BRUNO SPINETTI MODA

**Estudos do gene nuclear *MSC6* envolvido na tradução mitocondrial em
*Saccharomyces cerevisiae***

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Microbiologia, para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo.

**SÃO PAULO
2016**

BRUNO SPINETTI MODA

Estudos do gene nuclear *MSC6* envolvido na tradução mitocondrial em
Saccharomyces cerevisiae

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Microbiologia, para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Mário Henrique de Barros

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

SÃO PAULO
2016

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

© reprodução total

Moda, Bruno Spinetti.

Estudos do gene nuclear MSC6 envolvido na tradução mitocondrial em *Saccharomyces cerevisiae* / Bruno Spinetti Moda. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Mario Henrique de Barros.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Biogênese mitocondrial.

Versão do título para o inglês: Studies of MSC6 nuclear related with mitochondrial translation in *Saccharomyces cerevisiae*.

1. Mitocôndria 2. *Saccharomyces cerevisiae* 3. Respiração celular
4. Tradução mitocondrial I. Barros, Mario Henrique II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0108/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Bruno Spinetti Moda.

Título da Dissertação: Estudos do gene nuclear MSC6 envolvido na tradução mitocondrial em *Saccharomyces cerevisiae*.

Orientador(a): Mario Henrique de Barros.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Cidade Universitária "Armando de Sales Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB II - 05508-000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 5091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **814/2016** referente ao projeto intitulado: *"Estudos de genes nucleares envolvidos na tradução mitocondrial em *S. cerevisiae*"* sob a responsabilidade de **Bruno Spinetti Moda** e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Mário Henrique de Barros**, do Departamento de Microbiologia, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pela **CEPSH** - Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 08 de junho de 2016.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador CEUA ICB/USP

Prof. Dr. **Paulo Marinho A. Zanotto**
Coordenador CEPSH ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Ao longo de todo o período do mestrado recebi ajuda e apoio de diversas pessoas, sem as quais esse trabalho não teria sido realizado e as quais sempre serei grato.

Ao Professor Mário Henrique de Barros, por ter me recebido em seu laboratório, pela sua orientação, pela total disponibilidade, por todo o seu conhecimento que me foi transmitido e por sempre me auxiliar a solucionar dúvidas e dificuldades que surgiram ao longo deste trabalho.

Ao Professor José Ribamar dos Santos Ferreira Jr. Docente da Universidade de São Paulo, na Escola de Artes, Ciências e Humanidades, por toda a ajuda conferida durante esse projeto de mestrado, que além dessa dissertação gerou uma publicação no início desse ano.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, Raquel, Letícia, Ana, Cláudia, Carolina, Erik, Ralph, Tais, Tadeu, e todos os outros que também estiveram ao meu lado durante esse período, sempre me ajudando e apoiando, principalmente nos momentos difíceis.

Por último, dirijo um agradecimento especial aos meus pais e irmãos, pela paciência, compreensão e principalmente à Bianca, minha namorada, por todo o seu apoio durante essa fase, pela sua parceria e companheirismo, sempre me motivando e dando forças para continuar e finalizar este trabalho.

RESUMO

MODA, B. S. **Estudos do gene nuclear MSC6 envolvido na tradução mitocondrial em *Saccharomyces cerevisiae*** título da sua dissertação em. 2016. 52 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2016.

A participação em diversos processos celulares torna a mitocôndria um componente essencial para a célula eucariótica. Sendo assim, mutações que comprometam seu funcionamento podem gerar danos severos à célula, causando as chamadas doenças mitocondriais, que são o maior grupo de doenças hereditárias conhecidas, além de estarem relacionadas com doenças neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer. Dessa maneira, é de fundamental importância que sejam realizados estudos a respeito da biogênese mitocondrial para compreender seu funcionamento na saúde e na doença, de forma que seja possível elaborar novas formas de tratamento. Por ser um aeróbico facultativo, e o grande avanço na sua manipulação genética *Saccharomyces cerevisiae* é considerada o melhor modelo de estudo de biogênese mitocondrial. Foi descrito em nosso laboratório o gene nuclear *GTF1* como necessário para o processo de tradução das proteínas mitocondriais em *S. cerevisiae* conjuntamente com Pet112p e Her2/Qrs1p e para o suprimento de glutaminil-tRNA^{Gln} na organela. O mutante de ponto dominante de *HER2/QRS1* levou ao isolamento de *MSC6* como um supressor multicópia que restaurou parcialmente a capacidade respiratória desse mutante. Msc6p é uma proteína com domínios PPR típicos para ligação a RNA sem função conhecida. Neste trabalho foi verificada a presença da proteína codificada por *MSC6* na matriz mitocondrial, além de verificar que sua ausência prejudica o processo respiratório, que pode estar relacionado com a alteração da síntese proteica mitocondrial e a redução da atividade do complexo III, da cadeia respiratória da mitocôndria. Msc6p não apresenta interação física com Qrs1p. Estudos genéticos indicam também deficiência respiratória sintética quando o mutante nulo *msc6* é combinado com mutante *fnt1*; Fnt1p é a metionil-formil-transferase envolvida no início do processo de tradução mitocondrial. Concluindo, está clara a participação de Msc6p no processo traducional mitocondrial, mas novos estudos serão necessários para determinar a função específica de Msc6p.

Palavras-chave: Mitocôndria. *Saccharomyces cerevisiae*. Respiração celular. Tradução mitocondrial.

ABSTRACT

MODA, B. S. **Studies of *MSC6* nuclear gene related with mitochondrial translation in *Saccharomyces cerevisiae***. 2016. 52 p. Masters thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2016.

Mitochondria is necessary in many cellular processes, therefore, compromised mutations of its operation can cause severe damage to the cell, known as mitochondrial disorders, the largest group of known inherited diseases, besides being related with neurodegenerative diseases, like Parkinson's and Alzheimer's. Thus is necessary the realization of mitochondrial biogenesis studies in order to fully understand its functioning in health and disease. Mitochondria biogenesis studies are favored in *Saccharomyces cerevisiae* mainly due to its aerobic facultative condition allied to the great power of yeast genetics. We have previously characterized Gtf1p, Pet112p and Qrs1p as components of a protein complex, essential for the mitochondrial translation process, responsible for supplying the mitochondrial glutaminyl-tRNA^{Gln}. Particularly, *HERS2/QRS1* dominant mutants were suppressed by over expression of *MSC6*. Msc6p has a PPR protein motif likely associated to RNA binding but with unknown function. In this work we discovered that Msc6p is localized in the mitochondrial matrix, also that disruption of *MSC6* implies in respiratory defects, which can be associated with the slight decrement of the mitochondrial translation and diminished activity of respiratory chain complex III. Msc6p did not physically interact with Qrs1p, on the other hand, synthetic respiratory deficiency arose when the *msc6* null mutant was combined with *fnt1* null mutant. Fnt1p is a methionyl-tRNA-formyl-transferase required for mitochondrial translation initiation. In conclusion, is clear the role of *MSC6* in the mitochondrial translational process, but further studies are required to indicate the specific function of Msc6p.

Keywords: Mitochondria. *Saccharomyces cerevisiae*. Cellular respiration. Mitochondrial translation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Biogênese da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial em humanos.....	12
Figura 2 -	Representação esquemática da via indireta de formação do Q-tRNA ^Q produzido na mitocôndria. O _{mt} tRNA ^Q é aminoacilado pela enzima não discriminativa Etamil-tRNA sintase importada do citoplasma (cERS) gerando E-tRNA ^Q	16
Figura 3 -	Propriedades de <i>QRS1</i> e seus mutantes.....	30
Figura 4 -	Propriedades de <i>MSC6</i> e seu mutante nulo.....	31
Figura 5 -	Ensaio de síntese proteica mitocondrial.....	33
Figura 6 -	Msc6p é uma proteína da matriz mitocondrial.....	35
Figura 7 -	Sedimentação de Msc6p e Qrs1p em gradiente de sacarose.....	36
Figura 8 -	Análise dos transcritos mitocondriais no mutante nulo <i>msc6</i>	37
Figura 9 -	Propriedades do duplo mutante <i>msc6;fmt1</i>	39
Figura 10 -	Atividade enzimática dos complexos da cadeia de fosforilação oxidativa mitocondrial.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Linhagens utilizadas.....	20
Tabela 2 -	Iniciadores utilizados.....	21
Tabela 3 -	Tratamentos realizados para localização proteica intramitocondrial.....	25

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	Importância da mitocôndria	11
1.2	Doenças mitocondriais	12
1.3	Utilizando <i>S. cerevisiae</i> como modelo de estudo da biogênese mitocondrial	14
1.4	A via específica de transaminação de tRNAs	15
2	OBJETIVOS.....	19
2.1	Objetivos Específicos.....	19
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1	Linhagens utilizadas.....	20
3.2	Procedimentos gerais para manipulação de <i>S. cerevisiae</i> e <i>E. coli</i>	20
3.3	Construção dos alelos QRS1 através de mutagêneses sítio dirigida	22
3.4	Clonagem de <i>MSC6</i> e construção de seu mutante nulo	22
3.5	Construção do duplo mutante <i>msc6, fmt1</i>	23
3.6	Construção de ORFs fusionadas com epítomos	23
3.7	Isolamento de mitocôndrias	23
3.8	Ensaio de solubilidade proteica	24
3.9	Localização proteica intramitocondrial.....	24
3.10	Ensaio de crescimento com diluição seriada.....	25
3.11	Análise de peptídeos mitocondriais recém-sintetizados	25
3.12	Gradiente de Sacarose	26
3.13	Isolamento de RNA dos transcritos mitocondriais e Northern Blot.....	26
3.14	Medição da atividade dos complexos respiratórios III e IV	27
4	RESULTADOS.....	28
4.1	Resíduos G128, D150, e R156 de Qrs1p apresentam indícios de co-evolução e são essenciais para o funcionamento da proteína	28
4.2	Propriedades traducionais da mitocôndria do mutante <i>msc6</i> e das linhagens contendo o alelo dominante <i>QRS1</i> _{D150R}	31
4.3	Localização intramitocondrial de Msc6p	33
4.4	Msc6p não interage com Qrs1p.....	35
4.5	Análise de Northern Blot de transcritos mitocondriais	36
4.6	Interação Genética de <i>MSC6</i> com <i>FMT1</i>	37
4.7	Caracterização Bioquímica dos Mutantes <i>msc6</i>	39
5	DISCUSSÃO.....	41
6	CONCLUSÃO	44
	REFERÊNCIAS*.....	45
	APÊNDICE	54
	A - Partial suppression of the respiratory defect of <i>qrs1/her2</i> glutamyl-tRNA amidotransferase mutants by overexpression of the mitochondrial pentatricopeptide Msc6p	54

1 INTRODUÇÃO

1.1 Importância da mitocôndria

A mitocôndria é uma das organelas mais importantes da célula eucariótica, comumente definida como a “usina energética” da célula eucariótica. De fato, a produção de energia (sob a forma de ATP) realizada pela mitocôndria, através do processo de fosforilação oxidativa, foi um dos alicerces que estabeleceram o sucesso dos eucariontes (ANDERSSON et al., 2003; GABALDÓN; HUYNEN, 2003). A fosforilação oxidativa se dá na cadeia transportadora de elétrons (c.t.e.) presente na membrana interna da mitocôndria. Esse processo, a etapa final da respiração celular, é realizado por complexos proteicos (I-IV), que transferem os elétrons obtidos de nutrientes, para moléculas de oxigênio, formando moléculas de água. Além do transporte de elétrons, os complexos respiratórios promovem a translocação de átomos de hidrogênio da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, gerando um gradiente eletroquímico que normalizado pelo complexo V (ou ATP sintase), que bombeia os prótons de volta para a matriz, ao mesmo tempo em que sintetiza ATP, a partir de ADP e P_i . Além da produção de energia, a mitocôndria também desempenha funções essenciais em processos vitais para a célula como a morte celular programada (LIU et al., 1996; SUSIN et al., 1999), e também na regulação da longevidade da célula (BONAWITZ et al., 2007; HOLZENBERGER et al., 2003), além de participar em outros diversos processos bioquímicos.

O estudo da biogênese mitocondrial procura compreender como os componentes e complexos da cadeia transportadoras de elétrons são montados e organizados. Contudo, esse processo é marcado pela interação entre dois genomas: o mitocondrial e o nuclear, uma singularidade que os distingue profundamente de todos os outros complexos enzimáticos das nossas células em acordo com a teoria de origem simbiótica da mitocôndria, a qual explica que essa organela foi originada de uma α -protobactéria ancestral englobada por uma célula eucariótica primordial (MARGULIS, 1974), e gradualmente ocorreu a transferência de grande parte dos genes da bactéria para os cromossomos nucleares (DOLEZAL et al., 2006).

Na figura 1 é possível observar os complexos da cadeia transportadora de elétrons, em humanos, apresentando os complexos compostos por subunidades codificadas tanto no núcleo, como na própria mitocôndria. O complexo I (NADH-ubiquinona oxidoredutase) contém sete subunidades codificadas pelo mtDNA e pelo menos 37 codificadas pelo ge-

noma nuclear. Neste complexo, os elétrons são transferidos do NADH, transportador de elétrons principal do ciclo de Krebs e da oxidação do piruvato, para um carreador hidrofóbico de elétrons móvel, a ubiquinona (Coenzima Q, CoQ). O complexo II (succinato-ubiquinona oxirredutase) é composto por apenas quatro subunidades, todas codificadas pelo genoma nuclear, e este promove a transferência dos elétrons do FADH_2 , derivado principalmente da oxidação beta de ácidos graxos, para a CoQ. O complexo III (ubiquinol-ferrocitocromo c oxirredutase) possui apenas uma subunidade codificada pelo mtDNA e 10 subunidades pelo genoma nuclear. Este complexo é responsável pela transferência dos elétrons ocorrida de CoQ para o citocromo c, que irá transferi-los para o complexo IV. O complexo IV (citocromo c oxidase) é composto por três subunidades codificadas pelo mtDNA e 11 pelo genoma nuclear.

Figura 1 - Biogênese da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial em humanos. A biogênese dos complexos (I a IV) e a ATP sintase (complexo V) envolve a montagem de subunidades codificadas pelos genomas nuclear (verde) e mitocondrial (roxo). Os cinco complexos possuem ao total 89 subunidades. Treze são traduzidas no interior da organela, e normalmente representam o sítio catalítico do respectivo complexo. Fonte: (FIGUEIRA et al., 2013)

1.2 Doenças mitocondriais

Devido à importância dessa organela, é possível entender como qualquer modificação que comprometa o seu funcionamento pode gerar danos severos à célula, provocando as doenças mitocondriais, denominação normalmente atribuída para problemas no processo de fosforilação oxidativa (FERREIRO-BARROS; BARROS, 2013). As doenças mitocondriais são o maior grupo de doenças hereditárias, sendo a frequência de ocorrência de um a cada 10.000 indivíduos (CHINNERY et al., 2012). Podem surgir de mais de 1200 mutações gênicas diferentes, sejam elas hereditárias, ou causadas por agentes ambientais (como efeitos adversos de drogas, ou infecções), ou até mesmo adquiridas

espontaneamente durante o envelhecimento (DIMAURO; SCHON, 1998; LUFT, 1994; WALLACE, 2005). São classificadas em duas classes, dependendo de qual genoma, mitocondrial ou nuclear, carrega as mutações responsáveis pela doença.

