, empacotado no interior de uma estrutura nucleóide globular com um diâmetro médio de ~ 0,3 µm nas células aeróbicas, onde pode existir de 1 a 2 genomas mitocondriais (CHEN; BUTOW, 2005). Aproximadamente 2/3 do genoma mitocondrial de leveduras consiste de sequências não codificantes como introns e sequências intergênicas (ORFs).

A imensa maioria do proteoma mitocondrial (~1200 proteínas) é proveniente do processo traducional do citoplasma e importadas para o interior da organela pelo sistema TOM-TIM. Os complexos respiratórios são os únicos complexos enzimáticos da célula cuja biogênese depende da informação decodificada por dois genomas, o que aumenta a complexidade de sua montagem havendo a constante necessidade da comunicação entre núcleo e mitocôndria (CHEN; BUTOW, 2005; FALKENBERG et al., 2007; FOURY et al., 1998; KELLY; SCARPULLA, 2004; WONG, 2010;).

1.2.2 Cadeia Respiratória

O sistema de fosforilação oxidativa (Figura 3) é composto por uma série de carregadores responsáveis pela catálise da transferência de elétrons provenientes das oxidações das moléculas de alimento.

Figura 3 - Complexos da cadeia respiratória mitocondrial.

As setas em vermelho indicam o fluxo de elétrons através dos componentes da cadeia respiratória mitocondrial. Os elétrons derivados do NADH e succinato são transferidos para o oxigênio molecular por meio de uma série de carregadores presentes na membrana mitocondrial interna. O gradiente eletroquímico (setas cinza), gerado pela transferência de elétrons, impulsiona a síntese de ATP por meio do complexo da ATP-sintase. Adaptado de: Sazanov e colaboradores (2015).

O complexo I (NADH-ubiquinona oxidoreductase) constitui o maior complexo da cadeia respiratória, com cerca de 42 subunidades diferentes, sendo inibido por

rotenona (GRANDIER-VAZEILLE et al., 2001). *S.cerevisiae*, entretanto, não possui esse complexo, apresentando duas NADH desidrogenases (Nde1p e Nde2p), localizadas no espaço intermembranas (LUTTICK et al., 1998) e uma NADH desidrogenase (Ndi1p), localizada na matriz mitocondrial (MARRES et al., 1991), sendo as três enzimas responsáveis pelo acoplamento da oxidação do NADH com a redução da ubiquinona (BAKKER et al., 2001).

O complexo II (succinato: ubiquinona oxidoredutase) transfere elétrons recebidos do FADH₂ e participa do ciclo de Krebs (LEHNINGER et al., 2004). Os complexos I e II doam os elétrons recebidos para uma coenzima lipossolúvel, a coenzima Q (LÓPEZ-LLUCH et al., 2010), que, por sua vez, assume a forma reduzida (ubiquinol) e os transfere para o complexo III (ubiquinona: citocromo c oxidoredutase) (BARRIENTOS et al., 2002; ROTIG, 2010).

O complexo III possui como centros catalíticos o citocromo *b*, citocromo *c1* e o centro Ferro/Enxofre *de Rieske*, além de permitir a passagem de íons de hidrogênio para o espaço intermembrana. Do complexo III, os elétrons passam para o citocromo *c*, e este passa os elétrons para o complexo IV (citocromo *c* oxidase), que possui como centros catalíticos os centros metálicos CuA, CuB, os hemes *a* e *a3*. O complexo IV faz a redução do oxigênio em água (SARASTE, 1999).

Ao contrário de outros fungos, *S. cerevisiae* não apresenta uma oxidase alternativa (AOX), insensível ao cianeto, que catalisa a oxidação da ubiquinona diretamente pelo oxigênio molecular, sem gerar a força próton-motor (VANLERBERGHE; MCINTOSH, 1997). A passagem dos elétrons do complexo I para o complexo IV resulta na transferência de prótons da membrana para o espaço intermembrana, gerando um gradiente eletroquímico, que força a volta dos prótons para a matriz mitocondrial pelo poro do complexo V (composto pelo complexo F₁ associado ao complexo F₀, ambos componentes da ATP-sintase), fosforilando o ADP em ATP (BERG et al., 2008; LEHNINGER et al., 2004; MUSTER et al., 2010; SARASTE, 1999; SCHIMMER et al., 2006).

1.3 Coenzima Q

A coenzima Q (CoQ) foi isolada e caracterizada pela primeira vez em procariotos por Festenstein e colaboradores, em 1955; é uma molécula lipofílica, carregadora de elétrons, e presente praticamente em todos os seres vivos. Dada a sua ubiquidade, também é conhecida como ubiquinona, e sua síntese envolve uma

série de modificações realizadas a partir da junção do ácido hidroxibenzóico, derivado de aminoácidos aromáticos como, por exemplo, a tirosina, com uma cadeia isoprenóide, derivada do mevalonato (revisto em TRAN; CLARKE, 2007).

O tamanho da cadeia isoprenóide varia entre os seres vivos: em bactérias é possível encontrar cadeias curtas, com duas unidades de repetição; em levedura, com seis unidades; em humanos, com dez unidades. Assim, comumente nos referimos à Coenzima Q humana como Q₁₀ e, à de leveduras e bactérias, como Q₆ e Q₂, respectivamente. Localizada na mitocôndria, a coenzima é encontrada em três estados redox durante sua ação na cadeia respiratória mitocondrial: completamente oxidada (ubiquinona), o radical semiquinona (ubisemiquinona) e completamente reduzida (ubiquinol) (LENAZ et al., 2007; LENAZ; GENOVA, 2009).

Em *S. cerevisiae*, a CoQ (Q₆) realiza o transporte de elétrons entre as NADH desidrogenases, succinato desidrogenase (complexo II), e o complexo *bc1* (complexo III) da cadeia respiratória mitocondrial (GLOOR; WISS, 1958, HATEFI, 1985; LENAZ et al., 2007). Além de atuar na transferência de elétrons, a Q₆ participa no controle da abertura dos poros de transição da membrana mitocondrial; regula a atividade das proteínas desacopladoras (BENTINGER et al., 2010) e também atua como importante antioxidante, impedindo a oxidação de lipídeos, proteínas e DNA (BENTINGER et al., 2007).

Durante a década de 60, foram realizados ensaios empregando a Q₂ na oxidação da difosfopiridina reduzida (DPNH), e a elevada velocidade de oxidação da DPNH não foi considerada como resultado da colisão durante o transporte da cadeia de elétrons, mas sim devido à ação da Q₂ adicionada (GREEN; HATEFI, 1961).

Em 1975, Mitchell propôs o ciclo de regeneração da Coenzima Q (ciclo Q próton motivo): elétrons provenientes dos complexos I e II atravessam a membrana interna mitocondrial, fornecendo dois prótons para o espaço intermembrana, e paralelamente ocorre a transferência de elétrons para a proteína ferro-enxofre (FeS, proteína *Rieske*) do complexo III - (ubiquinol citocromo c redutase ou complexo *bc1*), que transfere os elétrons da Coenzima Q para o citocromo c, resultando em uma semiquinona desprotonada (Q[•]), sendo esta um radical livre tóxico e impermeável à membrana, que deve doar o segundo elétron para o grupo heme *bL*, formando uma quinona (Q) (COVIAN et al., 2007; TRUMPOWER, 1990).

A energia liberada pela passagem dos elétrons em seus centros catalíticos, para bombear prótons para o espaço intermebrana, auxilia o gradiente eletroquímico

necessário à formação de ATP, sendo que a redução da ubiquinona ocorre no sítio “N”, e a reoxidação do ubiquinol no sítio “P” (TRUMPOWER, 1990).

A biossíntese da Coenzima Q, em *S. cerevisiae*, é realizada por uma série de enzimas da matriz mitocondrial, algumas das quais estão associadas em um grande complexo biossintético ancorado na membrana mitocondrial interna (revisto em TRAN; CLARKE, 2007).

Até o momento foram descritos ao menos 13 genes de levedura (*COQ1-COQ11*, *ARH1* e *YAH1*) envolvidos na biossíntese da Q₆ (Figura 4).

Figura 4 - Organização do complexo biossintético da Coenzima Q.

Coq8p é necessário para a fosforilação de Coq3p, Coq5p e Coq7p. Essas proteínas imunoprecipitam em um complexo contendo Coq6p. Coq11p imunoprecipita em complexo contendo as proteínas Coq4p, Coq5p e Coq7p. Coq1p, Coq2p e Coq10p não estão associadas a complexos protéicos (Adaptado de: ALLAN et al., 2015).

