

JHULIA ALMEIDA CLARCK CHAGAS

**Identificação de proteínas do complexo MIOREX de função desconhecida
que possam estar envolvidas com a tradução mitocondrial**

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

SÃO PAULO

2022

JHULIA ALMEIDA CLARCK CHAGAS

**Identificação de proteínas do complexo MIOREX de função desconhecida
que possam estar envolvidas com a tradução mitocondrial**

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

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Mario Henrique de Barros

Versão corrigida

SÃO PAULO

2022

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

CHAGAS, JHULIA

Identificação de proteínas do complexo MIOREX de função desconhecida que possam estar envolvidas com a tradução mitocondrial / JHULIA CHAGAS; orientador JHULIA CHAGAS; coorientador Mario Henrique Barros. - São Paulo, 2022.
70 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Saccharomyces cerevisiae. 2. Mitocôndria . 3. MIOREX. 4. Tradução mitocondrial. I. CHAGAS, JHULIA, orientador. II. Barros, Mario Henrique, coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Jhulia Almeida Clarck Chagas

Título da Dissertação: Identificação de proteínas do complexo MIOREX de função desconhecida que possam estar envolvidas com a tradução mitocondrial

Orientador(a): Prof. Dr. 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 Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **1088/2020** referente ao projeto intitulado: **"Identificação de proteínas do complexo MIOREX de função desconhecida que possam estar envolvidas com a tradução mitocondrial"**, sob a responsabilidade do(a) aluno(a) **Jhulia Almeida Clarck** e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Mario Henrique de Barros**, do Departamento de Microbiologia, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pelo **CEPSH** - Comitê 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 466/2012.

São Paulo, 26 de fevereiro de 2020.



Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA ICB/USP



Profa. Dra. **Camila Squarzoni Dale**
Coordenadora CEPESH ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Ao professor Mario Henrique de Barros, meu orientador, por quem tenho grande admiração na área acadêmica. Obrigada pela confiança depositada em mim para realizar o Mestrado e por me ensinar todos esses anos sobre as mitocôndrias.

Aos meus amigos e funcionários de laboratório que me acompanharam desde a iniciação científica: Sasa, Barbara, Jonathan, Carol, Marcela, Claudia, Maria e Leticia. Um agradecimento especial por terem me ajudado em experimentos e me apoiado em todas as etapas para a concretização deste projeto.

Aos meus amigos de ICB e vizinhos de laboratório: Naara, Hugo, Marina, Douglas e Renatta. Obrigada pela motivação e momentos felizes fora do laboratório. Sempre juntos fazendo ciência.

Aos meus familiares e parentes por todo amor e carinho, que sempre acreditaram na minha formação.

Aos órgãos financiadores deste trabalho, CAPES e FAPESP (Processo 2020/01573-8).

RESUMO

CHAGAS, J. A. C. **Identificação de proteínas do complexo MIOREX de função desconhecida que possam estar envolvidas com a tradução mitocondrial.** Dissertação (Mestre em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2022.

As mitocôndrias são organelas essenciais para o funcionamento das células e responsáveis pela fosforilação oxidativa nos organismos eucariotos. Com o decorrer da evolução, os genomas mitocondriais diferenciaram-se nos diversos reinos com pequena variação em seu conteúdo. A existência desse sistema genético é vital para a morfogênese de uma organela respiratória competente e para traduzir a informação nele contida através do seu próprio conjunto de mitorribossomos. *Saccharomyces cerevisiae* tem sido utilizado como modelo de estudo para biogênese mitocondrial há mais de cinquenta anos, tendo grande valor na identificação e caracterização de proteínas que afetam a função mitocondrial. Estudos recentes demonstraram a presença de um grande complexo nas leveduras denominado MIOREX, que inclui o mitorribossomo e proteínas envolvidas nas etapas de expressão gênica. Muitos componentes deste complexo ainda têm função desconhecida e foram nomeados de proteínas Mrx. Este trabalho iniciou-se com estudos de super-expressão de componentes do MIOREX a fim de identificar fenótipos que auxiliassem a sua caracterização funcional. Assim, analisou-se o gene nuclear *MRX9* que codifica uma proteína importada para as mitocôndrias, localizada intrinsecamente na membrana interna voltada para a matriz. O excesso de Mrx9p é prejudicial para as mitocôndrias de *S. cerevisiae*, pois acarreta em baixa taxa de tradução do mRNA de *COX1*. Cox1p é uma subunidade do complexo IV (citocromo *c* oxidase) da cadeia respiratória de elétrons. O mutante nulo *mrx9* não apresenta quaisquer deficiências de crescimento em meios que avaliam a atividade mitocondrial, ou dificuldades em traduzir polipeptídeos codificados pelo mtDNA. Contudo, as linhagens que super-expressam *MRX9* demonstraram fenótipos de atividades reduzidas para o complexo IV, além de terem atraso para a adaptação do crescimento respiratório ao finalizar o metabolismo fermentativo. Em linhagens sem íntrons no genoma mitocondrial, observou-se que não há diminuição na tradução de Cox1p em decorrência da super-expressão de *MRX9*, havendo, portanto, a relação do fenótipo com a presença destas regiões não codificantes. Ainda, a super-expressão de *MRX9* mostrou alterar a acessibilidade da proteína Mss51p ao mitorribossomo. Mss51p atua no início e no alongamento da tradução de *COX1*, além de participar da montagem desta subunidade na membrana interna da organela. Os resultados deste trabalho indicam que Mrx9p atua no processo de tradução de *COX1*, entretanto, novos estudos serão necessários para a descrição do seu mecanismo de ação.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*; Mitocôndria; MIOREX; Tradução mitocondrial.

ABSTRACT

CHAGAS, J. A. C. **Identification of MIOREX complex proteins of unknown function which may be involved in mitochondrial translation.** Masters thesis (Microbiology) – Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, 2022.