As mutações no mtDNA foram descritas pela primeira vez em 1988, quando a primeira mutação patogênica foi descoberta (HOLT; HARDING; MORGAN-HUGHES, 1989). As mutações podem ser pontuais, homo ou heteroplásmicas, ou rearranjos em larga escala (VISCOMI; BOTTANI; ZEVIANI, 2015). Um aspecto único da genética mitocondrial trata-se de que cada mitocôndria pode apresentar mais de uma cópia do genoma mitocondrial (SATO; KUROIWA, 1991), e cada célula pode possuir de algumas dúzias a centenas de mitocôndrias, dependendo do tipo celular. Em indivíduos normais, os mtDNAs são idênticos entre si, uma condição denominada homoplasmia. Entretanto, mutações patogênicas presentes em parte das moléculas de mtDNA frequentemente coexistem com moléculas não modificadas, condição essa denominada heteroplasmia (BOURSOT; YONEKAWA; BONHOMME, 1987; SOLIGNAC; MONNEROT; MOUNOLOU, 1983). Se o número de moléculas de mtDNA mutantes ultrapassar um determinado nível, sinais clínicos e disfunções teciduais aparecerão. Esse nível é mais facilmente atingido em tecidos apresentando uma alta demanda energética, como o cerebral, muscular ou cardíaco (DIMAURO; BONILLA; DARRYL, 1999).

Mutações heteroplásmicas pontuais foram encontradas em todos os genes mitocondriais, levando a diferentes manifestações clínicas, como a encefalomiopatia mitocondrial com acidose láctica e episódios tipo AVC (do inglês, MELAS) (GOTO; NONAKA; HORAI, 1990). Os sintomas observados em pacientes apresentando mutações no mtDNA são muito heterogêneos, variando de encefalopatia, cardiomiopatia e até oftalmoplegia (FIGUEIRA et al., 2013). Além disso, existem evidências que deleções no mtDNA podem estar associadas às doenças de Parkinson, Alzheimer e outras doenças neurodegenerativas (WALLACE; RUIZ-PESINI; MISHMAR, 2003).

A primeira mutação nuclear a ser associada secundariamente com múltiplas deleções do mtDNA foi descrita em 1999, um defeito no gene que codifica uma timidina fosforilase, enzima que não se localiza na mitocôndria, mas está funcionalmente relacionada com a replicação do mtDNA. A enzima defeituosa altera a composição de nucleotídeos presentes na matriz mitocondrial (NISHINO; SPINAZZOLA; HIRANO, 1999). As mutações nucleares que promovem doenças mitocondriais ocorrem em mais de 1200 genes diferentes relacionados direta ou indiretamente com a cadeia respiratória

(SCHARFE et al., 2009). Esses genes codificam proteínas envolvidas na manutenção e/ou na maquinaria de replicação do mtDNA; subunidades estruturais dos complexos da cadeia respiratória; fatores de montagem dos complexos; componentes da maquinaria de tradução mitocondrial, e proteínas pertencentes às outras vias bioquímicas da mitocôndria, como fissão/fusão e apoptose (KOOPMAN et al., 2012).

A partir desse contexto, é de fundamental importância a realização de estudos a respeito da biogênese mitocondrial, de forma que a interação entre os dois genomas possa ser melhor compreendida, e assim esclarecer o funcionamento das doenças mitocondriais com o objetivo de elaborar formas de tratamento eficazes.

1.3 Utilizando *S. cerevisiae* como modelo de estudo da biogênese mitocondrial

Saccharomyces cerevisiae é considerado o melhor modelo para estudo da biogênese mitocondrial. Por ser um organismo aeróbico facultativo, mutantes respiratórios podem ser rapidamente detectados e isolados em meio seletivo apropriado, além de ser o primeiro eucarioto a ter seu genoma totalmente sequenciado (GOFFEAU et al., 1996). Agregam-se às vantagens do uso de *S. cerevisiae* o extenso conhecimento que possuímos sobre seu ciclo de vida, formas de cultivo e manipulação genética, transformando-o também, no principal modelo de funcionamento da célula eucariótica, incluindo as relacionadas às patologias humanas (BARRIENTOS, 2003; BARROS et al., 2010). Apresenta um mtDNA de aproximadamente 85kb, e 2/3 do seu genoma consiste de sequências não codificantes como espaçadores e introns (FOURY et al., 1998). O mtDNA de levedura 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: *VARI*, genes para os rRNAs 15S e 21S e 24 tRNAs correspondentes aos 20 aminoácidos (FUKUHARA; WESOLOWSKI, 1979; LIPINSKI et al., 2010). A manutenção de um genoma fora do núcleo envolve gastos e recursos da célula eucariótica; em *S. cerevisiae* há pelo menos 120 proteínas codificadas pelo núcleo que estão diretamente envolvidas na manutenção e expressão do DNA organelar (MERZ; WESTERMANN, 2009). Curiosamente, a estabilidade do mtDNA depende da sua completa capacidade traducional, pois mutantes cuja modificação leve a uma deficiência traducional pleiotrópica não são capazes de manter o mtDNA (MYERS et al., 1985).

1.4 A via específica de transaminação de tRNAs

A expressão e tradução de proteínas no interior da mitocôndria dependem de mais de cem produtos gênicos nucleares. Várias dessas proteínas estão diretamente envolvidas com o metabolismo de RNA de diversas formas (BARRIENTOS, 2015; KEHREIN et al., 2015; KEHREIN; VARGAS MÖLLER-HERGT; OTT, 2015), e são necessárias para a transcrição e maturação do RNA, montagem do mitoribossomo, modificações nos tRNAs, maturação de mRNA e “turnover” (regulação existente entre a síntese e a degradação de um determinado componente).

O processo de tradução exige que os tRNAs celulares sejam corretamente carregados com seus respectivos aminoácidos cognatos. As enzimas responsáveis por esse carregamento são as aminoacil-tRNA sintases (aaRS). Acreditava-se que para a sobrevivência da célula era necessária a presença das 20 enzimas aaRS, específicas para cada aminoácido existente. Mas com as informações obtidas a partir do sequenciamento do genoma de diversos organismos de todos os Domínios (Archaea, Bacteria e Eukarya) foi verificado que apenas o citoplasma de eucariontes e algumas bactérias apresentam toda a família das aaRS. A maioria dos procariotos e organelas possui uma via alternativa de transaminação, de tRNAs aminoacilados incorretamente, para suprir a ausência de aaRS específicas (FENG et al., 2004).

Essa via alternativa foi inicialmente descoberta em *Bacillus subtilis* (WILCOX; NIRENBERG, 1968), que não possui as aaRSs para glutamina (QRS) e para asparagina (NRS). Esse sistema promove a geração de N-tRNA^N e Q-tRNA^Q em duas etapas: 1^a- inserção não cognata por aminoacil-tRNA sintases não discriminativas de D-tRNA^N e E-tRNA^Q; 2^a- o ácido aspártico (D) e o ácido glutâmico (E) são transamidados para asparagina (N) e glutamina (Q), respectivamente, por uma reação de amidotransferase (AdT), catalisada pelo complexo heterotrimérico GatCAB (glutamil-tRNA^Q amidotransferase CAB) (SHEPPARD; SÖLL, 2008). O processo de transaminação é iniciado com a subunidade GatB que fosforila o grupo carboxila do glutamil ligado ao tRNA^Q (WILCOX, 1969), em seguida, a subunidade GatA realiza a amidação do intermediário ativado pela fosforilação (FENG et al., 2005). A subunidade GatC é necessária para ligar as subunidades catalíticas do complexo e também para manter a estabilidade do complexo (NAKAMURA et al., 2006).

A via indireta de produção de Q-tRNA^Q também foi descrita em cloroplastos (SCHÖN et al., 1988) e em mitocôndrias (BARROS et al., 2011; FRECHIN et al., 2009;

NAGAO et al., 2009; PUJOL et al., 2008). Nas organelas a reação de transaminação é feita pelo complexo GatFAB (BARROS et al., 2011; FRECHIN et al., 2009) apenas do E-tRNA^Q, já que apresentam NRS para aminoacilar diretamente o tRNA^N (BONNEFOND et al., 2005). Além disso, a enzima não discriminativa ERS que participa desse processo é proveniente do citoplasma (cERS). Apesar de existir na mitocôndria (mtERS), esta é específica, não sendo capaz de aminoacilar o tRNA^Q, dessa maneira é necessária a importação da cERS. Na figura 2 está representada a via de formação do Q-tRNA^Q na mitocôndria, após a importação da ERS citosólica. Verificou-se em *S. cerevisiae* que cERS faz parte de um complexo citoplasmático multi-aminoacil-tRNA sintase, onde se encontra ligada a proteína âncora Arc1p que também faz ligação com a enzima citosólica metionil-tRNA sintase (cMRS). Quando há alteração do metabolismo fermentativo para o respiratório, ocorre uma redução dos níveis de Arc1p resultando em uma maior quantidade de moléculas livres de cERS, que são importadas para a mitocôndria, onde irão participar da via indireta de produção de Q-tRNA^Q (FRECHIN et al., 2009, 2014).

Figura 2 - Representação esquemática da via indireta de formação do Q-tRNA^Q produzido na mitocôndria. O mttRNA^Q é aminoacilado pela enzima não discriminativa glutamyl-tRNA sintase importada do citoplasma (cERS) gerando E-tRNA^Q. Em seguida, o complexo enzimático heterotrimérico GatFAB promove uma reação de transaminação que converte o grupo glutamyl em glutaminil, gerando assim o Q-tRNA^Q.

As subunidades GatA e GatB bacterianas apresentam homólogos em *S. cerevisiae* (*QRS1/HER2* e *PET112*, respectivamente, codificados no núcleo) (FRECHIN et al., 2009; HUGHES et al., 2000; MULERO; ROSENTHAL; FOX, 1994). Mutantes *pet112* apresentam defeitos respiratórios que são corrigidos pela expressão heteróloga da subunidade GatB de *B. subtilis* fusionada a uma sequência de endereçamento mitocondrial (KIM et al., 1997). Foi verificado ainda que Pet112p é co-purificada com Qrs1p e Ygr102p e juntos são capazes de realizar a transaminação do E-tRNA^Q *in vitro* (FRECHIN et al., 2009).

Em Barros e colaboradores (2011), a ORF YGR102c foi nomeada como GTF1 (glutaminyl transamidase subunit F) e foi verificado que na ausência de Gtf1p funcional os polipeptídeos mitocondriais Atp8p e Cox2p recém sintetizados eram mais rapidamente

degradados e apresentavam propriedades eletroforéticas diferenciadas decorrentes da provável incorporação de resíduos glutamílicos nos códons para glutamina. *PET112* foi então isolado como supressor genético multicópia de mutantes *gtf1* e a presença de cópias extras de *QRS1/HER2* melhoraram ainda mais essa supressão. Embora Gtf1p não apresente homologia com GatC bacteriano (BARROS et al., 2011), a sua modelagem estrutural se assemelha a proteína conectora GatC, com exceção de um domínio na extremidade N-terminal, que não está presente no ortólogo bacteriano GatC (FERREIRA-JÚNIOR et al., 2013). Gtf1p também realiza a conexão entre as subunidades catalíticas da AdT mitocondrial e esse domínio na extremidade N-terminal pode atuar como suporte para o sítio catalítico da glutaminase codificada por *QRS1/HER2* (ARAISSO et al., 2014).

A subunidade A da amidotransferase mitocondrial foi nomeada como *QSL1* em humanos e *QRS1* em *Schizosaccharomyces pombe*. É proposta aqui a renomeação do mesmo gene para *QRS1* no lugar de *HER2*, em *Saccharomyces cerevisiae*, considerando o papel de Qrs1p na formação do glutamínil-tRNA^G.

A fim de melhor entender a função desse complexo AdT mitocondrial realizou-se um estudo de comunidades de aminoácidos, o qual pode revelar a existências de subclasses funcionais dessa família (BLEICHER; LEMKE; GARRATT, 2011). Ao realizar essa análise na família das transamidases da qual faz parte Qrs1p foi verificada a existência de um subconjunto de três aminoácidos, G128 (glicina na posição 128 da cadeia polipeptídica que compõe a proteína), D150 (ácido aspártico na posição 150) e R156 (arginina na posição 156), que apresentam fortes indícios de co-evolução, distintos dos outros conjuntos presentes nessa proteína (FERREIRA-JÚNIOR et al., 2013).

Utilizando o subconjunto de aminoácidos descoberto foram realizados experimentos prévios (que serão explicados com maiores detalhes na seção de Resultados deste trabalho). Mutantes dos resíduos selecionados de Qrs1p foram produzidos (G128L, R156D e D150R) e inseridos em linhagens mutante nula *qrs1* e selvagem de *S. cerevisiae* (W303-1A). Os três mutantes de ponto não foram capazes de complementar a deficiência respiratória na linhagem contendo o mutante nulo *qrs1*, indicando que não são funcionais. Curiosamente, o alelo contendo a mutação D150R se mostrou dominante sobre o alelo selvagem de *QRS1*, e a linhagem parental também passou a apresentar deficiência de crescimento em meio seletivo para a atividade respiratória. Células contendo o alelo selvagem *QRS1* e o alelo mutante dominante *QRS1*_{D150R} foram transformadas com uma biblioteca genômica de levedura, e apenas um transformante foi capaz de restaurar a

capacidade de respirar, perdida devido a mutação em *QRS1*. O sequenciamento da região inserida no plasmídeo em questão revelou a presença de dois genes do cromossomo XV, *GDS1* e *MSC6*. Subclonagens dessa região confirmaram que somente múltiplas cópias de *MSC6* eram capazes de suprimir a mutação *QRS1*^{D150R}.

MSC6 está descrita no banco de dados de *S. cerevisiae* (www.yeastgenome.org), não tem função conhecida e seu produto gênico se localiza na mitocôndria. Já o fenótipo do seu mutante nulo na linhagem BY4741 apresenta decréscimo da função respiratória. Análises *in silico* da sequência de *MSC6* (LIPINSKI et al., 2011) e através de alinhamentos pelo I-TASSER (ZHANG, 2008) notou-se a presença de domínios estruturais PPR (*proteins pentatricopeptide repeats*) normalmente relacionados a associações com RNAs na mitocôndria, como também o domínio tipo HEAT que leva a uma estrutura em hélice solenoide que, por exemplo, permite o transporte intracelular. Muitas das proteínas PPRs atuam em diferentes etapas do metabolismo do RNA mitocondrial como estabilizadores e ativadores traducionais (HERBERT et al., 2013). Acredita-se que existam pelo menos 15 proteínas com domínios PPR em *S. cerevisiae* (LIPINSKI et al., 2011). Uma das características das proteínas PPRs é a sua rápida divergência evolutiva, Msc6p por exemplo, está restrita aos gêneros *Saccharomyces* e *Kluveromyces* (LIPINSKI et al., 2011).

Este trabalho tem a proposta de realizar o estudo do produto gênico de *MSC6*, procurando entender como este afeta a tradução mitocondrial, e dessa forma contribuir com o trabalho que vem sendo realizado por diversos grupos de pesquisa, a elucidação da proteômica mitocondrial, e consequentemente, a compreensão dessa complexa organela e das doenças mitocondriais.