Em *S. cerevisiae*, mutantes *coq* são deficientes respiratórios, incapazes de crescer em meio com fonte de carbono não fermentável, como o glicerol ou o lactato, sendo essa capacidade restaurada quando há adição de Q₆ ao meio (DO et al., 2001; JONASSEN et al., 1998). Outra maneira de se comprovar a deficiência específica na biossíntese de Q₆ de um dado mutante respiratório de levedura é a partir do estudo do consumo de oxigênio de mitocôndrias isoladas, que pode ser restaurado nos mutantes *coq* pela adição de Q₂ sintética (TZAGOLOFF; DIECKMANN, 1990).

Na espécie humana, a Q₁₀ atua também comoceptor de elétron para o glicerol-3-fosfato, colina, sarcosina, sulfetos, aminoácidos, lipídeos e enzimas, como a acil-acetil-CoA desidrogenase (HILDEBRANDT ; GRIESHABER, 2007; LENAIZ; DE SANTIS, 1985).

Na biossíntese de Q₆ (Figura 5), a cadeia isoprenóide é gerada pela ação de Coq1p, seguida pela conversão do poliprenil-fosfato em 4-hidroxibenzoato (4HB), sendo que em humanos essa atividade é realizada pelos genes *PDSS1* e *PDSS2*. As cadeias poliisoprenóides são providas pelo dimetildifosfato e isoprenil difosfato, ambos precursores de cinco carbonos, derivados da acetil-coenzima A na via do mevalonato (GRUNLER et al., 1994). O 4-hidroxibenzoato (4HB) é derivado da tirosina, um aminoácido essencial em eucariotos mais complexos (MEGANATHAN, 2001). Entretanto, em levedura, o 4HB também pode ser sintetizado através da via do corismato (GOEWERT, 1980 *apud* TRAN; CLARKE, 2007).

Coq2p funciona como âncora desses polipeptídeos, catalisando a ligação da cadeia isoprenóide ao 4-hidroxibenzoato (4HB), convertendo-o em ácido 3-hexaprenil-4-hidroxibenzóico (HHB), da mesma forma que o gene *UbiA* em *Escherichia coli* (SUZUKI et al., 1994); além de catalisar a conversão do ácido para-aminobenzóico (pABA) em ácido 3-hexaprenil-4-aminobenzóico (HAB), (ASHBY; EDWARDS, 1990; HSIEH et al., 2007; TAUCHE et al., 2008; XIE et al., 2012). A partir daqui, seguem-se reações de metilações e hidroxilações do anel hidroxibenzóico até a formação da Q₆ madura (TRAN; CLARKE, 2007; PIERREL et al., 2010),

Análises eletroforéticas de extratos mitocondriais solubilizados com digitonina demonstraram que Coq2p, Coq3p, Coq4p, Coq7p e Coq9p formariam um complexo multienzimático de alta massa molecular, ancorado na membrana interna da mitocôndria (HSIEH et al., 2007). Estudos similares realizados em mutantes nulos para essas proteínas mostraram a instabilidade do complexo na ausência de um dos componentes (HSIEH et al., 2007; TRAN et al., 2006). Esses ensaios foram complementados pela análise de co-imunoprecipitação e cromatografia por filtração em gel, em que foi possível observar que Coq3p, Coq4p, Coq6p, Coq7p e Coq8p dependem da expressão de cada um dos outros genes *COQ* (HSIEH et al., 2007; MARBOIS et al., 2005), uma vez que problemas na expressão de qualquer um dos componentes do complexo afeta a estabilidade de todo o complexo (GIN; CLARKE, 2005; HSU et al., 2000).

Mutantes *coq7* tem baixos níveis de Coq3p, Coq4p e Coq9p entre outros (BUSSO et al., 2015; TRAN et al., 2006), sendo Coq4p necessário para manter a estabilidade de Coq7p (BELOGRUDOV et al., 2001). Coq6p atua como uma monooxigenase flavina-dependente, e depende de reações de óxido-redução desencadeadas por Yah1p (uma ferredoxina) e Arh1p (ferredoxina redutase) (GIN et

al., 2003; OZEIR et al., 2011; PIERREL et al., 2010; TRAN; CLARKE, 2007). Coq9p é necessário para a substituição de grupos amina pelo grupo hidroxila, além de atuar junto a Coq6p e Coq7p (XIE et al., 2012). Coq5p catalisa a C-metiltransferase e Coq7p catalisa a hidroxilação do intermediário DMQ₆, o penúltimo passo na formação da Q₆ (MARBOIS; CLARKE, 1996; STENMARK et al., 2001).

A montagem do complexo multienzimático formado por Coq3p, Coq4p, Coq6p, Coq7p, e Coq9p ocorre em duas etapas sequenciais: primeiro é formado um intermediário de 700 Kda, responsável pela síntese do intermediário dimetoxi-Q₆ (DMQ₆), para então Coq7p ser incorporado ao complexo e finalizar a síntese de Q₆ (GONZÁLES-MARISCAL et al., 2014).

O gene *COQ8*, inicialmente descrito como *ABC1* (BOUSQUET et al., 1991), quando superexpresso, suprime parcialmente o defeito respiratório em linhagens mutantes *COQ9* e *COQ10* (BARROS et al., 2005; JOHNSON et al., 2005), permitindo inclusive o acúmulo de intermediários da via biossintética de Q₆ anteriormente impossíveis de serem detectados, pois o excesso de Coq8p leva também a um aumento da estabilidade das proteínas Coq, mesmo na falta de um dos componentes do complexo multienzimático envolvido na biossíntese de Q₆ (GIN; CLARKE, 2005; XIE et al., 2011; ZAMPOL et al., 2010). Por sua vez, na ausência de Coq8p este complexo é desfeito (DO et al., 2001) e a maior estabilidade conferida por Coq8p às proteínas deve-se, possivelmente, a eventos de fosforilação, pois diversas evidências apontam para uma provável atividade quinase de Coq8p (LAGIER-TOURENE et al., 2008; XIE et al., 2011). De fato, foi demonstrado que o ortólogo humano de Coq8p, *ADCK3*, possui atividade ATPase e sua estrutura revelou motivos típicos de quinases capazes de se ligarem a nucleotídeos de adenina (STEFELY et al., 2015; WHEELER; JIA, 2015).

Coq7p, Coq3p e Coq5p são algumas das proteínas sujeitas ao controle de fosforilação na biossíntese de Q₆ (XIE et al., 2011). Neste trabalho demonstramos que mutantes *coq7* também podem se beneficiar da superexpressão de *COQ8* (BUSSO et al., 2015).

Dentre os genes *COQ*, *COQ10* e *COQ11* continuam sem ter sua função totalmente elucidada. Mutantes *coq10* apresentam níveis de Q₆ idênticos aos observados na linhagem selvagem, o que difere de outros mutantes *coq* (*COQ1*-*COQ9*) deficientes na biossíntese de Q₆ (BARROS et al., 2005). Devido a um túnel de ligação presente em sua estrutura, sugere-se que Coq10p atue como uma chaperona,

necessária para a entrega da Q₆ e para a sua correta localização na cadeia respiratória (ALLAN et al., 2013; BARROS et al., 2005; BUSO et al., 2010; CUI; KAWAMUKAI, 2009; MURAI et al., 2014).

COQ11, o último gene a ser identificado (ALLAN et al., 2015), apresenta fenótipos similares aos mutantes *coq10*: deficiência respiratória recuperável pela adição de Q₆ externa, mas síntese de Q₆ em concentrações idênticas ao observado na linhagem selvagem. É possível que Coq10p e Coq11p atuem conjuntamente na mesma função de entrega da Q₆ recém-sintetizada aos seus sítios de ação (ALLAN et al., 2015).

Figura 5 - Biossíntese da Coenzima Q e seus intermediários em eucariotos.
Adaptado Meganathan (2001) e Pierrel et al (2010).

Coq8 (ADCK3)

ideia
respiratória

Q₆

O elevado grau de similaridade entre mitocôndrias de levedura e de humanos promoveu o uso de *S. cerevisiae* como modelo funcional permitindo a identificação de genes nucleares envolvidos em doenças neurodegenerativas (BARRIENTOS, 2003).

Diversos autores descreveram pacientes com síndromes mitocondriais causadas por mutações nos genes COQ2, COQ4, COQ6, COQ8 e COQ9, que se manifestam como doenças neurodegenerativas, cardiopatias, alterações renais, entre outras, e a patogênese das mutações encontradas nesses genes foi, em muitos casos, validada em *S. cerevisiae* (DUNCAN et al., 2009; EMMANUELE et al., 2012; FOTINO et al., 2013; GASSER et al., 2013; HEERINGA et al., 2011; LAGIER-TOURENNE et al., 2008; MONTERO et al., 2013; SALVIATI et al., 2012; SHARMA et al., 2013; QUINZII et al., 2006).