Mitochondria are essential organelles for cell function and responsible for oxidative phosphorylation in eukaryotic organisms. Along evolution, mitochondrial genomes differentiated into different kingdoms with little variation in their content. The existence of this genetic system is vital for the morphogenesis of a competent respiratory organelle and for translating information genetic through its own set of mitoribosomes. *Saccharomyces cerevisiae* has been used as a study model for mitochondrial biogenesis for over fifty years, having great value in the identification and characterization of proteins that affect mitochondrial function. Recent studies have demonstrated the presence of a large complex in yeast called MIOREX, which includes the mitoribosome and proteins involved in post-transcriptional gene expression steps. Many components of this complex still have an unknown function and have been named Mrx proteins. In this work, we over-express MIOREX components screening for those with altered phenotypes that may help functional characterization. The *MRX9* gene was selected in this screening. A tagged version of Mrx9p allowed its submitochondrial localization, the protein is imported into mitochondria, located intrinsically in the inner membrane facing the matrix. The excess of Mrx9p is harmful to the mitochondria of *S. cerevisiae*, as it leads to low rates of *COX1* mRNA translation, in addition to providing the defective version of this protein. Cox1p is a subunit of complex IV (cytochrome *c* oxidase) of the electron respiratory chain. The *mrx9* null mutant does not show any growth deficiencies in media that assess mitochondrial activity or difficulties in translating or accumulating mitochondrial polypeptides. However, the strains that overexpress *MRX9* showed phenotypes of reduced activities for complex IV, in addition to having a delay in the adaptation of respiratory growth at the end of the fermentative metabolism. Studies in strains without introns in the mitochondrial genome showed that the defect in the translation of Cox1p in strains that have an excess of Mrx9p does not occur, thus, there is a relationship between the phenotype and the presence of these non-coding regions. Furthermore, the overexpression of *MRX9* has been shown to alter the accessibility of Mss51p to the mitoribosome. Mss51p acts in the initiation and elongation of *COX1* translation, in addition to participating in the assembly of this subunit in the inner membrane of the organelle. Finally, the results of this work indicated a role of Mrx9p in the *COX1* translation process; however, further studies will be necessary to unveil Mrx9p regulatory mechanism in the MIOREX complex.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*; Mitochondria; MIOREX; Mitochondrial translation.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Compartimentos mitocondriais e cadeia respiratória..... | 13 |
| Figura 2. Organização do mtDNA e subunidades dos complexos respiratórios..... | 15 |
| Figura 3. Regulação da síntese da subunidade 1 da citocromo <i>c</i> oxidase (Cox1)..... | 20 |
| Figura 4. Distribuição do complexo MIOREX na rede mitocondrial..... | 22 |
| Figura 5. Mrx2p (Coq11p) participa na biossíntese de Coenzima Q..... | 23 |
| Figura 6. Mrx5p (Smt1p) reprime a tradução do mRNA de <i>ATP8/6</i> | 24 |
| Figura 7. Modelo da participação de Mrx6p no complexo de replicação do mtDNA..... | 24 |
| Figura 8. Mrx15p e Mba1 são receptores para o mitorribossomo na membrana interna mitocondrial..... | 25 |
| Figura 9. Obtenção do alelo nulo <i>mrx9</i> em <i>S. cerevisiae</i> | 32 |
| Figura 10. Medição da atividade específica dos complexos respiratórios..... | 35 |
| Figura 11. Super-expressão de componentes do complexo MIOREX e propriedades na tradução mitocondrial..... | 40 |
| Figura 12. Propriedades de mutantes $\Delta mrx9$ e informações estruturais de Mrx9p..... | 42 |
| Figura 13. Níveis endógenos de proteínas mitocondriais e atividade dos complexos respiratórios III e IV..... | 43 |
| Figura 14. Níveis de expressão de <i>MRX9</i> -HA com o uso de diferentes promotores..... | 45 |
| Figura 15. Excesso de Mrx9p atrasa a adaptação do metabolismo fermentativo para a respiração mitocondrial..... | 46 |
| Figura 16. Mrx9p é uma proteína de membrana interna voltada para matriz..... | 48 |
| Figura 17. Sedimentação de Mrx9p e proteínas ribossomais em gradientes de sacarose com Triton..... | 50 |
| Figura 18. Sedimentação de Mrx9p e proteínas ribossomais em gradientes de sacarose com Digitonina..... | 52 |
| Figura 19. Excesso de Mrx9p em cepas sem íntrons e níveis endógenos de Cox24p..... | 54 |

LISTA DE ABREVIACÕES

- Abs – Absorbância
- ATP – Adenosina Trifosfato
- CoQ – Coenzima Q
- COX - Citocromo *c* Oxidase
- Cy**t***b* – Citocromo *b*
- DNA - Ácido Desoxirribonucleico
- FADH₂ – Flavina Adenina Dinucleotídeo Reduzida
- H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio
- KCN – Cianeto de Potássio
- kDa – Kilo Dáltons
- Kb - Kilobase
- LB – Luria Bertani
- MAT* – *Locus* de determinação sexual em *S. cerevisiae*
- MgCl₂ – Cloreto de Magnésio
- MIOREX - *Mitochondrial Organization of Gene Expression*
- mRNA – RNA Mensageiro
- mtDNA – Ácido Desoxirribonucleico Mitocondrial
- NADH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzida
- ORF – *Open Reading Frame*
- PCR – Reação de Polimerase em Cadeia
- Petite* – Ausência de DNA Mitocondrial
- rRNA – RNA Ribossômico
- SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com Dodecil-Sulfato de Sódio
- SGD – Banco de dados do genoma de *Saccharomyces cerevisiae*
- TCA – Ácido Tricloroacético
- tRNA – RNA Transportador