2 OBJETIVOS

Isolamento e caracterização funcional do supressor da mutação dominante *QRSI*^{D150R}.

2.1 Objetivos Específicos

- Isolamento do supressor multicópia da mutação dominante *QRSI*^{D150R} ;
- Construção de um alelo nulo *msc6* na linhagem W303 de *S. cerevisiae*;
- Localização intramitocondrial de Msc6p;
- Caracterização bioquímica do mutante *msc6* com análise funcional dos complexos respiratórios, avaliação da capacidade traducional e estabilidade e processamento dos RNAs mitocondriais.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Linhagens utilizadas

As linhagens de microrganismos utilizadas neste trabalho estão listadas na tabela 1.

Tabela 1- Linhagens utilizadas

Linhagens <i>E. coli</i>	Genótipo	Referência
RR1	($\Delta(gpt-proA)62$, <i>leuB6</i> , <i>thi-1</i> , <i>lacY1</i> , <i>hsdR20</i> , <i>rpsL20</i> (<i>Str^r</i>), <i>ara-14</i> , <i>galK2</i> , <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>supE44</i> , <i>mcrB8</i>)	(HANAHAN, 1983)
Linhagens <i>S. cerevisiae</i>	Genótipo	Referência
W303-1A	MATa <i>ade2-1 trp1-1 his3-1,15 leu2-3,112 ura3-1</i>	Rothstein, R. Columbia University
a/aW303Δqrs1	MATa/a <i>ade2-1/ade2-1 his3-1,15/his3-1,15 leu2-3,112/leu2-3,112 trp1-1/trp1-1 ura3-1/ura3-1 QRS1/qrs1::HIS3</i>	Barros et al. (2011)
aW303/QRS1-D	MATa <i>ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 QRS1/QRS1-D150R</i>	Este trabalho
a/aW303ΔMSC6/ QRS1-D	MATa/a <i>ade2-1/ade2-1 his3-1,15/his3-1,15 leu2-3,112/leu2-3,112 trp1-1/trp1-1 ura3-1/ura3-1 msc6::URA3 QRS1/QRS1-D150R</i>	Este trabalho
aΔmsc6	MATa <i>ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1^{Rmsc6}::URA3</i>	Este trabalho
aΔmsc6/MSC6-Myc	MATa <i>ade2-1 his3-1,15 trp1-1 ura3-1 msc6::URA3 leu2-3,112::pMSC6-Myc</i>	Este trabalho
aΔmsc6/nMSC6-Myc	MATa <i>ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 msc6::URA3 + pnMSC6-Myc</i>	Este trabalho
aΔmsc6/MSC6	MATa <i>ade2-1 his3-1,15 trp1-1 ura3-1 msc6::URA3 leu2-3,112::pMSC6</i>	Este trabalho
aΔmsc6/nMSC6	MATa <i>ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 msc6::URA3 + pnMSC6</i>	Este trabalho
aΔqrs1/ST10	MATa <i>ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112trp1-1 qrs1::HIS3 ura3-1::pQRS1/ST10</i>	Este trabalho
aΔqrs1Δmsc6/ST1	MATa <i>ade2-1 trp1-1 his3-1,15 leu2-3,112 ura3-1 ρ + qrs1::HIS3 msc6::URA3 ura3-1::pQRS1/ST10 leu2-3,112::pMSC6-Myc</i>	Este trabalho
a Δfnt1	MATa <i>ade2-1 trp1-1 his3-1,15 leu2-3,112 ura3-1 fnt1::URA3</i>	A. Tzagoloff
aΔmsc6Δfnt1	MATa <i>ade2-1 trp1-1 his3-1,15 leu2-3,112 ura3-1 msc6::URA3 fnt1::URA3</i>	Este trabalho

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

- Meios de cultura para crescimento: 1) para levedura: YPD (1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% glicose), YPGal (1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% galactose), YPEG (1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% glicerol, 2% etanol), meio mínimo de glicose (2% glicose, 0.67% “yeast nitrogen ” sem aminoácidos, suplementado com os requerimentos auxotróficos), e meio para esporulação (0,5% extrato de levedura, 0,1% peptona, 0,05% glicose); 2) para bactéria: meio LB (Luria-Bertani) suplementado com o antibiótico ampicilina (ROSE; et al., 1990).

- Transformação de *E. coli* com DNA exógeno, preparação de bactérias competentes pelo método de CaCl_2 , reações de polimerase em cadeia (PCR), ligações entre moléculas de DNA, eletroforese e recuperação de DNA de gel por eletroeluição (SAMBROOK et al., 1989).
- Preparação de DNA plasmidial em média escala por lise com TritonX-100 (AUSUBEL, 2008).
- Transformação de *S. cerevisiae* (SCHIELSTL; GIETZ, 1989).
- Micromanipulação de ascas (SHERMAN; HICKS, 1990).
- Mini preparação de DNA plasmidial (BIMBOIM; DOLY, 1979).
- Mini preparação de DNA genômico de levedura (HOLM et al., 1986).
- Dosagem de proteínas (LOWRY et al., 1951).
- Análise de proteínas por SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970).
- Transferência para nitrocelulose e imunodeteção (TOWBIN et al., 1979).
- Os iniciadores utilizados estão descritos na tabela 2.

Tabela 2 - Iniciadores utilizados

Nome	Sequência (5' -> 3')	Finalidade
MSC6-1	GGCAAGCTTGTGTAGAGCCAAGCGGAA	Clonagem da ORF <i>YOR354C</i> (MSC6) nos vetores YIp352 [*] , YIp351 ^A e YEP351 ^A , utilizado com o iniciador MSC6-2
MSC6-2	GGCAAGCTTGAAGATGTCGCTACCA	Clonagem da ORF <i>YOR354C</i> nos vetores YIp352 ^A , YIp351 ^e e YEP351 ^A , utilizado com o iniciador MSC6-1
MSC6-cMyc	GGCAAGCTTACAGGTCCTCCTCCGAGATGAGCTTCTGCTCAGTCAACTTTTCTGGAACAG	Adição da tag de C-Myc na porção C-terminal de <i>YOR354C</i>
G128L-1	TCATCGTCCGAGCCGCTGC	Construção do alelo mutante QRS1G128L (explicação detalhada no item 3.3)
G128L-2	GGCCTGCAGATGATATTGACTCGACAAAATC	Construção do alelo mutante QRS1G128L (explicação detalhada no item 3.3)
G128L-3	GGCGAGCTCCCTGGTTCAACGATG	Construção do alelo mutante QRS1G128L (explicação detalhada no item 3.3)
G128L-4	GGCTCCGGACGATGAACCTAGCATGATCTTC	Construção do alelo mutante QRS1G128L (explicação detalhada no item 3.3)
D150R-1	GGCCGTACGGGTGGCTCCGTTAGGCTC	Construção do alelo mutante QRS1D150R (explicação detalhada no item 3.3)
D150R-2	GGCCTGCAGATGATATTGACTCGACAAAATC	Construção do alelo mutante QRS1D150R (explicação detalhada no item 3.3)
D150R-3	GGCGAGCTCCCTGGTTCAACGATG	Construção do alelo mutante QRS1D150R (explicação detalhada no item 3.3)
D150R-4	GGCCGTACGTGTTCCCAAGGCAAAAATC	Construção do alelo mutante QRS1D150R (explicação detalhada no item 3.3)
R156D-1	GGCCTGCAGATGATATTGACTCGACAAAATC	Construção do alelo mutante QRS1R156D (explicação detalhada no item 3.3)
R156D-2	GGCGTCGACCTCCCCGATGCTATGGA	Construção do alelo mutante QRS1R156D (explicação detalhada no item 3.3)
R156D-3	GGCGAGCTCCCTGGTTCAACGATG	Construção do alelo mutante QRS1R156D (explicação detalhada no item 3.3)
R156D-4	GGCGTCGACGGAGCCACCAGTATCTG	Construção do alelo mutante QRS1R156D (explicação detalhada no item 3.3)

* (HILL et al., 1986) ; As regiões sublinhadas referem-se aos sítios de restrição

3.3 Construção dos alelos QRS1 através de mutagêneses sítio dirigida

Os alelos *QRS1*_{G128L}, *QRS1*_{D150R}, e *QRS1*_{R156D} foram criados a partir de amplificação por PCR (2 reações separadas) do gene presente no vetor pG27/ST3 (BARROS et al., 2011), utilizando iniciadores especificados na tabela 3.2. Para o alelo QRS1G128L, o primeiro fragmento de 980 pares de bases (pb) foi amplificado com os iniciadores G128L-1 e 2 e digerido pelas enzimas *BspEI* e *PstI*. Na segunda reação, os iniciadores G128L-3 e 4 amplificaram um produto de 740 pb, o qual foi digerido por *BspEI* e *SacI*. Para o alelo *QRS1*_{D150R} foram utilizados os iniciadores D150R-1 e 2 para amplificar um produto de 920 pb, o qual foi digerido pelas enzimas *BsiWI* e *PstI*. O segundo fragmento, de 800 pb, foi amplificado com os iniciadores D150R-3 e 4 e digerido com as enzimas *BsiWI* e *SacI*. Para o mutante *QRS1*_{R156D} foram utilizados os pares de iniciadores R156D-1 e 2, e R156D-3 e 4, que geraram fragmentos com 900 pb e 820 pb, respectivamente, sendo o primeiro fragmento digerido com *PstI* e *SalI*, e o segundo com *SalI* e *SacI*. Os fragmentos digeridos de cada clonagem foram ligados e inseridos no vetor YIp352 (HILL et al., 1986) utilizando as enzimas de restrição apropriadas para cada clonagem. Cada gene mutante foi sequenciado, e os plasmídeos correspondentes linearizados, com *NcoI* localizado no gene *URA3* presente no vetor YIp352, e recombinados no locus cromossomal de *URA3* da linhagem diploide heterozigota $a/\alpha W303\Delta QRS1$ (BARROS et al., 2011). Os transformantes diploides foram esporulados e células haploides foram obtidas através da dissecação de tétrades.

3.4 Clonagem de *MSC6* e construção de seu mutante nulo

MSC6 foi clonado através da transformação da linhagem *QRS1*_{D150R} com uma biblioteca genômica plasmidial composta por fragmentos de DNA nuclear de levedura parcialmente digeridos pela enzima de restrição *Sau3A* com cerca de 12000 pb inseridos no vetor YEp13 (BOTSTEIN; DAVIS, 1982), gentilmente cedido pelo professor Alexander Tzagoloff (Columbia University). Foram isolados dois transformantes competentes respiratórios, e após o sequenciamento do plasmídeo recuperado foi revelada a presença de um fragmento do cromossomo genômico XV de aproximadamente 6000 pb contendo os genes *GDS1* e *MSC6*. O segmento de 3010 pb contendo o gene *MSC6* presente entre os sítios *SpeI* e *NsiI* foi subclonado no vetor YEp351, digerido com *XbaI* e *PstI* (HILL et al., 1986). O vetor recombinante YEp351/*MSC6* foi digerido com *SalI* e *BclII* liberando um fragmento de 985 pb, localizado internamente ao gene *MSC6*, e em seu lugar inserido um fragmento de 1100 pares de base contendo o gene *URA3* digerido com as enzimas *SalI* e

BclI. O alelo *MSC6::URA3* foi liberado do vetor recombinante resultante através de digestão dupla com as enzimas *HindIII* e *BamHI* e utilizado para transformar e substituir o alelo *MSC6* selvagem nas linhagens W303-1A e W303-1B (ROTHSTEIN, 1983).

3.5 Construção do duplo mutante *msc6,fmt1*

A linhagem duplo mutante nulo *msc6,fmt1* foi obtida a partir do cruzamento da linhagem mutante *msc6::URA3* (MATa) com a linhagem mutante *fmt1::URA3* (MAT α) presente na coleção de linhagens do laboratório. Após a seleção de diploide, a linhagem foi induzida a esporulação em meio KAc por três dias e a dissecção de tétrades realizada através do uso de um micromanipulador em meio YPD. Após a germinação dos esporos eles foram replicados em meio mínimo seletivo para uracila e meio seletivo para a respiração celular (YPEG). Todos os esporos ura⁺ cujas tétrades apresentaram segregação 2:2 para uracila eram incapazes de crescer em meio YPEG, indicando a deficiência respiratória do duplo mutante *msc6,fmt1*.

3.6 Construção de ORFs fusionadas com epítomos

O alelo *MSC6* contendo 10 resíduos extras na sua porção C-terminal consistindo do "tag" C-Myc tag foi obtido por PCR do vetor YEp351/*MSC6* com os pares de oligonucleotídeos MSC6-1 e MSC6-cMyc (tabela 2). O fragmento de 2554 pares de bases resultante foi digerido com *HindIII* e ligado aos vetores YIp351 e YEp351 também cortados com *HindIII* (HILL et al., 1986). Os plasmídeos resultantes contendo *MSC6*-C-Myc foram renomeados de pMSC6-Myc e pnMSC6-Myc, respectivamente. pMSC6/ST4 foi linearizado internamente ao gene *LEU2* com a enzima *BstXI* e integrado no locus cromossomal de *LEU2* da linhagem W303 Δ *msc6* (ROTHSTEIN, 1983).

3.7 Isolamento de mitocôndrias

As linhagens foram pré-crescidas em 50 mL de YPGal por 24 horas e transferidas para um inóculo de 800 mL de YPGal, o qual cresceu por 18 horas, sob agitação a 30 °C. As células foram digeridas com zimoliase (1 mg/ml), rompidas utilizando-se homogeneizador tipo Potter e agitador Blender. As mitocôndrias foram isoladas por centrifugação diferenciada, sendo lavadas e suspensas em tampão STE, contendo 0,6 M Sorbitol, 10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA (FAYE et al., 1974).

3.8 Ensaio de solubilidade proteica

Para verificar a solubilidade, proteínas mitocondriais, na concentração de 10 mg/mL foram sonicadas por 10 segundos (Processador ultrassônico Vibra Cell – Sonics) e centrifugadas a 29.000 g por 30 minutos. O sobrenadante coletado corresponde as proteínas solúveis da matriz mitocondrial e o precipitado que foi suspenso em volume equivalente de tampão contém proteínas associadas às membranas mitocondriais. Uma alíquota da suspensão do precipitado foi guardada e o restante foi incubado com um volume de carbonato de sódio (0,2 M) por 30 minutos em gelo. Repetiu-se a centrifugação nas mesmas condições descritas acima. Nesse caso o sobrenadante corresponde a proteínas periféricamente associadas às membranas mitocondriais e o precipitado à proteínas intrinsecamente associadas às membranas.