Além dos pacientes com deficiência primária de Coenzima Q, pacientes portadores de doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson e Huntington também apresentam a Coenzima Q em baixas concentrações (BOTA; DAVIES, 2001; CHINNERY, 2002; JAZWINSKI, 2005; LITARRU; TIANO, 2005), assim, a terapia através da administração de CoQ e seus análogos tem despertado o interesse de diversos pesquisadores, para a verificação de melhora na atividade bioenergética mitocondrial (LÓPEZ-LLUCH et al., 2010).

1.4 Decomposição de Redes de Correlação de Resíduos

Nosso laboratório tem como linha de pesquisa o estudo da biogênese mitocondrial, usando *S. cerevisiae* como modelo a fim de auxiliar na compreensão do papel exercido pelas mitocôndrias em doenças neurodegenerativas e no processo de envelhecimento celular (JAZWINSKI, 2005; OHLMEIER et al., 2004; WALLACE, 2005).

Uma maneira que encontramos para estudar a função das proteínas Coq está na análise de alinhamento de uma família de proteínas para identificar resíduos de aminoácidos específicos que coevoluem, a partir da análise de comunidades, formando redes de correlação e anti-correlação de resíduos (BLEICHER; LEMKE; GARRATT et al., 2011).

Na literatura, esse tipo de análise foi sugerida inicialmente, por GÖBEL e colaboradores (1994), que propuseram que dois resíduos correlacionados apresentam proximidade também na estrutura da proteína tridimensional, enquanto Atchley e colaboradores encontraram posições que coevoluíram através de

estimativas de informação mútua, definida como a medida de correlação entre dois conjuntos de eventos (ATCHLEY; TERHALLE; DRESS, 1999).

Em seguida, LOCKLESS e colaboradores (1999) sugeriram que grupos de resíduos correlacionados podem estar envolvidos na comunicação alostérica em famílias de proteínas. O arcabouço teórico desta análise utilizou a mecânica estatística de Boltzmann e foi denominado análise por acoplamento estatístico (do inglês, “*Statistical Coupling Analysis*”, SCA). No mesmo trabalho, foi possível observar, através do método de perturbação (Figura 6), a correlação entre as posições dos aminoácidos comparados com todos os outros da proteína; assim, quando em um dado alinhamento, o resíduo é identificado na posição 2, pode-se observar a frequência elevada em que ocorre outro aminoácido na posição 20 (Figura 6B). Fixando esse resíduo em uma posição, são feitos subalinhamentos, que permitem verificar a frequência em que resíduos de interesse ocorrem em outra posição (Figura 6C).

Figura 6 - Método de perturbação estatística para medir acoplamentos entre posições de alinhamento de proteínas.

A: proteína hipotética contendo quatro posições *i*, *j*, *k* e *l*. As posições *l* e *k* atuam independentemente um do outro; *i* e *j*, cooperativamente. **B:** representação esquemática de um MSA (Alinhamento Múltiplo de Sequência, do inglês *Multiple Sequence Analysis*) de uma família de proteínas, com as frequências de seus aminoácidos indicadas nas quatro posições. Linhas horizontais representam sequências de proteínas individuais. As frequências dos aminoácidos no MSA estão indicadas. **C:** Subalinhamento resultante de um experimento de perturbação onde o sítio *i* é fixado em histidina. Adaptado de Suel e colaboradores (2003).

Bleicher e colaboradores (2011) observaram que é possível definir uma rede de resíduos, isto é, uma comunidade em que um conjunto de resíduos mostra fortes ligações entre si, mas não com resíduos de outras redes, sendo que a ligação entre dois resíduos implica que quando um dos aminoácidos da rede estiver em uma determinada posição, o outro tende a estar fixo em outra posição (BLEICHER; LEMKE; GARRATT, 2011).

O estudo de coevolução de resíduos de aminoácidos permitiu a Bleicher e colaboradores desenvolverem o método de Decomposição de Redes de Correlação de Resíduos (DRCN – “*Decomposition of Residues Correlation Networks*”), que quantifica correlações específicas através do alinhamento de múltiplas sequências para a geração das comunidades de resíduos correlacionados ou anticorrelacionados, sendo possível determinar os grupos de aminoácidos específicos que coevoluíram, e que podem ser determinantes para as propriedades dos membros de uma dada família de proteínas, e que cuja análise mutacional pode ser útil para a caracterização de uma proteína com função ainda desconhecida (BLEICHER; LEMKE; GARRATT, 2011).

O método demonstrou-se eficiente na elucidação da função de várias proteínas. A análise de Her2p (uma subunidade do complexo mitocondrial GatFAB amidotransferase), através do método DRCN, identificou oito conjuntos distintos de resíduos que coevoluíram na família. Foram obtidos mutantes em resíduos presentes nesses conjuntos de aminoácidos, através de mutagênese aleatória (realizada por uma Taq DNA polimerase com baixa atividade revisora), o que ocasionou perturbações nas funções de Her2p. A análise de DRCN mostrou o papel estrutural destes resíduos mutados, indicando que os conjuntos de redes de Her2p são relevantes para a atividade da proteína (FERREIRA-JÚNIOR; BLEICHER; BARROS, 2013).

Em relação à biossíntese de Q₆, Coq7p também foi submetida à análise por correlação de resíduos. A análise de DRCN de Coq7p, enzima monooxigenase com centro di-férrico que participa da biossíntese da Q₆ em levedura, indicou o resíduo S114 como membro de uma comunidade de aminoácidos, cuja mutação (S114E) produziu uma redução na biossíntese de Q₆, além de ser um resíduo fosforilado, que é possivelmente atraído pelo resíduo R57, e essa fosforilação é responsável por

diminuir a produção de Q_6 , sendo essa uma regulação negativa da via (BUSSO et al., 2015).

Esses resultados demonstram que o método DRCN é bem robusto para a identificação de resíduos para mutagênese e determinação da função protéica, o que o torna eficiente e aplicável na identificação de resíduos determinantes da função de Coq3p.

6 CONCLUSÕES

6.1 COQ7

Em relação ao gene COQ7 pode-se concluir que:

- ✓ O duplo mutante S114A, V111G apresenta deficiência respiratória à temperatura não permissiva e acúmulo de níveis DMQ₆ mais altos em relação aos níveis de Q₆;

- ✓ À temperatura não permissiva (37 °C), a síntese de Q₆ diminui em todas as linhagens, incluindo a selvagem;

- ✓ O mutante S114E apresenta deficiência respiratória quando em meio de fonte de carbono não fermentável e também apresenta maior acúmulo de DMQ₆ a 30 °C e 37 °C, e, possivelmente, inibe a atividade de Coq7p;

- ✓ A superexpressão de COQ8 melhorou parcialmente a capacidade respiratória do mutante S114E, além de manter estáveis os níveis de expressão de Coq3p e Coq4p e aumentar o acúmulo de Q₆ e DMQ₆;

- ✓ O sítio de S114 pode ser um alvo para a fosforilação de Coq7p e desenvolver uma atividade central na regulação de Coq7p;

- ✓ A mutação S114E sugere que S114 interage com R57 quando fosforilada. Para verificar se isso ocorre de fato, um experimento que poderia ser conduzido é medir a Transferência Ressonante de Energia de Fluorescência (FRET, do inglês *Fluorescence Resonance Energy Transfer*) entre os triptofanos 92 e 120. Quando S114 for fosforilada, ocorre o deslocamento que aumenta a distância entre os triptofanos para um valor acima de 10 Å, quando o sinal de FRET é reduzido.

Os principais resultados referentes ao gene COQ7 estão disponíveis no artigo: “Coq7p relevant residues for protein activity and stability” (ANEXO E).