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 10 |
| 1.1 Mitocôndria: importância, origem e estrutura | 10 |
| 1.2 O sistema genético mitocondrial..... | 13 |
| 1.3 <i>S. cerevisiae</i> como modelo de estudo da biogênese mitocondrial..... | 15 |
| 1.4 Fatores necessários para a tradução mitocondrial | 16 |
| 1.5 A descoberta do complexo MIOREX..... | 21 |
| 2 OBJETIVOS | 26 |
| 2.1 Objetivos específicos | 26 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS | 27 |
| 3.1 Linhagens utilizadas..... | 27 |
| 3.2 Meios de cultura | 28 |
| 3.3 Procedimentos gerais para a manipulação de <i>S. cerevisiae</i> e <i>E. coli</i> | 28 |
| 3.4 Desenho de Primers..... | 29 |
| 3.5 Clonagem dos genes <i>MRX</i> e construção do mutante $\square mrx9$ | 30 |
| 3.6 Construção de ORFs fusionadas com epítomos | 31 |
| 3.7 Ensaio de crescimento com diluição seriada..... | 32 |
| 3.8 Obtenção de linhagens por cruzamento | 32 |
| 3.9 Análise de proteínas mitocondriais recém-sintetizadas..... | 32 |
| 3.10 Isolamento de mitocôndrias | 33 |
| 3.11 Medição da atividade dos complexos respiratórios mitocondriais III e IV | 33 |
| 3.12 Ensaio de localização proteica intramitocondrial | 34 |
| 3.13 Ensaio de solubilidade proteica..... | 35 |
| 3.14 Gradiente de sacarose | 35 |
| 3.15 <i>Western blot</i> | 36 |
| 3.16 Curvas de crescimento | 37 |
| 4 RESULTADOS | 38 |
| 4.1 Super-expressão de genes <i>MRX</i> | 38 |
| 4.2 Propriedades fenotípicas de mutantes $\Delta mrx9$ | 40 |
| 4.3 Excesso de Mrx9p acarreta em baixos níveis endógenos de Cox1p e menor atividade de COX | 41 |
| 4.4 Super-expressão de <i>MRX9</i> atrasa a adaptação ao metabolismo respiratório | 43 |
| 4.5 Localização intramitocondrial de Mrx9p | 47 |
| 4.6 Perfil de co-sedimentação de Mrx9p com o mitorribossomo | 48 |
| 4.7 Super-expressão de <i>MRX9</i> em linhagens desprovidas de íntrons mitocondriais | 52 |
| 5 DISCUSSÃO | 55 |
| 6 CONCLUSÕES | 58 |
| REFERÊNCIAS | 59 |
| ANEXOS – CERTIFICADOS DE CURSOS OBRIGATÓRIOS | 70 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Mitocôndria: importância, origem e estrutura

As mitocôndrias caracterizam-se como organelas essenciais, desempenhando diversas funções em processos celulares. Entre seus papéis mais importantes está a realização da fosforilação oxidativa nas células eucariontes. O processo de fosforilação acarreta na produção de ATP a partir de glicose e oxigênio, no qual os complexos respiratórios propiciam um gradiente eletroquímico utilizado pela ATP sintase para formação de energia. Ainda, essas organelas podem participar de outros processos bioquímicos, como por exemplo: β -oxidação de ácidos graxos; ciclo do ácido cítrico (WINDE; GRIVELL, 1993); biossíntese dos grupos heme e ferro-enxofre (LILL; MÜHLENHOFF, 2006). Além de sua funcionalidade no metabolismo energético, as mitocôndrias regulam os processos de apoptose (TAIT; GREEN, 2010) e estão associadas ao envelhecimento (LÓPEZ et al., 2013).

A hipótese mais aceita para explicar a origem das mitocôndrias é a teoria endossimbionte, que também refere-se à origem de cloroplastos, demonstrando parentesco das organelas com procariotos de vida livre (ZIMORSKI et al., 2014). Tipicamente, a teoria abrange a incorporação estável de uma bactéria quimiorganotrófica com metabolismo aeróbio facultativo em uma arqueia, originando as mitocôndrias. Já para cloroplastos, pressupõe uma cianobactéria que efetuava fotossíntese oxigênica. Fatores como metabolismo, fisiologia e expressão gênica destas organelas sustentam a hipótese da endossimbiose (MADIGAN et al., 2016).

Em razão de sua ancestralidade advinda de α -proteobactérias (SAGAN, 1967), as mitocôndrias também contêm um genoma fortemente reduzido em seu conteúdo, assim como um próprio ribossomo (mitorribossomo) e outros elementos moleculares necessários para expressar a informação codificada pelo DNA mitocondrial (mtDNA) (SHARMA et al., 2003). Através de um processo evolutivo independente, as espécies originaram genomas mitocondriais com algumas diferenças, tendo na composição deste genoma os genes que codificam subunidades proteicas altamente hidrofóbicas dos complexos da cadeia respiratória (OTT et al., 2016).

A maioria das mitocôndrias de variadas espécies abriga uma quantidade considerável de proteínas e codifica um número baixo de proteínas através do mtDNA. A explicação para essa discrepância foi esclarecida por meio de uma teoria corolária da endossimbiose, que abrange a transferência de diversos genes para o genoma nuclear. Ao decorrer do processo

evolutivo, a maior parte dos genes mitocondriais foi deslocada para os cromossomos de seus hospedeiros. Assim, os genes transferidos foram expressos como proteínas citosólicas ou se constituíram como pseudogenes. Após o surgimento do sistema de importação das proteínas do citosol para as mitocôndrias, estes genes transferidos adquiriram sinais de expressão a fim de suas proteínas serem direcionadas de volta para as organelas (MARTIN; HERRMANN, 1998).

Muitos estudos relatam que o código genético foi amplamente alterado após o evento da endossimbiose. Na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo, seis códons foram reatribuídos e diferem do código genético universal. Isto pode ser observado para UGA, um códon de parada na tradução citoplasmática, entretanto, codifica para o aminoácido triptofano nas organelas (BONITZ et al., 1980). Além disso, o mtDNA humano atribuiu de forma diferente quatro códons. Aspectos como hidrofobicidade de proteínas da cadeia respiratória codificadas pelo genoma mitocondrial e divergência no padrão de códons foram propostos como a razão da não transferência de certos genes mitocondriais ao genoma nuclear (CLAROS et al., 1995).

Estruturalmente, as mitocôndrias possuem duas membranas. A membrana externa envolve a organela, enquanto a membrana interna está em contato com uma região denominada matriz mitocondrial. O espaço entre as duas membranas, comumente chamado de espaço intermembranas, é a região onde é gerado o gradiente de prótons (H^+) através da transferência de elétrons dos complexos da cadeia respiratória. Há também grandes invaginações na membrana interna, que recebem o nome de cristas mitocondriais. Assim, as cristas abrigam os complexos da cadeia respiratória, que são responsáveis pelo sistema de fosforilação oxidativa (Figura 1A) (SCHAFFER; SULEIMAN, 2010).