3.9 Localização proteica intramitocondrial

Foram preparadas mitocôndrias que mantiveram a membrana externa intacta. Para isso, durante o processo de extração é utilizado apenas o homogeneizador tipo Potter e as mitocôndrias são lavadas e suspensas em tampão 0,6 M Sorbitol, 20 mM HEPES (GLICK, 1995). Em seguida, 160 µL de mitocôndrias na concentração de 10 mg/mL foram divididos em quatro tubos e receberam tratamentos diferenciados, conforme tabela 3. As amostras foram incubadas em gelo por 60 minutos. Foi adicionado 5,0 µL de PMSF 100 mM. Centrifugou-se 20.000 rpm, por 25 minutos. Separou-se o sobrenadante. O precipitado foi suspenso em 100 µL de 0,6 M Sorbitol; 20 mM Hepes. Adicionaram-se 10 µL de ácido tricloroacético (TCA) 50%. Centrifugou-se por 5 minutos e suspendeu o precipitado em 110 µL de tampão Laemmli. A amostra 1 (Tabela 3) corresponde a mitocôndria intacta, amostra 2 a mitocôndria sujeita a digestão das proteínas da sua membrana externa, amostra 3 a mitoplastos, isto é, mitocôndrias sem a membrana externa e consequentemente sem o espaço intermembranas e amostra 4 a mitoplastos sujeitos a digestão de proteínas de sua membrana.

Tabela 3 - Tratamentos realizados para localização proteica intramitocondrial

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

3.10 Ensaio de crescimento com diluição seriada

As linhagens foram cultivadas em meio rico (YPD) por 16 horas, e a capacidade de crescimento em meio seletivo para respiração (YPEG) foi analisada plaqueando-se 3 µL de suspensão celular de valores de absorbância (600nm) 0,0001; 0,001; 0,01; 0,1; 1, de forma sequencial, em meio YPD e YPEG.

3.11 Análise de peptídeos mitocondriais recém-sintetizados

Poli-peptídeos mitocondriais recém-sintetizados foram marcados *in vivo* com uma mistura de aminoácidos radioativos [³⁵S] metionina/cisteína, em células de leveduras previamente tratadas com cicloheximida (HERRMANN et al., 1994). Inóculos das diferentes linhagens testadas foram cultivados em meio rico YPGal por 16 horas. Em seguida, as células foram centrifugadas e lavadas com meio mínimo contendo galactose como fonte de carbono, e cultivadas sob agitação por mais duas horas nesse mesmo meio. Quantidade equivalente de células foi coletada após medida de absorbância a 600 nm, e incubadas na presença de cicloheximida (20 µg/mL) por dez minutos para a interrupção da síntese proteica citosólica. Na sequência foi adicionada 5 µl de metionina e cisteína radioativamente marcadas na concentração de 11 mCi/mL - EXPRE 35S 35S Protein Labeling Mix (PerkinElmer Health Sciences, Inc). A reação de marcação foi realizada tanto em temperatura ambiente quanto a 37 °C por 15 minutos, e imediatamente após esse período as células foram centrifugadas, suspensas em 75 µl de tampão de lise (5,56 ml de 5 M NaOH; 1,11 ml de β-mercaptoethanol, 6,84 ml de água; 1,5 ml de 0.1 M PMSF) e 500 µl de solução contendo 10 mg/mL de metionina e cisteína não marcadas. A essa mistura foi adicionada 1 volume de 50% TCA. As amostras foram centrifugadas, lavadas com água e suspensas em 45 µL do tampão de 1x Laemmli, para eletroforese em SDS-PAGE (17,5%) Após a eletro-

forese, transferiu-se as proteínas para membrana de nitrocelulose que foi corada com vermelho de Ponceau (2%) e após secar a 60 °C por 1 hora, foi exposta a filme de raios-X por 20 horas.

3.12 Gradiente de Sacarose

Mitocôndrias isoladas da linhagem $\Delta qrs1 \Delta msc6$ /ST1 (6 mg) foram incubadas com um volume de carbonato de sódio (0,2 M) por 30 minutos e depois sonicadas por 10 segundos (Processador ultrassônico Vibra Cell – Sonics), em seguida foram centrifugadas 22.000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante (0,6 mL) foi coletado, adicionando-se a ele 2 mg de hemoglobina e 0,4 mg de lactato desidrogenase proveniente de *Lactobacillus leichmanii* (Sigma), e aplicado em gradiente contínuo de sacarose 7-20% (4,4 mL) contendo 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5 mM EDTA, e 0.05% Triton X-100. O gradiente foi centrifugado a 54.000 rpm por 5 horas a 4 °C em um rotor SW-55Ti Beckman (adaptado de COLBY et al., 1998). Foram coletadas 16 frações que foram analisadas por *Western blot*, utilizando os anticorpos contra os epítomos da hemaglutinina (HA) e de C-Myc, fusionados às proteínas Qrs1p e Msc6p, respectivamente. Além disso, as frações também foram verificadas em relação à presença de hemoglobina (medição da absorbância a 410 nm) e em relação à presença da desidrogenase, pela medição da oxidação de NADH utilizado na conversão de piruvato em lactato (medição da absorbância a 340 nm).

3.13 Isolamento de RNA dos transcritos mitocondriais e Northern Blot

Mitocôndrias foram preparadas a partir de células cultivadas em meio YPGal nas temperaturas de 30° ou 37 °C. A extração do RNA total foi realizada inicialmente com amostras mitocondriais sob a concentração proteica de 5mg/mL (em 0,4 mL de amostra). Foi adicionado um volume igual ao da amostra do tampão composto por 1% SDS, 0,5 mM EDTA e 100 mM NaCl, para solubilizar as mitocôndrias. Em seguida foi adicionado um volume igual do Reagente TrizolTM, a mistura foi centrifugada a 13.200 rpm por 5 min em um microtubo de 2 mL e cerca de 0,7 mL foi coletado do sobrenadante e transferido para um novo tubo. A extração foi seguida pela adição do mesmo volume presente em cada tubo de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) seguida de centrifugação (5min a 13.200 rpm), o sobrenadante foi coletado, transferido para um novo tubo. Em seguida foi realizada a precipitação dos ácidos nucleicos pela adição de 0,05 volume de NaCl 5 M e três volumes de etanol 100%, a mistura foi incubada em gelo seco por 5 minutos para acelerar o processo e

depois centrifugada a 13.200 rpm por 5 min. O precipitado obtido foi lavado 3 vezes com etanol 80% e foi secado em um concentrador (Eppendorf™ Vacufuge™ Concentrator) e a quantificação foi realizada utilizando NanoDrop ND1000 (NanoDrop Technologies). Cerca de 2,5 – 3 µg da amostra de RNA total mitocondrial foi separado em gel de agarose 1 ou 2%, dependendo do tipo de RNA a ser verificado. O gel foi corado com brometo de etídeo, fotografado e os RNAs foram transferidos para uma membrana de nylon (Nytran®—SuPerCharge, TurboBlotter™ GE). Após a transferência foi realizado o cross-link utilizando luz UV, seguida da pré-hibridização da membrana, a 43 °C com 125 µg de DNA de espermatozoide de salmão em 5x SSC, 5x Denhardtts (Ficoll 1% tipo 400, polivinilpirrolidona 1% e albumina do soro bovino 1%) e SDS 0,5%. O RNA presente na membrana foi hibridizado “*overnight*” a 43 °C com sondas específicas para tRNA^Q, tRNA^P, tRNA^S, tRNA^E, COX2 e COB1. Os oligonucleotídeos das sondas de tRNA foram preparados conforme descrito por Schonauer e colaboradores (2008). As sondas foram marcadas na extremidade 3’ com biotina, utilizando um kit de marcação (Thermo Scientific).

3.14 Medição da atividade dos complexos respiratórios III e IV

Complexo III (citocromo c redutase): a atividade foi determinada a partir da de uma reação enzimática composta por tampão fosfato 10 mM pH 7,5, 1% de citocromo c (Sigma Horse Heart), 10 µg de mitocôndria e NADH 0,1 M, que foi adicionado por último e a medição foi realizada logo a seguir. Foi feita a leitura a 550 nm, com intervalos de 15s, acompanhando a velocidade da redução do citocromo c (adaptado de TZAGOLOFF; AKAI; NEEDLEMAN, 1975).

Complexo IV (citocromo c oxidase): a atividade foi determinada a partir da de uma reação enzimática composta por tampão fosfato 20 mM pH 7,5, 1% de citocromo c (Sigma Horse Heart) reduzido com ditionito de sódio e 10 µg de mitocôndria que foi adicionada por último e a medição foi realizada logo a seguir. Foi feita a leitura a 550 nm, com intervalos de 15 segundos, acompanhando a velocidade da diminuição do citocromo c reduzido, ou seja, a sua oxidação (adaptado de TZAGOLOFF; AKAI; NEEDLEMAN, 1975).

A atividade específica dos complexos foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar do citocromo c utilizado (29,5 L.mmol⁻¹.cm⁻¹, forma reduzida). As fórmulas utilizadas para obter a atividade específica estão representadas abaixo. As medições dos complexos de cada linhagem foram realizadas em triplicatas.

$$\frac{U}{v} = \frac{\Delta A}{\Delta t} \cdot \frac{V}{\epsilon \cdot l \cdot v} \quad \text{Atividade específica} = \frac{U/v}{\text{concentração de proteínas}}$$

U → unidade de atividade enzimática ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$)

v → volume de enzima (20 μL de amostra de mitocôndria)

$\Delta A / \Delta t$ → variação da absorbância e um determinado intervalo de tempo

V → volume da reação (1 mL)

l → comprimento do caminho óptico (1 cm)

ϵ → coeficiente de extinção molar (29,5 $\text{L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

concentração de proteínas → 0,5 mg/mL

4 RESULTADOS

4.1 Resíduos G128, D150, e R156 de Qrs1p apresentam indícios de co-evolução e são essenciais para o funcionamento da proteína

A fim de melhor entender a função desse complexo AdT mitocondrial realizou-se um estudo de comunidades de aminoácidos, o qual pode revelar a existências de subclasses funcionais dessa família (BLEICHER; LEMKE; GARRATT, 2011). Ao realizar essa análise na família das transamidases da qual faz parte Qrs1p notamos a existência de um subconjunto de três aminoácidos, G128 (glicina na posição 128 da cadeia polipeptídica que compõe a proteína), D150 (ácido aspártico na posição 150) e R156 (arginina na posição 156), que apresentam fortes indícios de co-evolução, distintos dos outros conjuntos presentes nessa proteína (FERREIRA-JÚNIOR; BLEICHER; BARROS, 2013).

Esses resíduos estão localizados próximos ao sítio catalítico de Qrs1p relacionado com a transaminação de glutamyl-tRNA^Q em glutaminil-tRNA^Q (Figura 3C) e não estão presentes em outras proteínas da família de amidases. Decidimos gerar mutantes com polaridade e carga oposta dos resíduos, de modo que a flexível G128 foi modificada para uma leucina (G128L), o D150 de carga negativa para uma arginina (D150R), e, a R156 de carga positiva para um ácido aspártico (R156D). Cada alelo mutante foi inserido separadamente na linhagem heterozigota diploide $a/\alpha W303\Delta QRS1$, como foi descrito no item 3.3 da seção “Materiais e Métodos”. Os transformantes foram esporulados e suas tétrades dissecadas. A completa ausência de crescimento da linhagem $W303\Delta QRS1$ contendo os alelos mutantes em meio sem fontes de carbono fermentáveis indica que cada alelo afeta a função de Qrs1p (Figura 3A). Curiosamente, esporos contendo o alelo *QRS1* e o alelo *QRS1*_{D150R} apresentaram deficiência respiratória, indicando que a mutação *QRS1*_{D150R} se mostrou dominante sobre o alelo selvagem. Os outros alelos mutantes G128L e R156D não apresentaram o mesmo efeito do alelo D150R (Figura 3A). Para verificar os níveis da proteína em questão foi adicionado o epítipo de hemaglutinina A (HA) em todas as construções dos mutantes, e a visualização foi feita após realizar *Western Blot* de extratos mitocondriais provenientes das novas construções mencionadas (Figura 3D). O alelo selvagem *QRS1* fusionado ao epítipo HA exibiu um padrão de migração abaixo de 45 kDa, que é o mais próximo do esperado (50,9 kDa) da sequência de aminoácidos de Qrs1p. Além disso, duas bandas adicionais foram detectadas: uma com cerca de 31 kDa e outra logo acima de 21 kDa. O produto com 31 kDa é também detectado nos mutantes G128L, D150R e R156D. No mutante R156D também é observado uma banda fraca em uma posição correspondente a presente no alelo selvagem *QRS1*. Provavelmente a banda abaixo de 45 kDa corresponde a versão madura de Qrs1p e as outras bandas visualizadas são produtos de degradação. Entretanto, ao considerar o efeito dominante de D150R sobre o

alelo selvagem de Qrs1p, o produto de 31 kDa deve ser funcional, já que é o único produto detectável nesse mutante. Talvez o produto dominante de D150R seja capaz de aprisionar o substrato de tRNA necessário para a função de Qrs1p.

Figura 3 - Propriedades de *QRS1* e seus mutantes. **A)** Crescimento comparativo de células haplóides com o gene selvagem *QRS1* (QRS1) e seu respectivo mutante nulo (Δ QRS1), em meio rico contendo glicose (YPD) e meio rico contendo glicerol-etanol (YPEG), com ou sem as mutações: G128L (QRS1G128L), D150R (QRS1D150R), e R156D (QRS1R156D); **B)** Crescimento comparativo de células selvagens (QRS1), heterozigotas *QRS1/QRS1*_{D150R} com ou sem o plasmídeo episomal contendo o gene *MSC6* (QRS1/QRS1D150R + MSC6) em YPD e em YPEG. As imagens foram obtidas após 3 dias de incubação das placas mantidas à 30 °C; **C)** Localização dos resíduos modificados em um modelo de Qrs1p. À esquerda, modelo estrutural geral de Qrs1p, e à direita, o centro catalítico detalhado. Estão indicados os resíduos modificados G128L, D150R e R156D (bastões verdes), assim como as tesouras catalíticas Ser-cis-Ser-Lys: S154, S131 e K52 (bastões vermelhos); **D)** Níveis normais de Qrs1p. Mitocôndrias da linhagem selvagem (QRS1) e mutantes *qrs1* (G128L, D150R e R156D) foram isoladas de células crescidas em YPGal, 20 μ g de proteínas mitocondriais foram separadas em um sistema SDS-PAGE, transferidas para uma membrana de nitrocelulose e submetidas aos anticorpos anti-HA (Sigma Aldrich) e anti-porina (Invitrogen™), sendo esse último utilizado como controle de carregamento de proteínas no gel.

Por apresentar um resultado mais interessante, seguimos apenas com a mutação *QRS1*_{D150R}, em busca de compreender a razão pelo seu efeito dominante sobre o alelo selvagem *QRS1*. Células com deficiência respiratória contendo o alelo selvagem *QRS1* e o

alelo mutante dominante *QRS1*_{D150R} foram transformadas com uma biblioteca genômica de levedura. Apenas um transformante capaz de respirar foi isolado. Testes de segregação plasmidial confirmaram que a competência respiratória era dependente do plasmídeo transformante. O sequenciamento da região inserida no plasmídeo em questão revelou a presença de dois genes do cromossomo XV, *GDS1* e *MSC6*. Subclonagens dessa região confirmaram que somente múltiplas cópias de *MSC6* eram capazes de suprimir a mutação *QRS1*_{D150R} (Figura 3B).