6.2 COQ3

Em relação ao gene COQ3, até o momento, pode-se concluir:

- ✓ E138, E197, E200, H201, T227, R230 e H254 são resíduos conservados e essenciais para a atividade de Coq3p, uma vez que linhagens carregando substituições nesses resíduos apresentaram severa deficiência respiratória, mesmo se superexpressos em vetores multi-cópias;
- ✓ Os mutantes *coq3*^{E123A}, *coq3*^{S125A}, *coq3*^{C131A}, *coq3*^{G133A}, *coq3*^{G134A}, *coq3*^{H165A}, *coq3*^{D203A}, *coq3*^{E219A}, *coq3*^{K258A} e *coq3*^{S262A} são deficientes respiratórios quando expressos em vetores integrativos ou em vetores multicópia;
- ✓ Corroborando estudos anteriores, a estabilidade de Coq4p está associada à atividade de Coq3p;
- ✓ Os mutantes *coq3*^{D203A}, *coq3*^{E219A}, *coq3*^{K258A} e *coq3*^{S262A} apresentaram crescimento discreto em fonte de carbono não fermentável etanol/glicerol (YPEG), quando comparados a outros mutantes; esse fato possivelmente ocorre por serem resíduos localizados em região distante da proposta como centro catalítico;
- ✓ Por outro lado, os mutantes *coq3*^{E123A}, *coq3*^{S125A}, *coq3*^{C131A}, *coq3*^{G133A}, *coq3*^{G134A} apresentaram crescimento respiratório em meio contendo fonte de carbono não fermentável, no entanto, o mutante *coq3*^{H165A} apresentou crescimento similar ao da linhagem selvagem W303, sugerindo a atividade funcional desses resíduos, localizados em regiões próximas;
- ✓ A alça onde estão localizados os resíduos C131, G133 e G134 é uma região altamente conservada, e pode ser o centro catalítico de Coq3p;
- ✓ Coq3p é uma o-metiltransferase, cuja atividade catalítica ainda não foi estudada. A coleção de mutantes apresentada aqui, que comprometem a função respiratória celular, poderia ser expressa em bactérias para a realização de ensaios enzimáticos que permitam correlacionar mutação, estrutura e a atividade metiltransferase.

Esses resultados sugerem a relevância desses resíduos para a viabilidade e crescimento das linhagens mutantes *coq3*, sendo necessários novos estudos para tentar elucidar sua função na atividade de COQ3.

REFERÊNCIAS*

ALBERTS, B. **Molecular biology of the cell**. 4ª ed. Editora Artmed. 3786p, 2002.

ALLAN CM1, HILL S, MORVARIDI S, SAIKI R, JOHNSON JS, LIAU WS, HIRANO K, KAWASHIMA T, JI Z, LOO JA, SHEPHERD JN, CLARKE CF. A conserved START domain coenzyme Q-binding polypeptide is required for efficient Q biosynthesis, respiratory electron transport, and antioxidant function in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1831, n.4, p.776-91, 2013.

ALLAN CM, AWAD AM, JOHNSON JS, SHIRASAKI DI, WANG C, BLABY-HAAS CE; MERCHANT SS, LOO JA, CLARKE CF. Identification of Coq11, a new coenzyme Q biosynthetic protein in the CoQ-synthome in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem**, v. 290, n.12, p.7517-7534, 2015.

ALLEN, J. F.; RAVEN, J. A. Free-Radical-Induced Mutation vs Redox Regulation: Costs and Benefits of Genes in Organelles. **J. Mol. Evol.**, v. 42, p. 482-492, 1996.

ATCHLEY, W. R.; TERHALLE, W.; DRESS, A. Positional Dependence, Cliques, and Predictive Motifs in the bHLH Protein Domain. **J. Mol. Evol**, v. 48, n. 5, p. 501–516, maio 1999.

ASHBY, MN; EDWARDS, PA. Elucidation of the deficiency in two yeast coenzyme Q mutants. Characterization of the structural gene encoding hexaprenyl pyrophosphate synthetase. **J. Biol. Chem**. v. 265, p. 13157–13164, 1990.

BAKKER, B. M.; OVERKAMP, K. M.; VAN MARIS, A. J. A.; KÖTTER, P.; LUTTICK, M. A. H.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T. Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microb. Rev**, v. 25, p.15-37, 2001.

BARRIENTOS, A. In vivo and in organelle assessment of OXPHOS activities. **Methods**, v. 26, p. 307-316, 2002.

BARRIENTOS, A. Yeast Models of Human Mitochondrial Diseases. **IUBMB Life**, v. 55, p. 83-95, 2003.

BARRIENTOS, A.; BARROS M.H.; VALNOT, I.; RÖTIG, A.; RUSTIN, P.; TZAGOLOFF, A. Cytochrome oxidase in health and disease. **Gene**. v.286, p.53-63, 2003.

BARROS, M. H.; JOHNSON, A.; GIN, P., MARBOIS, B. N.; CLARKE, C. F.; TZAGOLOFF, A. The *Saccharomyces cerevisiae* COQ10 gene encodes a START domain protein required for function of coenzyme Q in respiration. **J. Biol. Chem**, v. 280, p. 42627-42635, 2005.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BARROS, M. H.; DA CUNHA, F. M.; OLIVEIRA, G. A.; TAHARA, E. B.; KOWALTOWSKI, A. J. Yeast as a model to study mitochondrial mechanisms in ageing **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 131, n. 7-8, p. 494-502, 2010.

BENTINGER, M.; BRISMAR, K.; DALLNER, G. The antioxidant role of coenzyme Q. **Mitochondrion**, v. 7S, p. S41-S50, 2007.

BENTINGER, M.; TEKLE, M.; DALLNER, G. Coenzyme Q - biosynthesis and functions. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 396, p. 74-79, 2010.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquímica**. 6ª edição: Guanabara Koogan, 2008. p. 1154.

BELOGRUDOV GI, LEE PT, JONASSEN T, HSU AY, GIN P & CLARKE CF Yeast COQ4 encodes a mitochondrial protein required for coenzyme Q synthesis. **Arch. Biochem. Biophys**, v. 392, p. 48–58, 2001.

BLEICHER, L., LEMKE, N., GARRATT, R.C. Using amino acid correlation and community detection algorithms to identify functional determinants in protein families. **PLoS One**. v. 6, n.12, p 27786, 2011.

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

BONAWITZ, N. D.; CHATENAY-LAPOINTE, M.; PAN, Y.; SHADEL, G. S. Reduced TOR signaling extends chronological life span via increased respiration and upregulation of mitochondrial gene expression. **Cell metabolism**, v. 5, n. 4, p. 265–277, 2007.

BOTA DA, DAVIES KJ. Protein degradation in mitochondria: implications for oxidative stress, aging and disease: a novel etiological classification of mitochondrial proteolytic disorders. **Mitochondrion**, v. 1, n.1, p. 33-49, 2001.

BOUSQUET I; DUJARDIN G ; SLONIMSKI PP ABC1, a novel yeast nuclear gene has a dual function in mitochondria: it suppresses a cytochrome b mRNA translation defect and is essential for the electron transfer in the bc1 complex. **EMBO J**, v.10, p. 2023–2031, 1991.

BRUENDER, N.A., THODEN, J.B., KAUR, M., AVEY, M.K., HOLDEN, H.M. molecular architecture of a c-3'-methyltransferase involved in the biosynthesis of D-tetronitrose. **Biochem**, v. 49, p. 5891-5898, 2010.

BUSSO C.; TAHARA EB.; OGUSUCU R.; AUGUSTO O.; FERREIRA-JUNIOR JR.; TZAGOLOFF A.; KOWALTOWSKI AJ.; BARROS MH.; *Saccharomyces cerevisiae* coq10 null mutants are responsive to antimycin A. **FEBS J**. 277(21):4530-8, 2010.

BUSSO, C.; FERREIRA-JUNIOR, J.R.; PAULELA, JANAINA A. ; BLEICHER, L. ; DEMASI, M. ; BARROS, M. H. . Coq7p relevant residues for protein activity and stability. **Biochimie**, v. 119, p. 92-102, 2015.

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

CHEN, X. J.; BUTOW, R. A. The organization and inheritance of the mitochondrial genome. **Nat. Genet.**, v. 6, p. 815-825, 2005.

CHINNERY PF. Inheritance of mitochondrial disorders. **Mitochondrion**. v 2, p. 149-155, 2002.

COVIAN, R.; ZWICKER, K.; ROTSAERT, F. A.; TRUMPOWER, B. L. Asymmetric and Redox-specific Binding of Quinone and Quinol at Center N of the Dimeric Yeast Cytochrome *bc1* Complex. **J. Biol. Chem**, v. 282, n. 33, p. 24198-24208, 2007.

CUI, T. Z.; KAWAMUKAI, M. Coq10, a mitochondrial coenzyme Q binding protein, is required for proper respiration in *Saccharomyces pombe*. **FEBS J**, v. 276, p. 748-759, 2008.

DELANO, W. L. Unraveling hot spots in binding interfaces: progress and challenges. **Curr. Opin. Struct. Biol**, v. 12, n. 1, p. 14–20, 2002.

DIMMER, K. S., FRITZ, S., FUCHS, F., MESSERSCHMITT, M., WEINBACH, N., NEUPERT, W. AND WESTERMANN, B. Genetic basis of mitochondrial function and morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Biol. Cell**, v.13, p. 847-853, 2002.