O mecanismo da fosforilação oxidativa consiste em quatro complexos da cadeia respiratória e a ATP sintase (Figura 1B). Esses complexos foram denominados de complexo I (NADH desidrogenase ou CI); complexo II (succinato desidrogenase ou CII); complexo III (ubiquinol citocromo *c* redutase ou CIII); complexo IV (citocromo *c* oxidase ou CIV); complexo V (ATP sintase ou CV).

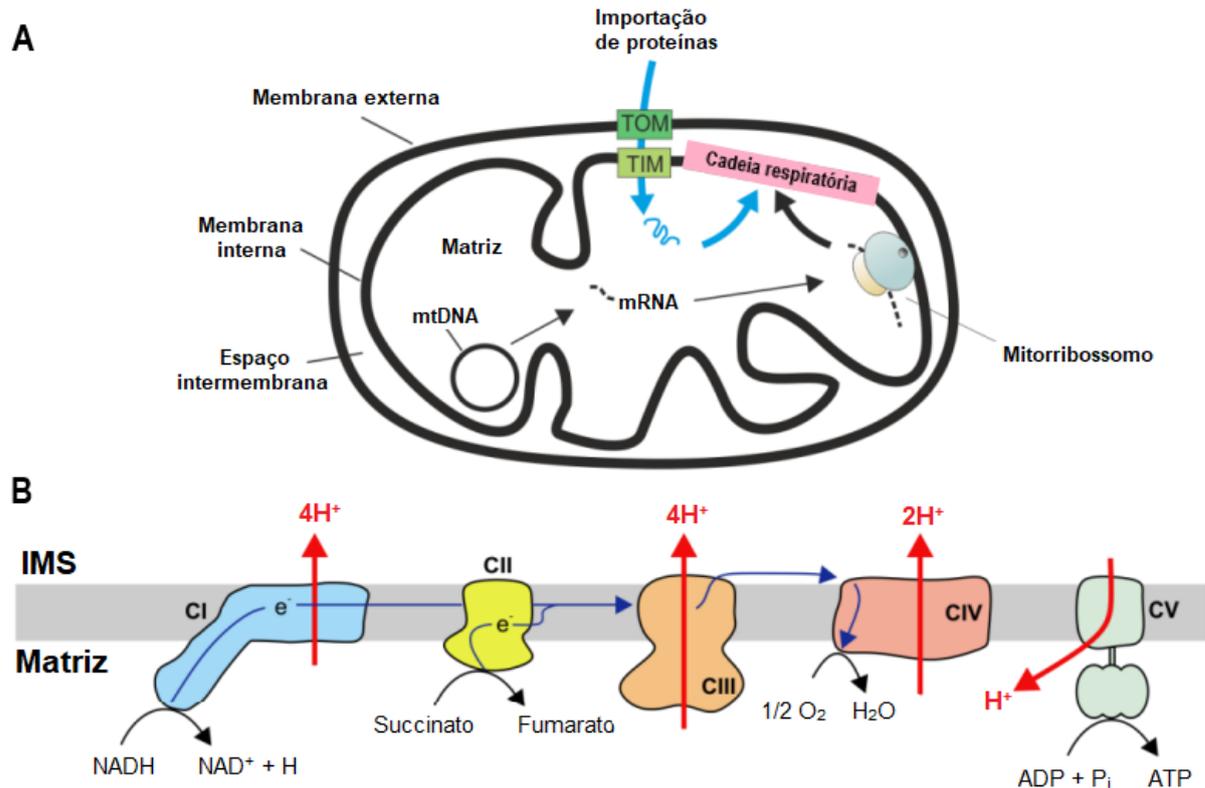


Figura 1. Compartimentos mitocondriais e cadeia respiratória. **A)** Mitocôndrias possuem duas membranas que separam os seus compartimentos. Além da presença de mtDNA e mitorribossomos, a matriz mitocondrial possui um aparato proteico que realiza transcrição e tradução de mRNA, e inserção de subunidades proteicas da fosforilação oxidativa na membrana interna. Proteínas mitocondriais são importadas do citosol através do sistema TOM (translocase de membrana externa) e TIM (translocase de membrana interna) ou são sintetizadas na matriz por meio dos mitorribossomos. **B)** Sistema de fosforilação oxidativa mitocondrial. Elétrons liberados do NADH do complexo I (CI) e da oxidação do succinato do complexo II (CII) são transferidos para o complexo III (CIII) e, por fim, translocados para o complexo IV (CIV). Nesta última etapa, os elétrons são utilizados para reduzir oxigênio molecular à água. Essa transferência de elétrons é acoplada a uma transferência endergônica de prótons nos complexos CI, CIII e CIV da matriz para o espaço intermembranas (IMS). Assim, a energia gerada pelo gradiente de prótons é utilizada pela ATP sintase (CV) para produzir ATP (Fonte: adaptado de MÖLLER-HERGT, 2018).

Durante a fosforilação oxidativa, os elétrons do NADH e FADH₂ são introduzidos na cadeia respiratória, havendo, assim, redução do oxigênio molecular a água. Nesse processo, os elétrons são canalizados através de diferentes complexos respiratórios ligados a membrana interna, ocasionando uma série de reações redox exergônicas (SAZANOV, 2015). No entanto, apenas nos complexos I, III e IV essas reações estão associadas a uma transferência ou gradiente de prótons (H⁺) de modo endergônico (MITCHELL, 1961). A energia proveniente deste gradiente segue direção da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, sendo utilizada no final pela ATP sintase para gerar ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico. Estabelece-se, portanto, a principal fonte de energia química na forma de ATP nas células aeróbicas (MÖLLER-HERGT, 2018).

1.2 O sistema genético mitocondrial

Em fungos e animais, o mtDNA codifica poucas quantidades de RNAs mensageiros (mRNAs), que são traduzidos através dos ribossomos mitocondriais ancorados na membrana interna da organela. A presença de um sistema de expressão gênica mitocondrial, que co-evoluiu juntamente com o genoma nuclear, é requerida para manter os processos de transcrição, tradução e inserção de proteínas recém-sintetizadas na cadeia respiratória. Dessa maneira, o genoma das mitocôndrias também contêm genes para RNAs ribossomais (rRNAs) e RNAs transportadores (tRNAs) (CHRISTIAN; SPREMULLI, 2012).