MSC6 está descrito no banco de dados de *S. cerevisiae* (www.yeastgenome.org), trata-se de um gene nuclear que codifica uma proteína de função desconhecida com domínios do tipo PPR (Figura 4B), que estão relacionados com o metabolismo de RNA mitocondrial ou como ativadores traductionais (HERBERT et al., 2013), e seu produto gênico se localiza na mitocôndria. Para verificar se esse gene apresenta alguma relação com a atividade respiratória em *S. cerevisiae* foi construído um mutante nulo como descrito no item 3.4 da seção de “Materiais e Métodos”. Ensaio de crescimento realizados com a linhagem mutante nula *msc6* e com a linhagem selvagem W303-1A mostraram que *MSC6*, de fato, possui relação com a atividade respiratória, visto que o mutante nulo *msc6* teve seu crescimento prejudicado na presença de fontes de carbono não fermentáveis (figura 4A), o que não tem relação com uma situação de perda de DNA mitocondrial, já que um cultivo de 18 horas apresenta aproximadamente 80% de estabilidade do seu DNA mitocondrial. Deficiências severas no processo de síntese proteica mitocondrial acarretam em importante perda da estabilidade do DNA mitocondrial (MYERS et al., 1985).

Figura 4 - Propriedades de *MSC6* e seu mutante nulo. A) O crescimento do mutante nulo *msc6* (Δ MSC6) foi comparado com a linhagem selvagem (W303-1A) em meio YPD e meio YPEG; B) Localização de nove domínios do tipo PPR (barras pretas) presentes em Msc6p (LIPINSKI et al., 2011).

4.2 Propriedades traductionais da mitocôndria do mutante *msc6* e das linhagens contendo o alelo dominante *QRS1*_{D150R}

A fim de entender o mecanismo de supressão da mutação *QRS1*_{D150R} pela

superexpressão de *MSC6*, foi realizado um ensaio de síntese proteica mitocondrial *in vivo* (descrito no item 3.11 da seção “Material e Métodos”), para verificar como ocorre a tradução na mitocôndria das linhagens estudadas (Figura 5). O experimento revelou que células contendo o alelo dominante *QRS1*_{D150R} sintetizam uma forma aberrante de Cox2p, uma subunidade da citocromo oxidase (complexo IV da cadeia transportadora de elétrons presente na mitocôndria), que foi notificada anteriormente nos mutantes *gtf1* e *qrs1* (BARROS et al., 2011; FERREIRA-JÚNIOR et al., 2013). A banda aberrante apresenta um padrão de migração diferente das bandas de Cox2p madura e de seu precursor que apresenta a porção N-terminal intacta, e além disso foi proposto em um trabalho anterior do nosso grupo que essa banda aberrante seria Cox2p contendo o aminoácido glutamyl ocupando os códons de glutaminil (BARROS et al., 2011). A presença de uma banda de Cox2p eletroforéticamente alterada pode ser usada como um indício de tradução imprópria.

A presença da banda aberrante de Cox2p nos mutantes *QRS1*_{D150R} indica um mau funcionamento de *Qrs1p*. A linhagem *msc6* não apresentou a banda aberrante, mas apresentou uma redução generalizada da atividade traducional da mitocôndria (Figura 5). A partir do ensaio de tradução mitocondrial *in vivo* também procuramos entender o mecanismo pelo qual a superexpressão de *MSC6* suprime a mutação *QRS1*_{D150R}, e os resultados obtidos revelaram que a presença de uma maior quantidade de *Msc6p* aumentou a tradução de todos os polipeptídeos mitocondriais, inclusive Cox2p, mas não eliminou a banda aberrante (Figura 5). A supressão do alelo dominante *QRS1*_{D150R} pela superexpressão de *MSC6* pode estar relacionada a esse aumento da forma normal de Cox2p em relação ao da sua forma aberrante.

Figura 5 - Ensaio de síntese proteica mitocondrial. A linhagem selvagem W303-1A (W303), o mutante nulo *msc6* (*msc6*) contendo ou não o alelo dominante *QRS1_{D150R}* (*msc6* e *msc6/QRS1_{D150R}*), e a linhagem selvagem contendo o alelo *QRS1_{D150R}* superexpressando *MSC6* (*QRS1_{D150R}+MSC6*), foram incubadas a 30 °C e a incorporação de metionina [³⁵S] e cisteína [³⁵S] nos produtos traducionais foi realizada *in vivo* a 25 °C, como descrito no item 3.11 da seção “Materiais e Métodos”. A imagem à direita trata-se de uma exposição prolongada da região contendo as três bandas observadas de Cox2p. A mais abaixo é a forma não processada de Cox2p (pre-Cox2), a do meio é a forma madura e processada de Cox2p (mat-Cox2), e a mais acima é a forma aberrante de Cox2p (*-Cox2) presente nos mutantes AdT (BARROS et al., 2011).

4.3 Localização intramitocondrial de Msc6p

A localização de uma proteína também é uma informação necessária para a compreensão de seu funcionamento. Apesar de ser conhecido que Msc6p se localiza na mitocôndria, não havia informação de sua localização exata, ou seja, o compartimento da organela em que se encontra. Para descobrir sua localização intramitocondrial foi construída uma linhagem mutante nula *msc6* expressando o gene *MSC6* fusionado ao epítipo C-Myc inserido em vetores de expressão integrativo ou episomal, como é descrito no item 3.4 da seção “Materiais e Métodos”. Na figura 6A é possível observar que o anticorpo específico para o epítipo C-Myc é capaz de se ligar inespecificamente com uma proteína presente na linhagem selvagem, que também é visualizada nas linhagens expressando a proteína Msc6p fusionada ao epítipo C-Myc.

Foi realizado um ensaio de solubilidade das proteínas mitocondriais (descrito no item 3.8 da seção “Materiais e Métodos”) da linhagem expressando Msc6p-Myc, onde mitocôndrias na concentração de 10 mg/mL tiveram suas membranas rompidas após serem submetidas a uma etapa de sonicação, em seguida foi realizada uma centrifugação para separar as proteínas solúveis presentes no sobrenadante (S) e aquelas presentes no precipi-

tado, por estarem associadas às membranas (SMP). Uma alíquota do precipitado é reservada para verificação em gel e o restante foi tratado com carbonato de sódio, que tem a função de liberar proteínas que estão levemente associadas às membranas mitocondriais. Repetiu-se a centrifugação para separar as proteínas que foram desassociadas da membrana (CS) das proteínas que estão intrinsecamente associadas a ela (CP) (Figura 6B). Neste ensaio, tanto Msc6p como a proteína de matriz mitocondrial, a α -cetoglutarato desidrogenase (Kgd2) (REPETTO; TZAGOLOFF, 1990), se concentram principalmente na fração solúvel (S) (Figura 6B).

Para confirmar o resultado obtido com o experimento anterior foi feito o ensaio de localização intramitocondrial, como descrito no item 3.8 da seção “Materiais e Métodos”. Neste ensaio, mitocôndrias (Mt) e mitoplastos (Mp) da linhagem expressando Msc6p-Myc foram submetidas a condições de presença ou ausência de Proteinase K (ProtK). Os anticorpos específicos contra os marcadores de cada compartimento mitocondrial (Sco1p, Kgd2p e citocromo b2) foram doados pelo Dr. Alexandre Tzagoloff (Columbia University). Sco1p é uma proteína de membrana interna voltada para o espaço intermembranas (NITTIS et al., 2001; SCHULZE; RÖDEL, 1988), o citocromo b2 (Cyt B2), localizado no espaço intermembranas (DAUM et al., 1982) e α -cetoglutarato desidrogenase (Kgd2), uma proteína de matriz, participante do ciclo de Krebs. A conversão da mitocôndria para mitoplasto provocada pelo choque hipotônico é evidente ao observar a perda substancial da proteína localizada no espaço intermembranas (Cyt B2). Já Kgd2 permanece intacta na presença da proteinase K na mitocôndria e no mitoplasto, confirmando a presença da membrana interna nos mitoplastos. Tem-se ainda a referência da Sco1p, uma proteína de membrana interna voltada para o espaço intermembranas, que apresenta uma degradação pelo tratamento com proteinase K somente nos mitoplastos. Comparando os resultados obtidos de Msc6p fusionado ao epítipo C-Myc com as proteínas referência, está clara a localização de Msc6p na matriz mitocondrial. Suas propriedades são semelhantes às da proteína de matriz Kgd2p.

Figura 6 - Msc6p é uma proteína da matriz mitocondrial. Todas as amostras foram aplicadas em gel SDS-PAGE 12% e transferidas para membrana de nitrocelulose. A imunodeteção foi feita com anticorpo policlonal contra o epítipo C-Myc, fusionado à ORF em questão, na concentração 1:1000 e anticorpo secundário anti-rabbit IgG conjugado com peroxidase 1:2000 (Sigma). As proteínas foram visualizadas com o substrato quimioluminescente SuperSignal (Pierce). **A)** Extratos mitocondriais (Mit) e citosólicos (PMS) da linhagem selvagem (wt), da mutante nula *msc6* expressando uma ou múltiplas cópias de *MSC6-MYC* (MSC6-MYC e nMSC6-MYC, respectivamente); **B)** Ensaio de solubilidade Msc6p-CMyc e detecção na fração solúvel após sonicação (S), o precipitado (SMP) foi ainda tratado com carbonato e após centrifugação duas novas frações foram geradas: solúvel ao carbonato (CS) e insolúvel (CP); **C)** Ensaio de acessibilidade de Msc6p-CMyc a proteinase K das frações mitocondriais (mt) e mitoplasto (mp). Foram utilizados como controle de acessibilidade Sco1, Kgd2 e citocromo b2 (Cyt B2); À esquerda, a representação da localização das proteínas controle na mitocôndria, a proteína de matriz Kgd2p (círculo rosa), a de membrana interna Sco1p (círculo azul) e a de espaço intermembranas CytB2p (círculo verde).

4.4 Msc6p não interage com Qrs1p

O fato da expressão de múltiplas cópias de *MSC6* ser capaz de suprimir o efeito dominante da mutação *QRS1*^{D150R} levanta dúvidas a respeito da existência de interação entre Msc6p e Qrs1p. A verificação da interação entre as duas proteínas foi realizada a partir de uma linhagem modificada, capaz de expressar tanto Msc6p-Myc e Qrs1p-HA, inseridos no genoma nuclear por plasmídeos integrativos. Em seguida, o extrato mitocondrial dessa linhagem foi submetido a um gradiente contínuo de sacarose, descrito em maiores detalhes no item 3.12 da seção “Materiais e Métodos” para verificar o padrão de sedimentação das proteínas em questão (Figura 7A).

O resultado obtido indica que Msc6p-Myc e Qrs1p-HA não fazem parte de um complexo em comum, pois os picos de sedimentação de cada uma não se encontram na mesma fração. Qrs1p-HA está concentrada entre as frações 8-11, enquanto a forma madura de Msc6p-Myc foi distribuída pelas frações 4-9. É possível observar uma forma não processada de Msc6p-Myc entre as frações 10 e 13 e outros possíveis produtos de degradação de Msc6p-Myc apresentam um padrão de sedimentação similar ao da forma madura (Figura 7A). Apesar de uma parte de Msc6p-Myc aparentar co-sedimentar com

Qrs1p-HA, foi realizado esse mesmo experimento com o extrato mitocondrial da linhagem nula *qrs1* expressando Msc6p-Myc, e verificou-se que nenhuma das formas de Msc6p-Myc (madura, não processada, ou produto de degradação) apresentou uma variação significativa em relação ao padrão de sedimentação (Figura 7B). Qualquer variação do padrão de sedimentação de Msc6p-Myc no mutante *qrs1* também pode ser justificado pela baixa manutenção do DNA mitocondrial que essa linhagem apresenta.

Além disso, observa-se que o perfil de sedimentação obtido nesse experimento das duas proteínas foram diferentes do esperado em comparação ao tamanho predito das proteínas Msc6p (~80 kDa) e Qrs1p (~51 kDa) (www.yeastgenome.org). Tendo os controles como referência (hemoglobina – 67 kDa e lactato desidrogenase – 130 kDa), nota-se que ambas as proteínas estão dispostas em frações de proteínas com elevada massa molecular. Isso indica que Msc6p-Myc pode fazer parte de um complexo proteico. Já em relação a Qrs1p-HA, o resultado obtido vai de acordo com estudos anteriores (ARAISO et al., 2014), em que revelam que Qrs1p faz parte do complexo GatFAB.

Figura 7 - Sedimentação de Msc6p e Qrs1p em gradiente de sacarose. A) O extrato mitocondrial da linhagem duplo mutante nula *msc6,qrs1*, contendo os alelos *MSC6-MYC* e *QRS1-HA*, foi submetido a um tratamento com carbonato de cálcio e sedimentado em um gradiente de sacarose juntamente com os marcadores de massa molecular (hemoglobina e lactato desidrogenase), conforme descrito no item 3.12 da seção “Materiais e Métodos”. Cada fração do gradiente foi testada para verificar a presença da hemoglobina ao medir a absorção de cada uma no comprimento de onda de 410 nm e também para verificar a presença da lactato desidrogenase através da medição do NADH utilizado para conversão de piruvato em lactato. As frações com as medições mais elevadas de hemoglobina (HE) e maior atividade da lactato desidrogenase (LDH) estão indicadas. As frações foram coletadas da porção mais concentrada do gradiente (1) até a porção menos concentrada (16) e separadas em um sistema SDS-PAGE 12%, seguidas de uma transferência para uma membrana de nitrocelulose. Primeiramente, a membrana foi testada para o anticorpo anti-Myc e em seguida testada com o anticorpo anti-HA de modo a distinguir os produtos derivados de Msc6p-Myc dos produtos de Qrs1p-HA. O tamanho esperado das formas maduras de Msc6p-Myc e Qrs1p-HA estão indicados à esquerda; **B)** Propriedades de sedimentação de Msc6p-Myc no mutante nulo *qrs1*. Os procedimentos e análises realizadas foram as mesmas descritas acima, exceto a membrana de nitrocelulose que só foi testada para o anticorpo anti-Myc. O tamanho esperado da forma madura de Msc6p-Myc está indicado à esquerda.

4.5 Análise de Northern Blot de transcritos mitocondriais

Os domínios PPR presentes em Msc6p sugerem que essa proteína tenha uma

função relacionada ao metabolismo de RNA mitocondrial. Para verificar a possível participação de Msc6p no processamento de transcritos de RNA foram utilizadas as sondas mitocondriais para os transcritos da citocromo oxidase 2 (*COX2*), do citocromo B1 (*COB1*), e os transcritos que irão gerar os RNAs de transferência da glutamina e o da prolina (tRNA^Q, e tRNA^P, respectivamente) em ensaios de Northern Blot, descrito no item 3.13 da seção “Materiais e Métodos”. O processamento de RNA depende de produtos gênicos provenientes tanto do núcleo como da mitocôndria. Por exemplo, tRNA^P é transcrito simultaneamente com RPM1r, que junto com a proteína Rpm2, codificada no núcleo, formam a RNase-P (UNDERBRINK-LYON et al., 1983). A função de RNase-P depende de uma via ativa biossintética de ácido graxo tipo II, e quando a atividade de RNase-P é ineficiente ocorre a acumulação de precursores mitocondriais não processados na região 5', em particular o precursor contendo os transcritos primários RPM1-tRNA^P (SCHONAUER et al., 2008).