DO TQ, HSU AY, JONASSEN T, LEE PT & CLARKE CF. A defect in coenzyme Q biosynthesis is responsible for the respiratory deficiency in *Saccharomyces cerevisiae* *abc1* mutants. **J. Biol. Chem**, v. 276, p. 18161–18168, 2001.

DOLEZAL, P.; LIKIC, V.; TACHEZY, J.; LITHGOW, T. Evolution of the molecular machines for protein import into mitochondria. **Science**, v. 313, p. 314-318, 2006.

DUINA, A. A.; MILLER, M. E.; KEENEY, J. B. Budding Yeast for Budding Geneticists: A Primer on the *Saccharomyces cerevisiae* Model System. **Genetics**, v. 197, n. 1, p. 33–48, 2014.

DUNCAN, A. J.; BITNER-GLINDZICZ, M.; MEUNIER, B.; COSTELLO, H.; HARGREAVES, P.; LÓPEZ, L. C.; HIRANO, M.; QUINZII, C. M.; SADOWSKI, M. I.; HARDY, J.; SINGLETON, A.; CLAYTON, P. T.; RAHMAN, S. A nonsense mutation in *COQ9* causes autosomal-recessive neonatal-onset primary coenzyme Q10 deficiency: a potentially treatable form of mitochondrial disease. **Am. J. Hum. Genet**, v. 84, n. 5, p. 558-566, 2009.

EMMANUELE, V.; LOPEZ, L.C.; BERARDO, A.; NAINI, A.; TADESSE, S.; WEN, B.; D'AGOSTINO, E.; SOLOMON, M.; DIMAURO, S.; QUINZII, C.; HIRANO, M. Heterogeneity of coenzyme Q10 deficiency: patient study and literature review, **Arch. Neurol**, v.69, p. 978–983, 2012.

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

FALKENBERG, M.; LARSSON, N.G.; GUSTAFSSON, C.M. DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 76, p. 679- 699, 2007.

FAYE, G.; KUJAWA, C.; FUKUHARA, H. Physical and genetic organization of petite and grande yeast mitochondrial DNA: IV.†† Paper III in this series is Michel et al., 1974. In vivo Transcription Products of Mitochondrial DNA and Localization of 23 S Ribosomal RNA in Petite Mutants of Saccharo. **J. Mol. Biol**, v. 88, n. 1, p. 185–203, 1974.

FELDMANN, H. **Yeast: Molecular and Cell Biology**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2010.

FERREIRA-JÚNIOR, J. R.; BLEICHER, L.; BARROS, M. H. Her2p molecular modeling , mutant analysis and intramitochondrial localization. **Fungal Genet. Biol**, v. 60, p. 133–139, 2013.

FESTENSTEIN, G. N.; HEATON, F. W.; LOWE, J. S.; MORTON, R. A. A constituent of the Unsaponifiable Portion of Animal Tissue Lipids (λ_{max} . 272 m μ .). **Biochem. J**, v. 59, p. 558-566, 1955.

FINN, R. D., COGGILL, P., EBERHARDT, R. Y., The Pfam protein families database: towards a more sustainable future., **Nucleic Acids research**, v. 44, p D279–285, 2016.

FOTINO, A.D. ; THOMPSON-PAUL, A.M. ; BAZZANO, L.A. Effect of coenzyme Q10 supplementation on heart failure: a meta-analysis, **Am. J. Clin. Nutr.** 97 : 268–275, 2013,

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

FOURY, F.; TALIBI, D. Mitochondrial control of iron homeostasis. A genome wide analysis of gene expression in a yeast frataxin-deficient strain, **J. Biol. Chem**, v. 276, p. 7762-7768, 2001.

GASSER, D.L. ; WINKLER, C.A. ; PENG, M. ; AN, P.; MCKENZIE, L.A. ; KIRK, G.D. ; SHI, Y. ; XIE, L.X.; MARBOIS, B. .N. CLARKE, C.F.; KOPP, J.B. Focal segmental glomerulosclerosis is associated with a PDSS2 haplotype and independently, with a decreased content of coenzyme Q10,**Am. J. Physiol. Renal Physiol**, v. 305, p. 1228–1238, 2013.

GERSHON, H.; GERSHON, D. The budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, as a model for aging research: a critical review. **Mech. Ageing Dev**, v. 120, p. 1-22, 2000.

GESTELAND, R.F. ; WOLFNER, M.; GRISAFI, P.; FINK, G. ; BOTSTEIN, D. ; ROTH, J.R. Yeast suppressors of UAA and UAG nonsense codons work efficiently in vitro via tRNA, **Cell**, v. 7, p. 381- 390, 1976.

GIN, P.; HSU, A. Y.; ROTHMAN, S. C.; JONASSEN, T.; LEE, P. T.; TZAGOLOFF, A.; CLARKE, C. F. The *Saccharomyces cerevisiae* COQ6 gene encodes a mitochondrial flavin-dependent monooxygenase required for coenzyme Q biosynthesis. **J. Biol. Chem**, v. 278, p. 25308–25316, 2003.

GIN, P. AND CLARKE, C. F. Genetic Evidence for a Multi-subunit Complex in Coenzyme Q Biosynthesis in Yeast and the Role of the Coq1 Hexaprenyl Diphosphate Synthase. **J. Biol. Chem**, v. 280, n.4, p. 2676 – 2678, 2005.

GLOOR U, WISS O. The biosynthesis of ubiquinone. **Experientia**, v. 14, n.11, p. 410-411, 1958.

GÖBEL, U.; SANDER, C.; SCHNEIDER, R.; VALENCIA, A. Correlated mutations and residue contacts in proteins. **Prot. Struc. Func. Gen**, v. 18, n. 4, p. 309–317, 1994.

GOEWERT, R. R. **Studies on the Biosynthesis of Ubiquinone**. St. Louis, MO: Saint Louis University, 1980.

GOFFEAU A1, BARRELL BG, BUSSEY H, DAVIS RW, DUJON B, FELDMANN H, GALIBERT F, HOHEISEL JD, JACQ C, JOHNSTON M, LOUIS EJ, MEWES HW, MURAKAMI Y, PHILIPPSSEN P, TETTELIN H, OLIVER SG. Life with 6000 genes. **Science**, v. 274, n.5287.p.546-567, 1996.

GONZÁLEZ-MARISCAL, I., GARCÍA-TESTÓN, E., PADILLA, S., MARTÍN-MONTALVO, A., POMARES-VICIANA, T., VAZQUEZ-FONSECA, L., GANDOLFO-DOMÍNGUEZ, P., SANTOS-OCAÑA, C. Regulation of coenzyme Q biosynthesis in yeast: a new complex in the block. **IUBMB Life**, v. 66, p. 63-70, 2014.

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

GREEN, D. E.; HATEFI, Y. The Mitochondrial and Biochemical Machines. **Science**, v. 3445, n. 133, p. 13-19, 1961.

GRUNLER, J.; ERICSSON, J.; DALLNER, G. Branch-point reactions in the biosynthesis of cholesterol, dolichol, ubiquinone and prenylated proteins. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1212, p. 259-277, 1994.

HAO, Y., BLAIR, P.M., SHARMA, A., MITCHELL, D.A., NAIR, S.K. Insights into methyltransferase specificity and bioactivity of derivatives of the antibiotic plantazolicin. **Acs Chem.Biol.** 10: 1209-1216, 2015.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **J. Mol. Biol**, v. 166, n. 4, p. 557-580, 1983.

HATEFI H. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 54, p. 1015-1069, 1985.

HEERINGA, S.F., et al., . COQ6 mutations in human patients produce nephrotic syndrome with sensorineural deafness. **J. Clin. Invest.**, v.121, p. 2013-2024, 2011.
HECKMAN, K.L.; PEASE, L.R. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. **Nature Protocols**, v.2, p.924 – 932, 2007.

HERSKOWITZ, I. Life-cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbio. I Rev**, v. 52, n. 4, p. 536-553, 1988.

HILDEBRANDT, T.M. ; GRIESHABER, M.K. Three enzymatic activities catalyze the oxidation of sulfide to thiosulfatethiosulfate in mammalian and invertebrate mitochondria, **FEBS J.** v. 275, p. 3352–3361, 2007.

HILL, J.E; MYERS, A.M. ; KOERNER , T.J.; TZAGOLOFF, A., Yeast/*E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites, **Yeast**, v. 2, p. 163- 167, 1986.

HOLZENBERGER, M.; DUPONT, J.; DUCOS, B.; LENEUE, P.; GÉLOËN, A.; EVEN, P. C.; CERVERA, P.; LE BOUC, Y. IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. **Nature**, v. 421, n. 6919, p. 182–187, 2003.