Em humanos, o mtDNA codifica um total de treze subunidades proteicas para a cadeia respiratória, havendo genes para o complexo I (*ND1*, *ND2*, *ND3*, *ND4/ND4L*, *ND5* e *ND6*); complexo III (*COB*); complexo IV (*COX1*, *COX2* e *COX3*) e complexo V (*ATP6* e *ATP8*). Além de codificar 2 rRNAs, 22 tRNAs e 11 mRNAs (*ND4/ND4L* e *ATP6/ATP8* são mRNAs bicistrônicos) (SARRASTE, 1999).

Na levedura *S. cerevisiae*, o genoma mitocondrial de 75 kb codifica apenas oito proteínas. Entretanto, não codifica proteínas para o complexo I, que é constituído por múltiplas subunidades em humanos. Como forma de compensar essa ausência, a levedura possui na sua membrana interna mitocondrial três NADH desidrogenases que acarretam o acoplamento da oxidação do NADH, havendo redução da ubiquinona (Coenzima Q) e, posteriormente, passagem de elétrons para o complexo III da cadeia respiratória. Ainda, *S. cerevisiae* possui um gene para um componente da subunidade menor do mitorribossomo (SSU), denominado *VARI*. Além de codificar também 2 rRNAs, 24 tRNAs e 7 mRNAs (*ATP6/ATP8* é um mRNA bicistrônico) (FOURY et al., 1998). (Figura 2A).

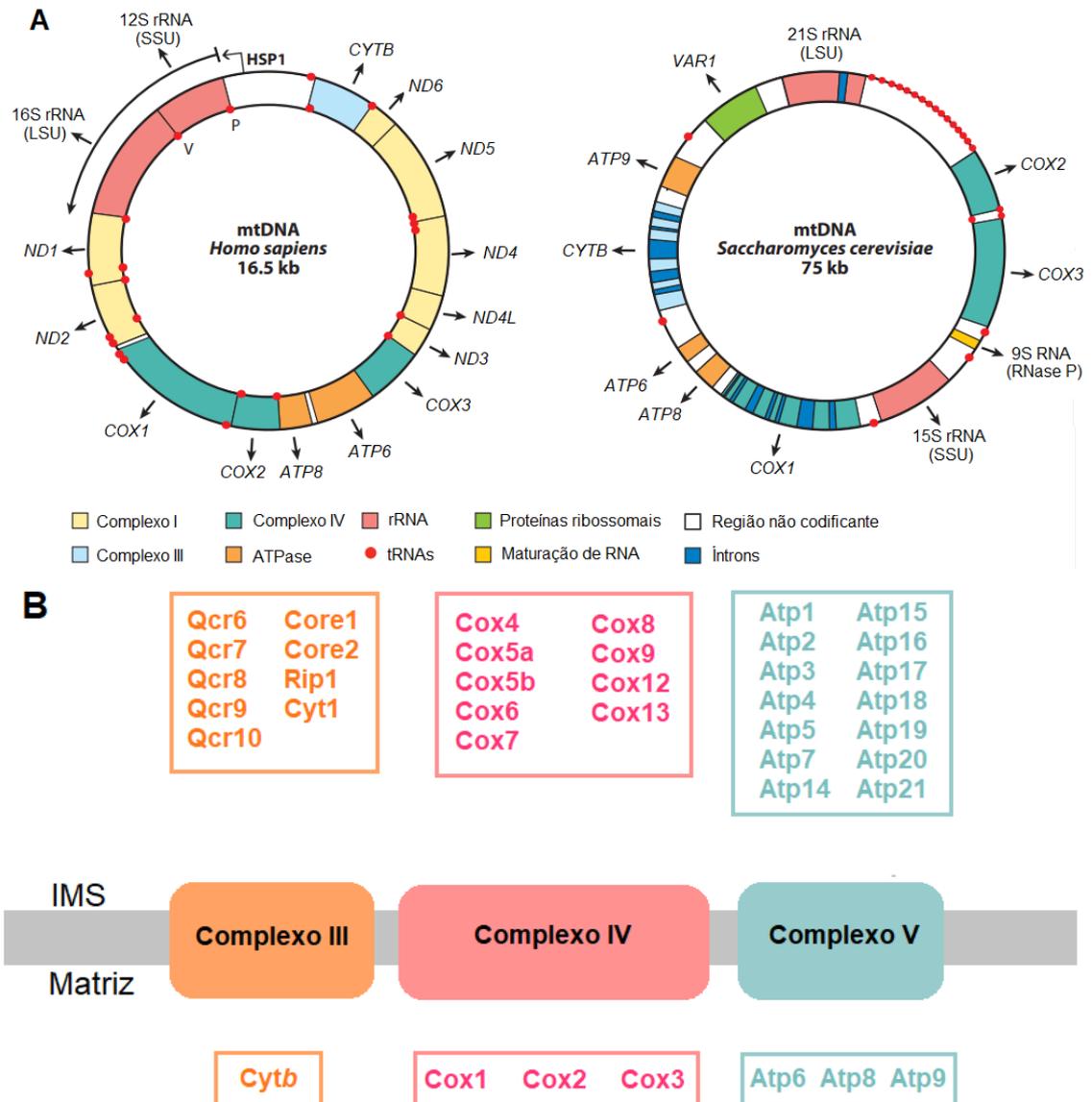


Figura 2. Organização do mtDNA e subunidades dos complexos respiratórios. A) O genoma mitocondrial em levedura codifica para os complexos III, IV e V. Possui também genes para 2 rRNAs, 24 tRNAs, 7 mRNAs, e para o componente 9S da RNase P. O genoma mitocondrial em humanos codifica para o complexo I, III, IV e V. Além de possuir genes para 2 rRNAs, 22 tRNAs, e 11 mRNAs. Nota-se que apesar de codificar menos proteínas, o mtDNA de *S. cerevisiae* é aproximadamente cinco vezes maior em relação ao mtDNA humano, devido a uma quantidade considerável de regiões não codificantes e íntrons entre alguns genes. B) Subunidades do complexo da fosforilação oxidativa em *S. cerevisiae*. Nos quadros acima, estão representado as subunidades codificadas pelo DNA nuclear. Nos quadros abaixo, estão representados as subunidades codificadas pelo mtDNA (Fonte: adaptado de OTT et al., 2016; MÖLLER-HERGT, 2018).