Nenhuma diferença foi encontrada tanto na quantidade como na migração dos diferentes transcritos entre a linhagem mutante *msc6* e a linhagem selvagem (Figura 8). Embora estes sejam apenas parte dos transcritos mitocondriais, juntando com os resultados de tradução *in vivo*, tende-se a excluir a hipótese de envolvimento de Msc6p tanto na transcrição mitocondrial como no processamento de RNA.

Figura 8 - Análise dos transcritos mitocondriais no mutante nulo *msc6*. Foi realizado o ensaio de Northern blot do RNA extraído de células da linhagem selvagem (wt) e do mutante nulo *msc6* (*msc6*). Os tRNAs mitocondriais foram separados em um gel 2% de agarose e os mRNAs, em um gel 1% de agarose, transferidos para uma membrana de nylon e os transcritos foram detectados com sondas de DNA contendo as extremidades 3' biotinadas como foi descrito no item 3.13 da seção “Materiais e Métodos”.

4.6 Interação Genética de *MSC6* com *FMT1*

Como não foram encontradas evidências de que Msc6p participa de transcrição de

RNAs mitocondriais ou no seu processamento, buscou-se uma relação de Msc6p com o processo de tradução mitocondrial, já que os domínios PPR presentes na proteína também podem exercer alguma função relacionada ao processo traducional (HERBERT; GOLIK; BONNEFOY, 2013). Após consultar o banco de dados de *S. cerevisiae* (Projeto SGD [<http://www.yeastgenome.org/locus/S000005881/interaction>]), foi verificado que um mapa de interação genética foi construído, com o intuito de buscar interações genéticas sintéticas entre pares genes de *S. cerevisiae* (COSTANZO et al., 2010). Esse estudo gerou perfis de interação genética para aproximadamente 75% de todos os genes dessa espécie de levedura, e dentre os resultados obtidos o gene *MSC6* apresentou interação com mais de 50 genes. Entre esses genes, destacou-se a interação com *FMT1*, gene que codifica a formil transferase metionil-tRNA (MTF).

A enzima MTF catalisa a reação da transferência do grupo formil para a metionina ligada ao tRNA^{fm} presente na mitocôndria, etapa fundamental para a iniciação da tradução no grupo das eubactérias (MARCKER, 1965) e também nas mitocôndrias e nos cloroplastos (EPLER; SHUGART; BARNETT, 1970; GALPER; DARNELL, 1969; SCHWARTZ et al., 1967; SMITH; MARCKER, 1968).

Para avaliar a interação entre os genes *MSC6* e *FMT1*, foi construída uma linhagem duplo mutante nula a partir do cruzamento entre as linhagens *msc6::URA3* (MAT α) com a linhagem *fmt1::URA3* (MAT α), conforme foi descrito no item 3.5 da seção “Materiais e Métodos”. A combinação da disrupção dos dois genes provocou uma deficiência respiratória na linhagem obtida, fazendo com que ela não fosse capaz de crescer em meio contendo fonte de carbono não fermentável (YPEG) (Figura 9), diferentemente do mutante *msc6* que apresenta uma dificuldade em crescer nesse meio (já notificado no item 4.2 desta seção), e do mutante *fmt1* que é capaz de crescer normalmente nesse meio. Curiosamente, um trabalho anterior que verificou que a ausência de FMT1 provoca a superexpressão do fator de iniciação de tradução mitocondrial IF2- mit, que de alguma forma é capaz de compensar a ausência da enzima MTF (LI et al., 2000). Esse resultado obtido com o duplo mutante *msc6;fmt1* aliado com o menor nível de tradução mitocondrial presente no mutante *msc6* indica que Msc6p pode exercer alguma função na iniciação do processo de tradução mitocondrial.

Figura 9 - Propriedades do duplo mutante *msc6;fmt1*. Crescimento comparativo entre células selvagens (WT), células contendo disrupção individual dos genes *MSC6* e *FMT1* (*msc6* e *fmt1*, respectivamente), e células contendo a disrupção dos dois genes (*msc6;fmt1*) em meio YPD e meio YPEG. As imagens foram obtidas após 24 horas de incubação das placas mantidas à 30 °C. Uma característica foi verificada na linhagem duplo mutante *msc6;fmt1*, suas colônias apresentaram uma coloração avermelhada (na figura é possível verificar pela tonalidade mais escura que as colônias crescidas em meio YPD apresentam em relação as demais linhagens), esse fenótipo está relacionado por um maior acúmulo de um intermediário da biossíntese de adenina (modificação realizada na linhagem parental que gera a auxotrofia para a adenina) que dá essa coloração a colônia. Essa característica não afeta de nenhuma forma seu crescimento em nenhum dos meios testados.

4.7 Caracterização Bioquímica dos Mutantes *msc6*

Após verificar que a interação entre a disrupção dos genes *MSC6* e *FMT1* resultava em uma deficiência respiratória na linhagem gerada foi decidido realizar mais experimentos com essa linhagem, com o intuito de elucidar a causa do fenótipo obtido. Para isso, verificamos o funcionamento da mitocôndria a partir da medição da atividade de dois complexos presentes na membrana interna mitocondrial que fazem parte da cadeia respiratória, o complexo III e o complexo IV. O complexo III, ou citocromo c redutase, realiza a transferência dos elétrons, provenientes dos complexos 1 e 2, para o citocromo c, que os transporta até o complexo IV, ou citocromo c oxidase, onde serão transferidos para o O₂, o aceptor final dos elétrons no processo da oxidação fosforilativa.

As atividades dos complexos (expressos em mmol.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína) da linhagem selvagem e das linhagens mutantes *msc6*, *fmt1* e também o duplo mutante *msc6;fmt1* foram medidas, conforme o protocolo detalhado no item 3.14 da seção “Materiais e Métodos”, e comparadas estatisticamente no software GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., Califórnia), usando Análise de Variância (ANOVA) seguido do teste comparativo de Tukey, que comparou os resultados entre si para verificar se a diferença era significativa (Figura 10). Em relação ao complexo III, verificou-se que todas as linhagens mutantes apresentaram uma redução da atividade quando comparadas com a linhagem selvagem,

sendo a linhagem *msc6* tendo a menor das atividades (Figura 10A). Em relação ao complexo IV, verificou-se que a linhagem mutante *msc6* não apresenta uma redução muito significativa de sua atividade quando comparada com a linhagem selvagem, já a linhagem *fmt1* apresenta uma redução expressiva do funcionamento desse complexo, e a combinação da disrupção dos dois genes apresentou uma redução ainda maior da atividade desse complexo (Figura 10B).

Os resultados obtidos com esse experimento podem explicar o motivo da deficiência respiratória apresentada pelo mutante *msc6*, tendo em vista a grande redução da atividade do complexo III. Essa deficiência do mutante *msc6* combinada com a redução da atividade do complexo IV presente no mutante *fmt1* pode comprometer o funcionamento da cadeia de fosforilação oxidativa, o que pode ser o motivo da ausência de crescimento do duplo mutante em meio contendo fontes de carbono não fermentáveis.

A

Atividade do Complexo III

Comparação - Teste Tukey	P value
WT vs <i>msc6</i>	P < 0.001
WT vs <i>fmt1</i>	P < 0.05
WT vs <i>msc6;fmt1</i>	P < 0.01
<i>msc6</i> vs <i>fmt1</i>	P < 0.05
<i>msc6</i> vs <i>msc6;fmt1</i>	P > 0.05
<i>fmt1</i> vs <i>msc6;fmt1</i>	P > 0.05

B

Atividade do Complexo IV

Comparação - Teste Tukey	P value
WT vs <i>msc6</i>	P > 0.05
WT vs <i>fmt1</i>	P < 0.01
WT vs <i>msc6;fmt1</i>	P < 0.001
<i>msc6</i> vs <i>fmt1</i>	P < 0.05
<i>msc6</i> vs <i>msc6;fmt1</i>	P < 0.01
<i>fmt1</i> vs <i>msc6;fmt1</i>	P > 0.05

Figura 10 - Atividade enzimática dos complexos da cadeia de fosforilação oxidativa mitocondrial. As atividades dos complexos III e IV foram medidas, conforme o protocolo detalhado no item 3.14 da seção “Materiais e Métodos”, e comparadas estatisticamente no software GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., Califórnia), usando Análise de Variância (ANOVA) seguido do teste comparativo de Tukey, que comparou os resultados entre si para verificar se a diferença era significativa. Os resultados das atividades medidas estão apresentados sob a forma de gráficos e a comparação entre as linhagens encontra-se em uma tabela abaixo de cada gráfico. **A)** Medição da atividade enzimática do complexo III da linhagens selvagem (WT), e das linhagens mutantes *msc6*, *fmt1* e do duplo mutante *msc6;fmt1*; **B)** Medição da atividade enzimática do complexo IV da linhagens selvagem (WT), e das linhagens mutantes *msc6*, *fmt1* e do duplo mutante *msc6;fmt1*.

5 DISCUSSÃO

O subconjunto de resíduos de aminoácidos da proteína Qrs1p (G128, D150 e R156), localizados próximos ao sítio catalítico relacionado com a transaminação de glutamyl-tRNA^Q em glutaminil-tRNA^Q descoberto pela análise realizada no trabalho de Ferreira-Júnior e colaboradores (2013), mostrou-se essencial para o funcionamento da mesma, visto que, linhagens mutantes de *S. cerevisiae* expressando Qrs1p com alteração de apenas um desses aminoácidos (G128L, D150R ou R156D) perderam a capacidade de respirar. Dentre os alelos mutantes gerados, *QRS1*_{D150R} apresentou o resultado mais interessante por se mostrar um alelo dominante negativo, o qual foi descrito em helicases de RNA tais como a DbpA em *Escherichia coli*, Spb4p em levedura e a DDX28 em humanos (GARCIA-GOMEZ et al., 2011; SHARPE ELLES et al., 2009; TU; BARRIENTOS, 2015).

A superexpressão de *MSC6* suprime a deficiência respiratória do mutante *QRS1*_{D150R}, causada pela ausência da proteína Qrs1p funcional, mas não alterou a tradução da banda aberrante de Cox2p presente nesse mutante. Msc6p está presente na matriz mitocondrial, apresenta domínios do tipo PPR em um amplo complexo proteico, e de alguma forma, cópias extras de Msc6p exercem um efeito positivo no mutante *QRS1*_{D150R}. Entretanto, a superexpressão de *MSC6* não suprime o mutante nulo *qrs1* e outros mutantes relacionados (MODA; FERREIRA-JÚNIOR; BARROS, 2016). Esses resultados sugerem que a supressão pelo número extra de cópias de Msc6p não está relacionada com a correção dos ácidos glutâmicos mal incorporados aos códons de glutamina. Um mecanismo mais provável para explicar esse fenômeno é o de considerar que a superexpressão de Msc6p promove o aumento da tradução dos produtos mitocondriais, o suficiente para compensar a inatividade das proteínas contendo ácidos glutâmicos erroneamente incorporados.

Em um estudo anterior realizado por nosso grupo de pesquisa foram apresentadas evidências que a banda aberrante de Cox2p, observada nos mutantes apresentando *QRS1*_{D150R}, trata-se do precursor de Cox2p apresentando o grupo glutamyl nos locais em que deveriam conter o grupo glutaminil (BARROS et al., 2011). Na realidade, o domínio N-terminal da proteína mutante não foi processado após ter sido transferido para o espaço intermembranas da mitocôndria. O processamento é feito a partir da ação conjunta da chaperona Cox20p (HELL et al., 2000), e da peptidase Imp1p/Imp2p (NUNNARI; FOX;

WALTER, 1993). Nos mutantes deste trabalho foram verificadas três bandas relacionadas a Cox2p, a mais superior é a banda aberrante, a do meio pode representar a fração proteica do mutante que foi transportada até o espaço intermembranas e sua porção N-terminal corretamente processada, a mais inferior pode ser uma fração da proteína que foi transferida, mas não foi processada corretamente.

O resultado negativo obtido ao tentar detectar um complexo proteico estável entre Msc6p e Qrs1p foi consistente com estudos recentes relacionados com a composição de grânulos de RNAs mitocondriais (ANTONICKA; SHOUBRIDGE, 2015; TU; BARRIENTOS, 2015) citados por diferentes termos como interactoma, Miorex (KEHREIN et al., 2015; KEHREIN; VARGAS MÖLLER-HERGT; OTT, 2015) e mitocondriólus (BARRIENTOS, 2015). Dois complexos Miorex distintos, associados com ribossomos mitocondriais foram reportados por conterem muitos, se não todos os fatores envolvidos com o mRNA: processamento (Mss116p, Nam1) (MARKOV et al., 2014; RODEHEFFER et al., 2001), estabilidade (Cbp1p, Aep3p) (ELLIS et al., 2004; ISLAS-OSUNA et al., 2003) e “turnover” (Dss1p, Suv3p) (DAOUD; FORGET; LANG, 2012). Esses grânulos também apresentam fatores de tradução específicos para mRNA (e.g. Pet309p, Pet11p, Atp22p) (NAITHANI et al., 2003; ZENG; NEUPERT; TZAGOLOFF, 2007), mas nenhum dos componentes comuns da maquinaria de tradução mitocondrial, tais como transferases de aminoacil-tRNA, fatores de iniciação e elongação. Msc6p foi encontrado como um constituinte dos grânulos de RNA (KEHREIN et al., 2015), e Qrs1p não, o que foi uma surpresa, sabendo da sua participação no complexo trimérico que catalisa a reação de transamidação de glutamil-tRNA^Q a glutaminil-tRNA^Q.

O mecanismo molecular que ocorre a partir do aumento da atividade traducional induzido pro Msc6p não está esclarecido. A presença dos domínios PPR sugere que a função dessa proteína está relacionada de algum modo com o metabolismo de RNAs mitocondriais, já que muitas das proteínas PPR atuam em diferentes etapas do metabolismo do RNA mitocondrial como estabilizadores e ativadores traducionais (HERBERT; GOLIK; BONNEFOY, 2013). Acredita-se que existam pelo menos 15 proteínas com domínios PPR em *S. cerevisiae* (LIPINSKI et al., 2011). Uma das características das proteínas PPR é a sua rápida divergência evolutiva, Msc6p por exemplo, está restrita aos gêneros *Saccharomyces* e *Kluveromyces* (LIPINSKI et al., 2011), também encontrados em vários fatores de RNA. Mas foi verificado que cópias extras de Msc6p não aparentam estabilizar os mRNAs ou tRNAs mitocondriais. Dessa forma, um papel no

processamento ou de estabilidade de RNA é improvável, tendo em vista que mutações em fatores, como *NAMI* e *RMD9*, que participam da manutenção do RNA mitocondrial resultam em redução dos níveis normais dos seus RNAs alvo (RODEHEFFER et al., 2001; NOUET et al., 2007). Msc6p pode possuir uma função redundante no metabolismo de RNA mitocondrial. A pequena, mas mensurável, deficiência de crescimento em meio contendo fontes de carbono não fermentáveis e a pequena redução da tradução mitocondrial nos mutantes nulos *msc6*, sugerem que Msc6p pode exercer um efeito positivo na tradução mitocondrial.