HORTON, J.R., SAWADA, K., NISHIBORI, M., ZHANG, X., CHENG, X. Two polymorphic forms of human histamine methyltransferase: structural, thermal, and kinetic comparisons. **Structure**, v. 9, p. 837-849, 2001.

HORTON, J.R., SAWADA, K., NISHIBORI, M., CHENG, X. Structural basis for inhibition of histamine N-methyltransferase by diverse drugs **J.Mol.Biol.** v. 353, p. 334-344, 2005.

HSIEH, E. J.; GIN, P.; GULMEZIAN, M.; TRAN, U. C.; SAIKI, R.; MARBOIS, B. N.; CLARKE, C. F. *Saccharomyces cerevisiae* Coq9 polypeptide is a subunit of the mitochondrial coenzyme Q biosynthetic complex. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 463, p. 19-26, 2007.

HSU, A. Y., DO, T. Q., LEE, P. T. AND CLARKE, C. F.). Genetic evidence for a multisubunit complex in the O-methyltransferase steps of coenzyme Q biosynthesis. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1484, p. 287 – 297, 2000.

JAZWINSKI, S. M. Yeast longevity and aging – the mitochondrial connection. **Mech. Ageing Dev**, v. 126, p. 243-248, 2005.

JONASSEN T, PROFT M, RANDEZ-GIL F, SCHULTZ JR, MARBOIS BN, ENTIAN KD & CLARKE CF Yeast Clk-1 homologue (Coq7/Cat5) is a mitochondrial protein in coenzyme Q synthesis. **J. Biol. Chem**, v. 273, p. 3351–3357, 1998.

JONASSEN, T.; CLARKE, CF. Genetic Analysis of Coenzyme Q Biosynthesis. In: Kagan, VE.; Quinn, PJ., editors. Coenzyme Q: Molecular Mechanisms in Health and Disease. Boca Raton, FL: CRC **PRESS**; 2001.

JOHNSON, A.; GIN, P.; MARBOIS, B. N.; HSIEH, E. J.; WU, M.; BARROS, M. H.; CLARKE, C. F.; TZAGOLOFF, A. COQ9, a new gene required for the biosynthesis of coenzyme Q in *Saccharomyces cerevisiae*. **A. S. B. M. B.**, v. 36, p. 31397-31404, 2005.

KAGAN, R.M; CLARKE, S. Widespread occurrence of three sequence motifs in diverse S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases suggests a common structure for these enzymes. **Arch. Biochem. Biophys**, v. 310, n.2, p.417-27, 1994.

KELLEY, L. A; STERNBERG, M. J. E. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. **Nature protocols**, v. 4, n. 3, p. 363–371, 2009.

KELLEY, L. A.; MEZULIS, S.; YATES, C. M.; WASS, M. N.; STERNBERG, M. J. E. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nature Protocols**. v. 10, n. 6, p. 845–858, 2015.

KELLY, D. P. AND SCARPULLA, R. C. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. **Genes. Dev**, v. 18, p. 357-368, 2004.

KIM, D. E.; CHIVIAN, D.; BAKER, D. Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p. W526–W531, 2004.

KIRINO, Y.; MOURELATOS, Z. 2'-O-methyl modification in mouse piRNAs and its methylase. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 51, p. 417–418, 2007.

KRUFT, V.; EUBEL, H.; JÄNSCH, L.; WERHAHN, W.; BRAUN, H. P. Proteomic Approach to Identify Novel Mitochondrial Proteins in Arabidopsis. **Plant Physiol**, v. 127, p. 1694-1710, 2001.

LAGIER-TOURENNE, C.; TAZIR, M.; LÓPEZ, L.C.; QUINZII, C.M.; ASSOUM, M.; DROUOT, N.; BUSO, C.; MAKRI, S.; ALI-PACHA, L.; BENHASSINE, T.; ANHEIM, M.; LYNCH, D.R.; THIBAUT, C.; PLEWNIAK, F.; BIANCHETTI, L.; TRANCHANT, C.; POCH, O.; DIMAURO, S.; MANDEL, J.L.; BARROS, M.H.; HIRANO, M.; KOENIG, M. ADCK3, an ancestral kinase, is mutated in a form of recessive ataxia associated with coenzyme Q10 deficiency. **Am. J. Hum. Genet**, v. 82, n. 3, p. 661 – 672, 2008.

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

LARSSON, N. G. Somatic mitochondrial DNA mutations in mammalian aging. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 79, p. 683-706, 2010.

LEE, J.H., BAE, B., KUEMIN, M., CIRCELLO, B.T., METCALF, W.W., NAIR, S.K., VAN DER DONK, W.A. characterization and structure of dhpi, a phosphonated o-methyltransferase involved in Dehydrophos biosynthesis. **PROC.NATL.ACAD.SCI.USA**, v. 107, p. 17557-17562, 2010.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 4ª edição. São Paulo: Servier. 1202p, 2007.

LENAZ, G.; DE SANTIS, A. A survey of the function and specificity of ubiquinone in the mitochondrial respiratory chain, in: G. Lenaz (Ed.), **Coenzyme Q Biochemistry**,

Bioenergetics and Clinical Applications of Ubiquinone, John Wiley & Sons, New York, p. 165–199, 1985.

LENAZ, G. ; FATO, R.; FORMIGGINI, G.;, GENOVA, M.L. The role of Coenzyme Q in mitochondrial electron transport. **Mitochondrion**. p.S8-S33, 2007.

LENAZ, G.; GENOVA, M. L. Structure and organization of mitochondrial respiratory complexes: a new understanding of an old subject. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 12, n. 8, p. 961-1008, 2009.

LESTER RL, CRANE FL. The natural occurrence of coenzyme Q and related compounds. **J. Biol. Chem**, v.234, p. 2169–2175, 1959.

LITTARRU GP, TIANO L. Clinical aspects of coenzyme Q10: an update. **Rev. Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care**. v. 8, n. 6, p.:641-646, 2005.

LOCKLESS, S. W.; RANGANATHAN, R.; KUKIC, P.; MIRABELLO, C.; TRADIGO, G.; WALSH, I.; VELTRI, P.; POLLASTRI, G.; SOCOLICH, M.; LOCKLESS, S. W.; RUSS, W. P.; LEE, H.; GARDNER, K. H.; RANGANATHAN, R.; KRETH, K. E.; FODOR, A. a; BALAKRISHNAN, S.; KAMISSETTY, H.; CARBONELL, J. G.; LEE, S.-I.; LANGMEAD, C. J.; THORNTON, J. M.; ORENGO, C. a; TODD, a E.; PEARL, F. M. Evolutionarily conserved pathways of energetic connectivity in protein families. **BMC Bioinformatics**, v. 15, n. 5438, p. 295–299, 1999.

LOHMAN, D.C. ; FOROUHAR, F. ; BEEBE, E.T. STEFELY, M.S. ; MINOGUE, C.E.; ULBRICH, A. ; STEFELY, J.A. SUKUMAR, S. ; LUNA-S_ANCHEZ, M. ; JOCHEM, A.; LEW, S. ; SEETHARAMAN, J; XIAO, R. ; WANG, H. ; WESTPHALL, M.S. WROBEL, R.L.; EVERETT, J.K.; MITCHELL, J.C. ; L_OPEZ, L.C.; COON, J.J. ; TONG, L. ; PAGLIARINI, D.J. Mitochondrial COQ9 is a lipidbinding protein that associates with COQ7 to enable coenzyme Q biosynthesis, **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** v. 111, n. 44, p. E4697-4705, 2014.

LÓPEZ-LLUCH G, RODRÍGUEZ-AGUILERA JC, SANTOS-OCAÑA C, NAVAS P. Is coenzyme Q a key factor in aging? **Mech. Ageing Dev**, v. 131, n. 4, p. 225-35, 2010.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LÜTHY, R.; BOWIE, J. U.; EISENBERG, D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Nature**, v. 356, n. 6364, p. 83–85, 1992.

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

MARTÍN-MONTALVO, A., GONZÁLEZ-MARISCAL, I., PADILLA-LÓPEZ, S., BALLESTEROS, M. Respiratory- induced coenzyme Q biosynthesis is regulated by a phosphorylation cycle of Cat5p/Coq7p, **Biochem. J.** v.440, p. 104-114, 2011

MARTÍN-MONTALVO, A., GONZÁLEZ-MARISCAL, I., POMARES-VICIANA, T., PADILLA-LÓPEZ, S., BALLESTEROS, M., VAZQUEZ-FONSECA, L., GANDOLFO, P., BRAUTIGAN, D. L., NAVAS, P., SANTOS-OCAÑA, C. The phosphatase Ptc7

induces coenzyme Q biosynthesis by activating the hydroxylase Coq7 in yeast. **J Biol. Chem**, v.288, p. 28126-28137, 2013.