De fato, a expressão dos genes mitocondriais não é auto-suficiente para manter o sistema de fosforilação oxidativa, sendo requerido subunidades codificadas pelo genoma nuclear (Figura 2B). A maquinaria necessária para transcrição, processamento de RNA, tradução e inserção das subunidades na membrana interna também é sintetizada no citosol e, em seguida, importada para as organelas. Na levedura *S. cerevisiae*, aproximadamente 250 proteínas codificadas pelo DNA nuclear são necessárias para os processos de expressão gênica mitocondrial (PEARCE et al., 2017).

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

S. cerevisiae foi o primeiro organismo eucarioto a ter seu genoma nuclear sequenciado, o que possibilitou a descoberta de novos genes (GOFFEAU et al., 1996). Seu destaque como modelo de estudos biológicos ocorreu a partir de ensaios de recombinação homóloga relacionados ao *loci* adenina (ROMAN, 1956). Além de ser unicelular e diferente de outros eucariotos mais complexos, a levedura é facilmente manipulada em laboratórios por apresentar crescimento em meio de cultura definido. Ainda, as principais vantagens do seu uso relaciona-se aos conhecimentos adquiridos sobre suas formas de cultivo, ciclo de vida e manipulação genética (BARRIENTOS, 2003).

A participação de *S. cerevisiae* nos estudos de biogênese mitocondrial se tornou mais comum a partir de experimentos com seu mtDNA e do sequenciamento do seu DNA nuclear na década de 1990 (FOURY et al., 1998; GOFFEAU et al., 1996). De maneira geral, os estudos relacionados à biogênese mitocondrial buscam compreender como é realizada a montagem dos complexos respiratórios a partir de proteínas traduzidas pelos mitorribossomos em conjunção com as proteínas oriundas da síntese proteica citosólica, que são importadas para o interior da organela pelos transportadores TOM e TIM (Figura 1A).

Pode-se ressaltar que os mais importantes benefícios deste organismo para os estudos mitocondriais são: 1) a levedura consegue gerar energia tanto por fermentação como por respiração mitocondrial, facilitando a análise de genes nucleares que afetam a função respiratória da organela; 2) por ser aeróbio facultativo, há a possibilidade de isolar mutantes respiratórios em meios de cultura apropriados, e isso ocorre, por exemplo, devido a facilidade de cultivo em meios contendo fontes de carbono não fermentáveis, como glicerol e etanol; 3) *S. cerevisiae* pode ser manipulado geneticamente com tanta facilidade quanto *E. coli*, isto é, pode ser transformado com plasmídeos e ter seus genes interrompidos e marcados; 4) as linhagens de laboratório podem se manter indefinidamente nos estados haplóide e diplóide, favorecendo o estudo de genes essenciais para a vida e as relações de dominância entre alelos. Suas células haplóides podem existir de duas formas: o tipo sexual “a” e “α”; 5) grande parte dos genes que codificam proteínas mitocondriais são altamente conservados entre os eucariotos (FELDMANN, 2010; GERSHON; GERSHON, 2000; TZAGOLOFF; DIECKMANN, 1990).

O elevado grau de similaridade entre mitocôndrias de levedura e humanos tem possibilitado a identificação de genes nucleares associados às doenças mitocondriais. Geralmente, distúrbios mitocondriais são fatais nas fases iniciais da vida humana. Mutações

nos componentes do sistema da fosforilação oxidativa são as causas mais comuns das mitocondriopatias. Isto pode ser observado, por exemplo, em deficiências no complexo IV da cadeia respiratória, onde as manifestações clínicas podem incluir falência hepática, encefalomiopatia e síndrome de Leigh (BARRIENTOS et al., 2002).

Há casos também de mutações em proteínas do mitorribossomo, acarretando na instabilidade dos polipeptídeos recém-produzidos, deficiência na cadeia respiratória e montagem prejudicada da subunidade ribossômica afetada. Estas alterações estão associadas a uma variedade de fenótipos graves em humanos, como cardiomiopatias e complicações neurológicas. (CARROLL et al., 2013). Apesar de mutações nos genes codificantes para proteínas da LSU ou SSU serem um obstáculo na biogênese de uma das subunidades ribossômicas, a outra subunidade não afetada permanece inalterada, sugerindo que ambas são montadas independentemente uma da outra (EMDADUL et al., 2008).

1.4 Fatores necessários para a tradução mitocondrial

Manter um genoma separado do núcleo demanda um custo energético para as mitocôndrias. Assim como existem fatores requeridos para a replicação e manutenção do mtDNA, as organelas acabam necessitando de um sistema de expressão gênica para traduzir seus mRNAs (CHRISTIAN; SPREMULLI, 2012). Estima-se que $\frac{1}{4}$ de um total de 1000 proteínas do proteoma mitocondrial em levedura é responsável por realizar a manutenção desse sistema genético (SICKMANN et al., 2003).

Uma das principais descobertas de fatores proteicos que modulam os processos de tradução mitocondrial foram os ativadores de tradução. O conceito de ativadores de tradução foi proposto inicialmente por Fox e Costanzo em 1990. Desta forma, a tradução das oito proteínas codificadas pelo mtDNA em *S. cerevisiae* é dependente de ativadores de tradução para cada um dos mRNAs mitocondriais. O mecanismo de atuação da maioria dos ativadores já descritos está associado a uma interação física com a região 5' não traduzida (5'UTR) dos seus transcritos alvos (COSTANZO; FOX, 1990; ZAMUDIO-OCHOA, 2014).

Diferentemente dos transcritos presentes no citoplasma dos eucariotos, os mRNAs da organela não possuem CAP ou cauda poli A na sua estrutura. Ao invés disso, as mitocôndrias de *S. cerevisiae* contêm mRNAs maduros com longas porções de UTRs (54-954 bp) nas regiões 5' e 3', sendo esses sítios requeridos pelos ativadores, ocorrendo, assim, o processo de tradução (WIESENBERGER et al., 1995). A partir da interação entre o ativador de tradução com a região 5'-UTR do seu mRNA cliente, diversas funções tem sido descritas, como detalhado na Tabela 1.