A deficiência respiratória provocada pela combinação da disrupção de *MSC6* e de *FMT1* fortalece ainda mais a hipótese da participação de Msc6p na tradução mitocondrial, visto que *FMT1* codifica a enzima MTF, relacionada com a iniciação da tradução dependentes do iniciador M-tRNA^{fM}. Apesar da importância dessa enzima, foi verificado que, em *S. cerevisiae*, a síntese proteica mitocondrial pode ser iniciada sem a formilação do iniciador M-tRNA^{fM}, já que células apresentando a disrupção do gene *FMT1* não apresentavam formilação *in vivo*, mas mesmo assim eram capazes de crescer em meio contendo fonte de carbono não fermentável (LI et al., 2000). A disrupção do gene *FMT1* provoca a superexpressão de um fator de iniciação mitocondrial (IF2-mit), que de alguma forma, é capaz de interagir com o iniciador Met-tRNA^{fM} não formilado, e possibilitando o início da tradução (TIBBETTS et al., 2003). Entretanto, mesmo não sendo essencial, verificou-se nesse trabalho que o mutante nulo *fmt1* apresenta uma redução significativa da atividade do complexo IV da cadeia de respiratória mitocondrial, que combinada com a deficiência do complexo III, verificada no mutante nulo *msc6*, pode ter resultado no comprometimento do funcionamento da cadeia respiratória. Isto indica que apesar de não apresentarem um papel chave, esses genes possuem importância no processo de tradução mitocondrial. Curiosamente, o mutante *msc6* apresentou relevante redução na atividade do complexo III mitocondrial o que também pode sugerir uma ação mais específica do seu produto gênico na tradução do gene *COB1*. De fato na análise de produtos mitocondriais recém-sintetizados (Fig. 3) já aponta um menor acúmulo de Cob1p, esse resultado deve ser confirmado em novas análises utilizando diferentes tempos de incorporação dos precursores radioativos.

6 CONCLUSÃO

A partir do estudo da coevolução dos aminoácidos da família da subunidade A (Qrs1p) do complexo enzimático GaFAB de levedura responsável pela reação de transaminação necessária para a formação de tRNA foi produzido um mutante de ponto (*QRS1*_{D150R}) capaz de exercer uma dominância negativa sobre o alelo selvagem *QRS1*, de tal forma que a linhagem perdeu a capacidade de realizar a respiração celular. Utilizando uma biblioteca multicópias do genoma de *S. cerevisiae* foi descoberta que a superexpressão de Msc6p é capaz de suprimir a deficiência respiratória promovida pela mutação em Qrs1p (*QRS1*_{D150R}), de modo a promover o aumento da tradução de Cox2p, proteína que faz parte do complexo IV da cadeia respiratória e que é afetada pela mutação, como foi verificado nos ensaios realizado neste trabalho.

Msc6p é uma proteína localizada na matriz mitocondrial em *S. cerevisiae*, contendo domínios PPR em sua sequência, o que fortifica ainda mais a hipótese da atuação de Msc6p na tradução mitocondrial, tendo em vista que a mesma não atua no processamento de RNAs, e a ausência de seu gene promove uma redução generalizada da tradução mitocondrial, e também provoca a redução da atividade do complexo III da cadeia respiratória. Essa supressão é feita por algum mecanismo ainda não compreendido, mas que não se dá por meio de interação física com Qrs1p. Foi verificado ainda, que Msc6p faz parte de um amplo complexo, denominado grânulos de RNA mitocondrial, que estão intimamente envolvidos com o processamento e a tradução de mRNAs.

Este trabalho tinha como objetivo descobrir como Msc6p participava do processo de tradução mitocondrial, a partir do ponto em que verificamos que essa proteína é capaz de suprimir a deficiência de uma proteína essencial para esse processo, a Qrs1p. Apesar de não descobrir o funcionamento exato da proteína, foi possível obter diversas informações que serão fundamentais para a realização desse objetivo. Além disso, conseguimos utilizar os resultados desse trabalho para efetuar a publicação de um artigo no periódico *Current Genetics*, intitulado “Partial suppression of the respiratory defect of *qrs1/qrs1* glutamyl-tRNA amidotransferase mutants by overexpression of the mitochondrial pentatricopeptide Msc6p” (Apêndice A).

REFERÊNCIAS*

- ANDERSSON, S. G. E.; KARLBERG, O.; CANBÄCK, B.; KURLAND, C. G. On the origin of mitochondria: a genomics perspective. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 358, n. 1429, p. 165–177; discussion 177–179, 2003.
- ANTONICKA, H.; SHOUBRIDGE, E. A. Mitochondrial RNA Granules Are Centers for Posttranscriptional RNA Processing and Ribosome Biogenesis. **Cell Reports**, v. 10, n. 6, p. 920–932, 2015.
- ARAIISO, Y.; HUOT, J. L.; SEKIGUCHI, T.; FRECHIN, M.; FISCHER, F.; ENKLER, L.; SENGHER, B.; ISHITANI, R.; BECKER, H. D.; NUREKI, O. Crystal structure of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial GatFAB reveals a novel subunit assembly in tRNA-dependent amidotransferases. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 9, p. 6052–6063, 2014.
- AUSUBEL, F. M. Yeast. In: **Current Protocols in Molecular Biology**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2008. p. 23.
- BARRIENTOS, A. Yeast models of human mitochondrial diseases. **IUBMB life**, v. 55, n. 2, p. 83–95, 2003.
- BARRIENTOS, A. Mitochondriolus: assembling mitoribosomes. **Oncotarget**, v. 6, n. 19, p. 16800–16801, 2015.
- BARROS, M. H.; DA CUNHA, F. M.; OLIVEIRA, G. a.; TAHARA, E. B.; KOWALTOWSKI, A. J. Yeast as a model to study mitochondrial mechanisms in ageing. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 131, n. 7-8, p. 494–502, 2010.
- BARROS, M. H.; RAK, M.; PAULELA, J. a.; TZAGOLOFF, A. Characterization of Gtf1p, the connector subunit of yeast mitochondrial tRNA-dependent amidotransferase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p. 32937–32947, 2011.
- BIMBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 7, n. 6, p. 1513–1523, 1979.
- 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. 1–11, 2011.
- 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.
- BONNEFOND, L.; FENDER, A.; RUDINGER-THIRION, J.; GIEG, R.; FLORENTZ, C.; SIESSLER, M.; GIEGE, R. Toward the Full Set of Human Mitochondrial Aminoacyl-tRNA

* De acordo com:

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

Synthetases : Characterization of AspRS and TyrRS Toward the Full Set of Human Mitochondrial Aminoacyl-tRNA Synthetases : Characterization of AspRS and TyrRS †. **Methods**, p. 4805–4816, 2005.

BOTSTEIN, D.; DAVIS, R. W. Principles and practice of recombinant DNA research with yeast. **Cold Spring Harbor Monograph Archive**, v. 11, p. 607–636, 1982.

BOURSOT, P.; YONEKAWA, H.; BONHOMME, F. Heteroplasmy in mice with deletion of a large coding region of mitochondrial DNA. **Molecular biology and evolution**, v. 4, n. 1, p. 46–55, 1987.

CHINNERY, P. F.; ELLIOTT, H. R.; HUDSON, G.; SAMUELS, D. C.; RELTON, C. L. Epigenetics, epidemiology and mitochondrial DNA diseases. **International journal of epidemiology**, p. dyr232, 2012.

COLBY, G.; WU, M.; TZAGOLOFF, A. MTO1 codes for a mitochondrial protein required for respiration in paromomycin-resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 27945–27952, 1998.

COSTANZO, M.; BARYSHNIKOVA, A.; BELLAY, J.; KIM, Y.; SPEAR, E. D.; SEVIER, C. S.; DING, H.; KOH, J. L. Y.; TOUFIGHI, K.; MOSTAFAVI, S.; PRINZ, J.; ST ONGE, R. P.; VANDERSLUIS, B.; MAKHNEVYCH, T.; VIZEACOMAR, F. J.; ALIZADEH, S.; BAHR, S.; BROST, R. L.; CHEN, Y.; COKOL, M.; DESHPANDE, R.; LI, Z.; LIN, Z.-Y.; LIANG, W.; MARBACK, M.; PAW, J.; SAN LUIS, B.-J.; SHUTERI, E.; TONG, A. H. Y.; VAN DYK, N.; WALLACE, I. M.; WHITNEY, J. a; WEIRAUCH, M. T.; ZHONG, G.; ZHU, H.; HOURLY, W. a; BRUDNO, M.; RAGIBIZADEH, S.; PAPP, B.; PÁL, C.; ROTH, F. P.; GIAEVER, G.; NISLOW, C.; TROYANSKAYA, O. G.; BUSSEY, H.; BADER, G. D.; GINGRAS, A.-C.; MORRIS, Q. D.; KIM, P. M.; KAISER, C. a; MYERS, C. L.; ANDREWS, B. J.; BOONE, C. The genetic landscape of a cell. **Science (New York, N.Y.)**, v. 327, n. 5964, p. 425–431, 2010.

DAOUD, R.; FORGET, L.; LANG, B. F. Yeast mitochondrial RNase P, RNase Z and the RNA degradosome are part of a stable supercomplex. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 4, p. 1728–1736, 2012.

DAUM, GUNTHER, P. C. BÖHNI, and G. S. Import of proteins into mitochondria. Cytochrome b2 and cytochrome c peroxidase are located in the intermembrane space of yeast mitochondria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 21, p. 13028–13033, 1982.

DIMAURO, S.; BONILLA, E.; DARRYL, C. Does the patient have a mitochondrial encephalomyopathy? **Journal of child neurology**, v. 14, n. 1 suppl, p. S23–S35, 1999.

DIMAURO, S.; SCHON, E. A. Nuclear power and mitochondrial disease. **Nature genetics**, v. 19, n. 3, p. 214–215, 1998.

DOLEZAL, P.; LIKIC, V.; TACHEZY, J.; LITHGOW, T. Evolution of the molecular machines for protein import into mitochondria. **Science (New York, N.Y.)**, v. 313, n. 5785, p. 314–318, 2006.

ELLIS, T. P.; HELFENBEIN, K. G.; TZAGOLOFF, A.; DIECKMANN, C. L. Atp3p Stabilizes the Mitochondrial Bicistronic mRNA Encoding Subunits 6 and 8 of the H⁺-translocating ATP Synthase of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 16, p. 15728–15733, 2004.

EPLER, J. L.; SHUGART, L. E.; BARNETT, W. E. N-Formylmethionyl transfer ribonucleic acid in mitochondria from *Neurospora*. **Biochemistry**, v. 9, n. 18, p. 3575–3579, 1970.

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*. **Journal of molecular biology**, v. 88, n. 1, p. 185–203, 1974.

FENG, L.; SHEPPARD, K.; NAMGOONG, S.; AMBROGELLY, A.; POLYCARPO, C.; RANDAU, L.; TUMBULA-HANSEN, D.; SÖLL, D. Aminoacyl-tRNA synthesis by pre-translational amino acid modification. **RNA biology**, v. 1, n. June, p. 16–20, 2004.

FENG, L.; SHEPPARD, K.; TUMBULA-HANSEN, D.; SÖLL, D. Gln-tRNA^{Gln} formation from Glu-tRNA^{Gln} requires cooperation of an asparaginase and a Glu-tRNA^{Gln} kinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 9, p. 8150–8155, 2005.

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

FERREIRO-BARROS, C. C.; BARROS, M. H. Mitochondrial Translation in Health and Disease. **Open Journal of Endocrine and Metabolic Diseases**, v. 03, n. 02, p. 1–9, 2013.

FIGUEIRA, T. R.; BARROS, M. H.; CAMARGO, A. a; CASTILHO, R. F.; FERREIRA, J. C. B.; KOWALTOWSKI, A. J.; SLUSE, F. E.; SOUZA-PINTO, N. C.; VERCESI, A. E. Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: from molecular mechanisms to human health. **Antioxidants & redox signaling**, v. 18, n. 16, p. 2029–74, 2013.

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

FRECHIN, M.; ENKLER, L.; TETAUD, E.; LAPORTE, D.; SENGGER, B.; BLANCARD, C.; HAMMANN, P.; BADER, G.; CLAUDER-MÜNSTER, S.; STEINMETZ, L. M.; MARTIN, R. P.; DI RAGO, J.-P.; BECKER, H. D. Expression of Nuclear and Mitochondrial Genes Encoding ATP Synthase Is Synchronized by Disassembly of a Multisynthetase Complex. **Molecular Cell**, v. 56, p. 763–776, 2014.

FRECHIN, M.; SENGGER, B.; BRAYE, M.; KERN, D.; MARTIN, R. P.; BECKER, H. D. Yeast mitochondrial Gln-tRNA^{Gln} is generated by a GatFAB-mediated transamidation pathway involving Arc1p-controlled subcellular sorting of cytosolic GluRS. **Genes and Development**, v. 23, p. 1119–1130, 2009.

- GABALDÓN, T.; HUYNEN, M. A. Reconstruction of the proto-mitochondrial metabolism. **Science (New York, N.Y.)**, v. 301, n. 5633, p. 609, 1 ago. 2003.
- GALPER, J. B.; DARNELL, J. E. The presence of N-formyl-methionyl-tRNA in HeLa cell mitochondria. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 34, n. 2, p. 205–214, 1969.
- GARCIA-GOMEZ, J. J.; LEBARON, S.; FROMENT, C.; MONSARRAT, B.; HENRY, Y.; DE LA CRUZ, J. Dynamics of the Putative RNA Helicase Spb4 during Ribosome Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 31, n. 20, p. 4156–4164, 2011.
- GLICK, B. S. [15] Pathways and energetics of mitochondrial protein import in *Saccharomyces cerevisiae*. **Methods in enzymology**, v. 260, p. 224–231, 1995.
- GOFFEAU, a; BARRELL, B. G.; BUSSEY, H.; DAVIS, R. W.; DUJON, B.; FELDMANN, H.; GALIBERT, F.; HOHEISEL, J. D.; JACQ, C.; JOHNSTON, M.; LOUIS, E. J.; MEWES, H. W.; MURAKAMI, Y.; PHILIPPSSEN, P.; TETTELIN, H.; OLIVER, S. G. Life with 6000 Genes. **Science**, v. 274, n. 546-6, 1996.
- GOTO, Y.; NONAKA, I.; HORAI, S. A mutation in the tRNA(Leu)(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. **Nature**, v. 348, n. 6302, p. 651–3, 1990.
- HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of molecular biology**, v. 166, n. 4, p. 557–580, 1983.
- HELL, K.; TZAGOLOFF, A.; NEUPERT, W.; STUART, R. a. Identification of Cox20p, a novel protein involved in the maturation and assembly of cytochrome oxidase subunit 2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 7, p. 4571–4578, 2000.
- HERBERT, C. J.; GOLIK, P.; BONNEFOY, N. Yeast PPR proteins, watchdogs of mitochondrial gene expression. **RNA biology**, v. 10, n. September, p. 1477–1494, 2013.
- HERRMANN, J. M.; FÖLSCH, H.; NEUPERT, W.; STUART, R. A.; GOTTLIEB, L. D. Isolation of yeast mitochondria and study of mitochondrial protein translation. v. 1, 1994.
- HILL, J. E.; MYERS, A. M.; KOERNER, T. J.; TZAGOLOFF, A. Yeast/*E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. **Yeast**, v. 2, n. 3, p. 163–167, 1986.
- HOLM, C.; MEEKS-WAGNER, D. W.; FANGMAN, W. L.; BOTSTEIN, D. A rapid, efficient method for isolating DNA from yeast. **Gene**, v. 42, n. 2, p. 169–173, 1986.
- HOLT, I. J.; HARDING, A. E.; MORGAN-HUGHES, J. A. Deletions of muscle mitochondrial DNA in mitochondrial myopathies: Sequence analysis and possible mechanisms. **Nucleic Acids Research**, v. 17, n. 12, p. 4465–4469, 1989.
- HOLZENBERGER, M.; DUPONT, J.; DUCOS, B.; LENEUEVE, 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.