MARBOIS, B. N.; CLARKE, C. F. The COQ7 gene encodes a protein in *Saccharomyces cerevisiae* necessary for ubiquinone biosynthesis. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 2995–3004, 1996.

MARBOIS, B.; GIN, P.; FAULL, K. F.; POON, W. W.; LEE, P. T.; STRAHAN, J. Coq3 and Coq4 Define a Polypeptide Complex in Yeast Mitochondria for the Biosynthesis of Coenzyme Q. **J. Biol. Chem**, v. 280, n. 21, p. 20231-20238, 2005.

MARBOIS, B.; XLE, L. X.; CHOL, S.; HIRANO, K.; HYMAN, K.; CLARKE, C. F. para-Aminobenzoic Acid is a precursor in coenzyme Q₆ biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem**, v. 285, p. 27827-27838, 2010.

MARRES, C. A. M.; DE VRIES, S.; GRIVEL, L. A. Isolation and inactivation of the nuclear gene encoding the rotenone-insensitive internal NADH: ubiquinone oxidoreductase of mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. **Eur. J. Biochem**, v. 195, p. 857-862, 1991.

MEGANATHAM, R. Ubiquinone biosynthesis in microorganisms. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 203, p. 131-139, 2001.

MITCHELL, P. The protonmotive Q cycle: a general formulation. **FEBS Lett.**, v. 59, n. 2, p. 137-139, 1975.

MONTERO, R.; GRAZINA, M.; LOPEZ-GALLARDO, E.; MONTOYA, J.; BRIONES, P.; NAVARRO-SASTRE, A.; LAND, J.M.; HARGREAVES, I.P.; ARTUCH, R.; Q.D.S.G. COENZYME, Coenzyme Q10 deficiency in mitochondrial DNA depletion syndromes. **Mitochondrion**, v. 13, p. 337–341, 2013.

MUHLRAD D., HUNTER R., PARKER R. A rapid method for localized mutagenesis of yeast genes. **Yeast**, v. 8, p. 79–82, 1992.

MUI CHAN, C., ZHOU, C., BRUNZELLE, J.S., HUANG, R.H. Structural and biochemical insights into 2'-O-methylation at the 3'-terminal nucleotide of RNA by Hen1. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, v.106, p. 17699-17704, 2009.

MURAI M, MATSUNOBU K, KUDO S, IFUKU K, KAWAMUKAI M, MIYOSHI H. Identification of the binding site of the quinone-head group in mitochondrial Coq10 by photoaffinity labeling. **Biochemistry**. v. 53, n.24, p.3995-4003, 2014.

MUSTER, B.; KOHL, W.; WITTIG, I.; STRECKER, V.; JOOS, F.; HAASE, W.; BEREITER-HAHN, J.; BUSCH, K. Respiratory chain complexes in dynamic mitochondria display a patchy distribution in life cells. **Plos One**. v. 5, n. 7, p 1-13, 2010.

NEWMAN, M. E. J.; GIRVAN, M. Finding and evaluating community structure in networks. **Physical Rev**, v. 69, n. 2, p. 026113, 2004.

NIEWMIERZYCKA A, CLARKE S. S-Adenosylmethionine-dependent methylation in *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of a novel protein arginine methyltransferase. **J. Biol. Chem** , v. 274, p. 814– 824, 1999.

OHLMEIER, S.; KASTANIOTIS, A.J.; HILTUNEN, J.K.; BERGMANN, U. The Yeast mitochondrial proteome, a study of fermentative and respiratory growth. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 279, n. 6, p.3956-3979, 2004.

OZEIR,M.; MUHLENHOFF, U. ; WEBERT, H.; LILL,R.; FONTECAVE, M.; PIERREL,F. Coenzyme Q biosynthesis: Coq6 is required for the C5-hydroxylation reaction and substrate analogs rescue Coq6 deficiency, **Chem. Biol**, v. 18, p. 1134–1142, 2011.

PADILLA, S.; JONASSEN, T.; JIMENEZ-HIDALGO, M. A.; FERNANDEZ- AYALA, D. J.; JOPEZ-LLUCH, G.; MARBOIS, B.; NAVAS, P.; CLARKE, C. F.; SANTOS-OCAÑA, C. Demethoxy-Q, an intermediate of coenzyme Q biosynthesis, fails to support respiration in *Saccharomyces cerevisiae* and lacks antioxidant activity. **J. Biol. Chem**, v. 279, p. 25995-26004, 2004.

PIERREL, F., HAMELIN, O., DOUKI, T., KIEFFER-JAQUINOD, S., MÜHLENHOFF, U., OZEIR, M., LILL, R., FONTECAVE, M. Involvement of mitochondrial ferredoxin and para-aminobenzoic acid in yeast coenzyme Q biosynthesis. **Chem. Biol**. v. 17, p. 449-459, 2010.

PINTARD,L., BUJNICKI,J.M., Lapeyre,B. and Bonnerot,C. (2002) MRM2 encodes a novel yeast mitochondrial 21S rRNA methyltransferase. **EMBO J**, v. 21, p. 1139 – 1147, 2002.

POON, W. W.; BARKOVICH, R. J.; HSU, A.Y.; FRANKEL, A.; LEE, P. T.; SHEPHERD, J. N.; MYLES, D. C.; CLARKE, C. F. Yeast and rat Coq3 and *Escherichia coli* UbiG polypeptides catalyze both O-methyltransferase steps in coenzyme Q biosynthesis. **J. Biol. Chem**, v. 274, p. 21665-21672, 1999.

QUINONES-PARRA, S., GRANT, E., LOH, L., NGUYEN, T.H., CAMPBELL, K.A., TONG, S.Y., MILLER, A., DOHERTY, P.C., VIJAYKRISHNA, D., ROSSJOHN, J., GRAS, S., KEDZIERSKA, K. Preexisting cd8+ t-cell immunity to the h7n9 influenza a virus varies across ethnicities. **PROC.NATL.ACAD.SCI.USA**, v. 111, p.: 1049-1054, 2014.

QUINZII, C., NAINI, A., SALVIATI, L., TREVISSON, E., NAVAS, P., DIMAURO, S., HIRANO, M A mutation in para-hydroxybenzoate-polyprenyl transferase (COQ2) causes primary coenzyme Q10 deficiency. **Am J Hum Genet**. v. 78, p. 345-349, 2006.

RABILLOUD, T.; KIEFFER, S.; PROCACCIO, V.; LOUWAGIE, M.; COURCHESNE, P. L.; PATTERSON, S. D.; MARTINEZ, P.; GARIN, J.; LUNARDI, J. Two-dimensional electrophoresis of human placental mitochondria and protein identification by mass spectrometry: toward a human mitochondrial proteome. **Electrophoresis**, v.19, p. 1006-1014, 1998.

RYAN, M.T.; HOOGENRAAD, N.J. Mitochondrial-Nuclear Communications. **Annu. Rev. Biochem**, v.76, p 701-722, 2007.

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

RÖTIG A. Genetic bases of mitochondrial respiratory chain disorders. **Diabetes & Metabolism**. v. 36, p. 97-107, 2009.

SAGAN, L. On the origin of mitosing cells. **J. Theor. Biol**, v. 1, n. 3, p. 255-274, 1967.

SALVIATI L, TREVISSON E, RODRIGUEZ HERNANDEZ MA, CASARIN A, PERTEGATO V, DOIMO M, CASSINA M, AGOSTO C, DESBATS MA, SARTORI G, SACCONI S, MEMO L, ZUFFARDI O, ARTUCH R, QUINZII C, DIMAURO S, HIRANO M, SANTOS-OCAÑA C, NAVAS P. Haploinsufficiency of COQ4 causes coenzyme Q10 deficiency. **J. Med. Genet**, v. 49, p.187-191, 2012.

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

SARASTE, M. Oxidative phosphorylation at the *fin de siècle*. **Science**, v.283, p. 1488 – 1492, 1999.

SAZANOV, L.A. A giant molecular proton pump: structure and mechanism of respiratory complex I. **Nature Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 16, p. 375–388, 2015.

SCHAFFER, S. W.; SULEIMAN, M. S. **Mitochondria: The dynamic organelle**. New York: Springer, 2007. 359 p.