Os ativadores de tradução podem facilitar a interação do mRNA com o mitorribossomo no processo de iniciação da tradução. Apesar do parentesco entre mitocôndrias e bactérias, os mRNAs maduros nas organelas não possuem a sequência Shine-Dalgarno para propiciar o início da tradução (MYASNIKOV et al., 2009). Assim, os ativadores de tradução mitocondrial compensam esta perda (GREEN-WILLMS et al., 1998).

De fato, quase todos os ativadores são proteínas integrais de membrana ou estão associados periféricamente à membrana interna mitocondrial. Estudos sugerem que em virtude dessa localização, essas proteínas podem recrutar mRNAs na membrana a partir das suas ligações na região 5'-UTR (MÖLLER-HERGT, 2018). Em razão desta interação com a membrana interna, foi demonstrado que os ativadores para os mRNAs de *COX1*, *COX2* e *COX3* organizam a montagem do complexo IV na membrana antes da tradução dessas subunidades que são codificadas pelo mtDNA, validando, assim, uma nova forma de regular a montagem dos complexos da cadeia respiratória (NAITHANI et al., 2003).

A estabilização de mRNA é outra funcionalidade desempenhada por essas proteínas. Um exemplo é o ativador de tradução denominado Cpb1p, que realiza a estabilização do mRNA de *COB* (CHEN; DIECKMANN, 1994). Contudo, muitos ativadores são necessários também para o acúmulo do seu mRNA alvo, como é o caso de Pet309p, um ativador para *COX1*. Pet309p possui um papel essencial na maturação do mRNA de *COX1*, realizando splicing em razão da presença de íntrons neste transcrito específico (MANTHEY; MCEWEN, 1995). Outro exemplo é o mRNA de *COX2*, que não contém íntrons e é desestabilizado na ausência do seu ativador de tradução, conhecido como Pet111p (POUTRE; FOX, 1987).

Limitar a taxa de tradução do seu mRNA alvo também é um papel dos ativadores (STEELE et al., 1996). Foi estabelecido que a disponibilidade dessas proteínas representa um ponto importante para a regulação gênica pós-transcrição nas mitocôndrias de leveduras. Estudos elucidaram que em casos onde há transição do metabolismo de fermentação para a respiração mitocondrial, os níveis de transcrição de mRNAs mitocondriais não são drasticamente mudados (COUVILLION et al., 2016). Isso implica que o conjunto de ativadores de tradução e a regulação gênica pós-transcrição parecem ser mais importantes para a respiração mitocondrial do que a ativação da transcrição dos mRNAs mitocondriais (MÖLLER-HERGT, 2018).

Tabela1. Funcionalidade de ativadores de tradução já descobertos (Adaptado de MÖLLER-HERGT, 2018)

| mRNA alvo | Ativador de tradução | Função |
|-------------|----------------------|--|
| <i>COX1</i> | Mss51 | Proteína periférica de membrana. Interage fisicamente com a 5'-UTR do mRNA de <i>COX1</i> . Modula a síntese de Cox1p através de um <i>loop</i> regulatório (BARRIENTOS et al., 2004; PEREZ-MARTINEZ et al., 2003). |
| | Pet309 | Proteína integral de membrana. Interage fisicamente com a 5'-UTR do mRNA de <i>COX1</i> . Contém domínios PPR, sendo necessários para a tradução de Cox1p (MANTHEY et al., 1998; ZAMUDIO-OCHOA et al., 2014; TAVARES-CARREÓN et al., 2008). |
| | Mam33 | Interage funcionalmente com a 5' ou 3'-UTR do mRNA de <i>COX1</i> , sendo necessário para a síntese de Cox1p (ROLOFF et al., 2015). |
| | Mss116 | Possui interação com Pet309p, sendo requerido na síntese de Cox1p. Também está envolvido em transcrição e splicing (DE SILVA et al., 2017). |
| <i>COX2</i> | Pet111 | Associado a membrana. Interage fisicamente com a 5'-UTR do mRNA de <i>COX2</i> . Contém domínios PPR e limita a síntese de Cox2p. Sua superexpressão inibe a tradução de Cox1p e estudos sugerem que isto ocorre devido a uma possível interação com ativadores de tradução de <i>COX1</i> (GREEN-WILLMS et al., 2001; POUTRE, FOX, 1987; MULERO, FOX, 1993; LIPINSKI et al., 2011; FIORI et al., 2005). |
| <i>COX3</i> | Pet54 | Proteína periférica de membrana. Interage com a 5'-UTR do mRNA de <i>COX3</i> . Ainda, interage fisicamente com Pet494 e Pet122 (MCMULLIN, FOX, 1993; COSTANZO, FOX, 1988; BROWN et al., 1994). |
| | Pet122 | Proteína integral de membrana interna. Interage com a 5'-UTR do mRNA de <i>COX3</i> . Possui interação também com mS26 (Pet123), uma proteína da SSU (MCMULLIN, FOX, 1993; COSTANZO, FOX, 1988; MCMULLIN et al., 1990). |
| | Pet494 | Proteína integral de membrana interna. Interage com a 5'-UTR do mRNA de <i>COX3</i> , limitando a síntese de Cox3p (MCMULLIN, FOX, 1993; COSTANZO, FOX, 1986; STEELE et al., 1996). |
| <i>COB</i> | Cbp1 | Proteína com domínios PPR que estabiliza o mRNA de <i>COB</i> através da sua interação com a região 5'-UTR (LIPINSKI et al., 2011; CHEN, DIECKMANN, 1994; MITTELMEIER, DIECKMANN, 1993). |
| | Cbs1 | Proteína integral de membrana interna. Interage com a 5'-UTR do mRNA de <i>COB</i> . Interage com mitorribossomos traduzindo ativamente (MICHAELIS et al., 1991; RÖDEL, 1986; RÖDEL et al., 1985; KRAUSE-BUCHHOLZ et al., 2005) |
| | Cbs2 | Proteína periférica de membrana. Interage com a 5'-UTR do mRNA de <i>COB</i> . Também possui interação com o mitorribossomo (MICHAELIS et al., 1991; RÖDEL, 1986; KRAUSE-BUCHHOLZ et al., 2004). |
| | Cbp3/Cbp6 | Possui associação com o túnel de saída do mitorribossomo e interage funcionalmente com a 5'-UTR do mRNA de <i>COB</i> . Liga-se também ao citocromo <i>b</i> recém-sintetizado para fazer regulação por feedback loop (GRUSHKE et al., 2011; GRUSHKE et al., 2012). |