HUGHES, T. R.; MARTON, M. J.; JONES, a R.; ROBERTS, C. J.; STOUGHTON, R.; ARMOUR, C. D.; BENNETT, H. a; COFFEY, E.; DAI, H.; HE, Y. D.; KIDD, M. J.; KING, a M.; MEYER, M. R.; SLADE, D.; LUM, P. Y.; STEPANIANTS, S. B.; SHOEMAKER, D. D.; GACHOTTE, D.; CHAKRABURTTY, K.; SIMON, J.; BARD, M.; FRIEND, S. H. Functional discovery via a compendium of expression profiles. **Cell**, v. 102, n. 1, p. 109–126, 2000.

ISLAS-OSUNA, M. a.; ELLIS, T. P.; MITTELMEIER, T. M.; DIECKMANN, C. L. Suppressor mutations define two regions in the Cbp1 protein important for mitochondrial cytochrome b mRNA stability in *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Genetics**, v. 43, n. 5, p. 327–336, 2003.

KEHREIN, K.; SCHILLING, R.; MÖLLER-HERGT, B. V.; WURM, C. A.; JAKOBS, S.; LAMKEMEYER, T.; LANGER, T.; OTT, M. Organization of Mitochondrial Gene Expression in Two Distinct Ribosome-Containing Assemblies. **Cell Reports**, p. 843–853, 2015.

KEHREIN, K.; VARGAS MÖLLER-HERGT, B.; OTT, M. The MIOREX complex - lean management of mitochondrial gene expression. **Oncotarget**, v. 6, n. 19, p. 16806–16807, 2015.

KIM, S. I.; STANGE-THOMANN, N.; MARTINS, O.; HONG, K. W.; SOLL, D.; FOX, T. D. A nuclear genetic lesion affecting *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial translation is complemented by a homologous *Bacillus* gene. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 17, p. 5625–5627, 1997.

KOOPMAN, W. J. H.; WILLEMS, P. H. G. M.; SMEITINK, J. a M.; PH, D. Monogenic mitochondrial disorders. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 12, p. 1132–1141, 2012.

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.

LI, Y. a N.; HOLMES, W. B.; APPLING, D. R.; UTTAM, L.; LI, Y. a N.; RAJBHANDARY, U. L. Initiation of Protein Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* Mitochondria without Formylation of the Initiator tRNA Initiation of Protein Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* Mitochondria without Formylation of the Initiator tRNA. **Journal of bacteriology**, v. 182, n. 10, p. 2886–2892, 2000.

LIPINSKI, K. A.; KANIAK-GOLIK, A.; GOLIK, P. Biochimica et Biophysica Acta Maintenance and expression of the *S. cerevisiae* mitochondrial genome — From genetics to evolution and systems biology. **BBA - Bioenergetics**, v. 1797, n. 6-7, p. 1086–1098, 2010.

LIPINSKI, K. a.; PUCHTA, O.; SURENDRANATH, V.; KUDLA, M.; GOLIK, P. Revisiting the Yeast PPR proteins-Application of an iterative hidden markov model algorithm reveals new members of the rapidly evolving family. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n. 10, p. 2935–2948, 2011.

- LIU, X.; KIM, C. N.; YANG, J.; JEMMERSON, R.; WANG, X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. **Cell**, v. 86, n. 1, p. 147–157, 1996.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.
- LUFT, R. The development of mitochondrial medicine. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 19, p. 8731–8738, 1994.
- MARCKER, K. The formation of N-formyl-methionyl-sRNA. **Journal of Molecular Biology**, v. 14, n. 1, p. 63–IN1, 1965.
- MARGULIS, L. Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria for proof. In: Symposia of the Society for Experimental Biology, 29, **Anais...**1974.
- MARKOV, D. a; WOJTAS, I. D.; TESSITORE, K.; HENDERSON, S.; MCALLISTER, W. T. Yeast DEAD-box protein Mss116p is a transcription elongation factor that modulates the activity of mitochondrial RNA polymerase. **Molecular and cellular biology**, v. 34, n. 13, p. MCB.00160–14, 2014.
- MERZ, S.; WESTERMANN, B. Genome-wide deletion mutant analysis reveals genes required for respiratory growth, mitochondrial genome maintenance and mitochondrial protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genome biology**, v. 10, n. 9, p. R95, 2009.
- MODA, B. S.; FERREIRA-JÚNIOR, J. R.; BARROS, M. H. Partial suppression of the respiratory defect of qrs1/her2 glutamyl-tRNA amidotransferase mutants by overexpression of the mitochondrial pentatricopeptide Msc6p. **Current Genetics**, 2016.
- MULERO, J. J.; ROSENTHAL, J. K.; FOX, T. D. PET112, a *Saccharomyces cerevisiae* nuclear gene required to maintain rho⁺ mitochondrial DNA. **Current genetics**, v. 25, n. 4, p. 299–304, 1994.
- MYERS, A. M.; PAPE, L. K.; TZAGOLOFF, A. Mitochondrial protein synthesis is required for maintenance of intact mitochondrial genomes in *Saccharomyces cerevisiae*. **The EMBO Journal**, v. 4, n. 8, p. 2087, 1985.
- NAGAO, A.; SUZUKI, T.; KATO, T.; SAKAGUCHI, Y.; SUZUKI, T. Biogenesis of glutaminyl-mt tRNA^{Gln} in human mitochondria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 38, p. 16209–16214, 2009.
- NAITHANI, S.; SARACCO, S. A.; BUTLER, C. A.; FOX, T. D. Interactions among COX1, COX2, and COX3 mRNA-specific Translational Activator Proteins on the Inner Surface of the Mitochondrial Inner Membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular biology of the cell**, v. 14, n. 1, p. 324–333, 2003.
- NAKAMURA, A.; YAO, M.; CHIMNARONK, S.; SAKAI, N.; TANAKA, I. Ammonia channel couples glutaminase with transamidase reactions in GatCAB. **Science (New York, N.Y.)**, v. 312, n. 5782, p. 1954–1958, 30 jun. 2006.

NISHINO, I.; SPINAZZOLA, A.; HIRANO, M. Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder. **Science**, v. 283, n. 5402, p. 689–692, 1999.

NITTIS, T.; GEORGE, G. N.; WINGE, D. R. Yeast Sco1, a Protein Essential for Cytochrome cOxidase Function Is a Cu (I)-binding Protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 45, p. 42520–42526, 2001.

NOUET, C.; BOURENS, M.; HLAVACEK, O.; MARSY, S.; LEMAIRE, C.; DUJARDIN, G. Rmd9p controls the processing/stability of mitochondrial mRNAs and its overexpression compensates for a partial deficiency of Oxa1p in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 175, n. 3, p. 1105–1115, 2007.

NUNNARI, J.; FOX, T. D.; WALTER, P. A mitochondrial protease with two catalytic subunits of nonoverlapping specificities. **Science-AAAS-Weekly Paper Edition-including Guide to Scientific Information**, v. 262, n. 5142, p. 1997–2004, 1993.

PUJOL, C.; BAILLY, M.; KERN, D.; MARÉCHAL-DROUARD, L.; BECKER, H.; DUCHÊNE, A.-M. Dual-targeted tRNA-dependent amidotransferase ensures both mitochondrial and chloroplastic Gln-tRNAGln synthesis in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 17, p. 6481–6485, 2008.

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

RODEHEFFER, M. S.; BOONE, B. E.; BRYAN, A. C.; SHADEL, G. S. Nam1p, a Protein Involved in RNA Processing and Translation, is Coupled to Transcription through an Interaction with Yeast Mitochondrial RNA Polymerase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 11, p. 8616–8622, 2001.

ROSE, M. D.; WINSTON, F. M.; HEITER, P. *Methods in yeast genetics: a laboratory course manual*. 1990.

ROTHSTEIN, R. J. One-step gene disruption in yeast. **Methods in enzymology**, v. 101, p. 202–211, 1983.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular CloningA Laboratory Manual** Cold Spring Harbor Laboratory Press, , 1989. .

SATOH, M.; KUROIWA, T. Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell. **Experimental cell research**, v. 196, n. 1, p. 137–140, 1991.

SCHARFE, C.; LU, H. H. S.; NEUENBURG, J. K.; ALLEN, E. a.; LI, G. C.; KLOPSTOCK, T.; COWAN, T. M.; ENNS, G. M.; DAVIS, R. W. Mapping Gene Associations in Human Mitochondria using Clinical Disease Phenotypes. **PLoS Computational Biology**, v. 5, n. 4, 2009.

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.

SCHÖN, A.; KANNANGARA, C. G.; COUGH, S.; SÖLL, D. Protein biosynthesis in organelles requires misaminoacylation of tRNA. **Nature**, v. 336, p. 403–405, 1988.

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

SCHULZE, M.; RÖDEL, G. SCO1, a yeast nuclear gene essential for accumulation of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit II. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 211, n. 3, p. 492–498, 1988.

SCHWARTZ, J. H.; MEYER, R.; EISENSTADT, J. M.; BRAVERMAN, G. Involvement of N-formylmethionine in initiation of protein synthesis in cell-free extracts of *Euglena gracilis*. **Journal of Molecular Biology**, v. 25, n. 3, p. 571–IN27, 1967.

SHARPE ELLES, L. M.; SYKES, M. T.; WILLIAMSON, J. R.; UHLENBECK, O. C. A dominant negative mutant of the *E. coli* RNA helicase DbpA blocks assembly of the 50S ribosomal subunit. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 19, p. 6503–6514, 2009.

SHEPPARD, K.; SÖLL, D. On the Evolution of the tRNA-Dependent Amidotransferases, GatCAB and GatDE. **Journal of Molecular Biology**, v. 377, n. 3, p. 831–844, 2008.

SHERMAN, F.; HICKS, J. Micromanipulation and dissection of asci. **Methods in enzymology**, v. 194, p. 21–37, 1990.

SMITH, a. E.; MARCKER, K. a. N-formylmethionyl transfer RNA in mitochondria from yeast and rat liver. **Journal of Molecular Biology**, v. 38, n. 2, p. 241–243, 1968.

SOLIGNAC, M.; MONNEROT, M.; MOUNOLOU, J.-C. Mitochondrial DNA heteroplasmy in *Drosophila mauritiana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 80, n. 22, p. 6942–6946, 1983.

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.

TIBBETTS, A. S.; OESTERLIN, L.; CHAN, S. Y.; KRAMER, G.; HARDESTY, B.; APPLING, D. R. Mammalian mitochondrial initiation factor 2 supports yeast mitochondrial translation without formylated initiator tRNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 34, p. 31774–31780, 2003.

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

TU, Y.-T.; BARRIENTOS, A. The Human Mitochondrial DEAD-Box Protein DDX28 Resides in RNA Granules and Functions in Mitochondrial Assembly. **Cell Reports**, v. 10, n. 6, p. 854–864, 2015.

TZAGOLOFF, A.; AKAI, a; NEEDLEMAN, R. B. Assembly of the mitochondrial membrane system: isolation of nuclear and cytoplasmic mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with specific defects in mitochondrial functions. **Journal of bacteriology**, v. 122, n. 3, p. 826–31, 1975.

UNDERBRINK-LYON, K.; MILLER, D. L.; ROSS, N. a.; FUKUHARA, H.; MARTIN, N. C. Characterization of a yeast mitochondrial locus necessary for tRNA biosynthesis - Deletion mapping and restriction mapping studies. **MGG Molecular & General Genetics**, v. 191, n. 3, p. 512–518, 1983.

VISCOMI, C.; BOTTANI, E.; ZEVIANI, M. Emerging concepts in the therapy of mitochondrial disease. **BBA - Bioenergetics**, v. 1847, n. 6-7, p. 544–557, 2015.

WALLACE, D. C. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. **Annual review of genetics**, v. 39, n. 3, p. 359–407, 2005.

WALLACE, D. C.; RUIZ-PESINI, E.; MISHMAR, D. mtDNA variation, climatic adaptation, degenerative diseases, and longevity. In: Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology, **Anais...Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2003.

WESOLOWSKI, M.; FUKUHARA, H. The genetic map of transfer RNA genes of yeast mitochondria: correction and extension. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 170, n. 3, p. 261–275, 1979.

WILCOX, M. γ -Glutamyl Phosphate Attached to Glutamine-Specific tRNA. **European Journal of Biochemistry**, v. 11, n. 3, p. 405–412, 1969.

WILCOX, M.; NIRENBERG, M. Transfer RNA as a cofactor coupling amino acid synthesis with that of protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 61, n. 1, p. 229, 1968.

ZENG, X.; NEUPERT, W.; TZAGOLOFF, A. The metalloprotease encoded by ATP23 has a dual function in processing and assembly of subunit 6 of mitochondrial ATPase. **Molecular biology of the cell**, v. 18, n. 2, p. 617–626, 2007.

ZHANG, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. **BMC bioinformatics**, v. 9, p. 40, 2008.

APÊNDICE

A - Partial suppression of the respiratory defect of qrs1/her2 glutamyl-tRNA amidotransferase mutants by overexpression of the mitochondrial pentatricopeptide Msc6p

[Curr Genet.](#) 2016 Aug;62(3):607-17. doi: 10.1007/s00294-016-0566-6. Epub 2016 Jan 16. [Moda BS](#)¹, [Ferreira-Júnior JR](#)², [Barros MH](#)³.

Abstract

Recently, a large body of evidences indicates the existence in the mitochondrial matrix of foci that contain different proteins involved in mitochondrial RNA metabolism. Some of these proteins have a pentatricopeptide repeat motif that constitutes their RNA-binding structures. Here we report that MSC6, a mitochondrial pentatricopeptide protein of unknown function, is a multi-copy suppressor of mutations in QRS1/HER2 a component of the trimeric complex that catalyzes the transamidation of glutamyl-tRNAQ to glutaminyl-tRNAQ. This is an essential step in mitochondrial translation because of the lack of a specific mitochondrial aminoacyl glutaminyl-tRNA synthetase. MSC6 over-expression did not abolish translation of an aberrant variant form of Cox2p detected in QRS1/HER2 mutants, arguing against a suppression mechanism that bypasses Qrs1p function. A slight decrement of the mitochondrial translation capacity as well as diminished growth on respiratory carbon sources media for respiratory activity was observed in the msc6 null mutant. Additionally, the msc6 null mutant did not display any impairment in RNA transcription, processing or turnover. We concluded that Msc6p is a mitochondrial matrix protein and further studies are required to indicate the specific function of Msc6p in mitochondrial translation.