SCHATZ, G.; HASLBRUNNER, E.; TUPPY, H. Desoxyribonucleic acid associated with yeast mitochondria. **Bioc. and Biophy. Res. Com.**, v. 15 p. 127- 131, 1964.

SHARMA, S.; MOON, C.S.; KHOGALI, A. ; HAIDOUS, A.; CHABENNE, A. ; OJO, C.; JELEBINKOV, M. ; KURDI, Y.; EBADI, M. Biomarkers in Parkinson's disease (recent update), **Neurochem. Int**, v. 63, p. 201–229, 2013.

SCHWIMMER, C.; RAK, M.; LEFEBVRE-LEGENDRE, L.; DUVEZIN-CAUBET, S.; PLANE, G.; DI RAGO, J.P. Yeast models of human mitochondrial diseases: From molecular mechanisms to drug screening. **Biotechnol. J**, v. 1, p. 270–281, 2006.

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

SHERMAN, F.; HICKS, J. Micromanipulation and dissection of asci. **Methods in Enzymology**, v. 194, p. 21-37, 1992.

SIRUM-CONNOLLY K, MASON TL The role of nucleotide modifications in the yeast mitochondrial ribosome. **Nucleic Acids Symp Ser**, v. 33, p.73-75, 1995.

STEFELY, J.A. ; REIDENBACH, A.G. ; ULBRICH, A. ; ORUGANTY, K. ; FLOYD, B.J.; JOCHEM, A. ; SAUNDERS, J.M.; JOHNSON, I.E. ; MINOGUE, C.E.; .

WROBEL, R.L; BARBER, G.E. ; LEE, D. ; LI, S. ; KANNAN, N. ; COON, J.J.; BINGMAN, C.A. ; PAGLIARINI, D.J. Mitochondrial ADCK3 employs an atypical protein kinase-like fold to enable coenzyme Q biosynthesis, **Mol. Cell**, v. 57, p. 83-94, 2015.

STENMARK, P.; GRUNLER, J.; MATTSSON, J.; SINDELAR, P. J.; NORDLUND, P.; BERTHOLD, D. A. A new member of the family of di-iron carboxylate proteins. Coq7 (clk-1), a membrane-bound hydroxylase involved in ubiquinone biosynthesis. **J. Biol. Chem**, v. 276, n. 36, p. 33297-33300. 2001.

STRUHL K. Nucleotide sequence and transcriptional mapping of the yeast pet56-his3-ded1 gene region. **Nucleic Acids Res**, v. 13, n. 23, p. 8587-601, 1985.

SUEL, G.M.; LOCKLESS, S.W. ; WALL, M.A.; RANGANATHAN, R. Evolutionarily conserved networks of residues mediate allosteric communication in proteins. **Nat. Struct. Biol**, v. 10, p. 59-68, 2003.

SUSIN, S. A.; LORENZO, H. K.; ZAMZAMI, N.; MARZO, I.; SNOW, B. E.; BROTHERS, G. M.; MANGION, J.; JACOTOT, E.; COSTANTINI, P.; LOEFFLER, M. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. **Nature**, v. 397, n. 6718, p. 441–446, 1999.

SUZUKI K, UEDA M, YUASA M, NAKAGAWA T, KAWAMUKAI M, MATSUDA H. Evidence that Escherichia coli ubiA product is a functional homolog of yeast COQ2, and the regulation of ubiA gene expression. **Biosci. Biotechnol. Biochem**, v. 58, n.10, p. 1814-1819, 1994.

TAIT, S. W.; GREEN, D. R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol**, v. 11, p. 621-632, 2010.

TAUCHE, A.; KRAUSE-BUCHHOLZ, U.; RÖDEL, G. Ubiquinone biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae: the molecular organization of O-methylase Coq3 depends on Abc1p/Coq8p. **FEMS Yeast Res**, v. 8, p. 1263-1275, 2008.

TRAN, U. C.; MARBOIS, B.; GIN, P.; GULMEZIAN, M.; JONASSEN, T.; CLARKE, C. F. Complementation of Saccharomyces cerevisiae coq7 mutants by mitochondrial targeting of the Escherichia coli UbiF Polypeptide: two functions of yeast Coq7 polypeptide in coenzyme Q biosynthesis. **J. Biol. Chem**, v. 281, p. 16401-16409, 2006.

TRAN, Y. C.; CLARKE, C. F. Endogenous synthesis of coenzyme Q in eukaryotes. **Mitochondrion**, v. 7, p. S62-S71, 2007.

TRAN, P.H., KORSZUN, Z.R., CERRITELLI, S., SPRINGHORN, S.S., LACKS, S.A. Crystal structure of the DpnM DNA adenine methyltransferase from the DpnII restriction system of streptococcus pneumoniae bound to S-adenosylmethionine. **Structure**, v. 6, p. 1563-1575, 1998.

TRUMPOWER, B. L. The Protonmotive Q Cycle. **J. Biol. Chem**, v. 265, n. 20, p. 11409-11412, 1990.

TURUNEN, M.; OLSSON, J.; DALLNER, G. Metabolism and function of coenzyme Q. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1660, p. 171-199, 2004.

TZAGOLOFF, A.; AKAI, A.; NEEDLEMAN, R. B. Assembly of the mitochondrial membrane system. Characterization of nuclear mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with defects in mitochondrial ATPase and respiratory enzymes. **J. Biol. Chem**, v. 250, p. 8228-8235, 1975.

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

TZAGOLOFF, A.; DIECKMANN, C. L. *PET* Genes of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol. Rev**, v. 54, n. 9, p. 211-225, 1990.

TZAGOLOFF, A.; MYERS, A. M. Genetics of mitochondrial biogenesis. **Ann. Rev. Biochem**, v. 55, p. 249–285, 1986.

VANLERBERGHE, G. C.; MCINTOSH, L. Alternative oxidase: from gene to function. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 48, p. 703-734, 1997.

WALLACE, D. C. A mitochondrial Paradigm of Metabolic and Degenerative Diseases, Aging, and Cancer: A Dawn for Evolutionary Medicine. **Annu. Rev. Genet.**, v. 39, p. 359–407, 2005.

WANG Y, HEKIMI S. Mitochondrial respiration without ubiquinone biosynthesis. **Hum. Mol. Genet**, v. 22, n. 23, p. 4768-4783, 2013.

WHEELER, B., JIA, Z. Preparation and characterization of human ADCK3, a putative atypical kinase. **Protein Expr. Purif**, v.108, p. 13-17, 2015.

WINDE, J.H.; GRIVELL, L.A. Global regulation of mitochondria biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Bio**, v. 45, p. 51-91, 1993.

WONG, L.C. Molecular genetics of mitochondrial disorders. **Develop. Disab. Res. Rev**, v.16, p.154 – 162, 2010.

XIE, L. X., HSIEH, E. J., WATANABE, S., ALLAN, C. M., CHEN, J. Y., TRAN, U. C., CLARKE, C. F. Expression of the human atypical kinase ADCK3 rescues coenzyme Q biosynthesis and phosphorylation of Coq polypeptides in yeast coq8 mutants. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1811, p. 348-360, 2011.

XIE, L. X., OZEIR, M., TANG, J. Y., CHEN, J. Y., JAQUINOD, S. K., FONTECAVE, M., CLARKE, C.F.,PIERREL, F. Overexpression of the Coq8 Kinase in *Saccharomyces cerevisiae* coq Null Mutants Allows for Accumulation of Diagnostic Intermediates of the Coenzyme Q₆ Biosynthetic Pathway. **J. Biol. Chem**, v. 287, p. 23571-23581, 2012.

XING, G.; CHEN, Z.; CAO, X. Mitochondrial rRNA and tRNA and hearing function. **Cell Research**, v.17, p. 227-239, 2007.

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

ZAMPOL, M.A., BUSO, C., GOMES, F., FERREIRA-JUNIOR, J.R., TZAGOLOFF, A., BARROS, M. H.. Over-expression of COQ10 in *Saccharomyces cerevisiae* inhibits mitochondrial respiration. **Biochem. Biophys. Res. Comm**, v. 402, p. 82-87, 2010.

ZHANG, F.; PRACHEIL, T.; THORNTON, J.; LIU, Z. Adenosine Triphosphate (ATP) Is a Candidate Signaling Molecule in the Mitochondria-to-Nucleus Retrograde Response Pathway. **Genes**, v. 4, n. 1, p. 86–100, 2013.

ZUBIETA, C., KOTA, P., FERRER, J.L., DIXON, R.A., NOEL, J.P. Structural basis for the modulation of lignin monomer methylation by caffeic acid/5-hydroxyferulic acid 3/5-O-methyltransferase. **Plant Cell**, v. 14, p 1265-1277, 2002