| | | |
|---------------|--------------|--|
| <i>ATP8/6</i> | Aep3 | Proteína periférica de membrana. Realiza a estabilização do mRNA de <i>ATP8/6</i> (ELLIS et al., 2004). |
| | Smt1 | Reprime a tradução do mRNA de <i>ATP8/6</i> (RAK et al., 2016). |
| <i>ATP6</i> | Atp22 | Interage funcionalmente com a 5'-UTR do mRNA de <i>ATP6</i> (ZENG et al., 2007). |
| <i>ATP8</i> | Aep3 | Proteína com domínio PPR necessária para a expressão de <i>ATP8</i> . Além disso, é requerida para a iniciação da tradução dependente do fator mIF2 (BARROS, TZAGOLOFF, 2017; LEE et al., 2009). |
| <i>ATP9</i> | Aep1 Aep2 | Proteínas com domínios PPR. Necessárias para a expressão de <i>ATP9</i> e interação com seu mRNA (LIPINSKI et al., 2011; PAYNE et al., 1991; ZIAJA et al., 1993). |
| <i>VAR1</i> | Sov1 | Proteína com domínio PPR. Possui interação funcional com a 5'-UTR do mRNA de <i>VAR1</i> . Além de sua função na tradução mitocondrial, pertence ao grupo de proteínas que prolongam a vida útil quando está ausente na levedura (LIPINSKI et al., 2011; HERRMANN et al., 2013; CABALLERO et al., 2011). |

Recentemente, a descoberta da coordenação da expressão gênica nuclear e mitocondrial para organizar a montagem dos complexos da cadeia respiratória vem sendo um aspecto associado aos ativadores de tradução. Um exemplo para esse papel é atribuído a um dos ativadores de *COX1*, o Mss51p (DECOSTER et al., 1990) (Figura 3).

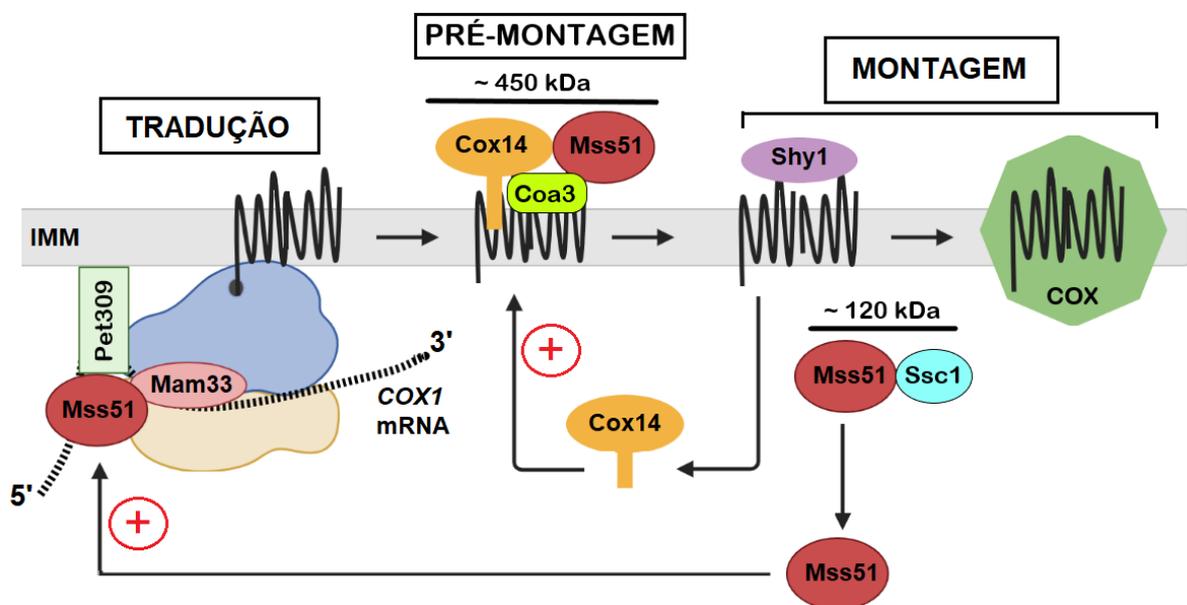


Figura 3. Regulação da síntese da subunidade 1 da citocromo c oxidase (Cox1). Para a tradução do mRNA de *COX1*, são necessários os seguintes ativadores de tradução: Pet309p, Mss51p e Mam33p. Após a síntese, Cox1p sai do túbulo de saída na subunidade maior do mitorribossomo (LSU) para a membrana interna mitocondrial (IMM), fazendo parte de um complexo intermediário de pré-montagem de COX. Esse complexo possui, além de Cox1p e subunidades nucleares, o ativador de tradução Mss51p e dois fatores de montagem denominados Cox14p e Coa3p. A proteína Cox14p sequestra Mss51p, não havendo, portanto, ativação da tradução de *COX1*. Mss51p é liberado do complexo de pré-montagem e interage com a chaperona Ssc1p (Hsp70) e, posteriormente, estimula mais rodadas de tradução de *COX1*.

Em razão da ação coordenada de dois genomas distintos para a biogênese da citocromo *c* oxidase (COX) ou complexo IV, a enzima terminal da cadeia respiratória, a funcionalidade de Mss51p foi denominada como um “*feedback loop*”, pois é um ativador necessário para a tradução e montagem de Cox1p no complexo IV (PEREZ-MARTINEZ et al., 2003). Inicialmente, Mss51p ajuda Pet309p a interagir com o mRNA de *COX1* (ZAMUDIO-OCHOA et al., 2014), além de interagir também com outro ativador conhecido como Mam33p (ROLOF; HENRY, 2015). Pet309p, Mam33p e Mss51p são capazes de se ligar ao mitorribossomo nesse início de tradução. Ainda, Mss51p promove uma segunda etapa da tradução do mRNA de *COX1*, o alongamento (PEREZ-MARTINEZ et al., 2003).

Posteriormente, Mss51p se liga ao Cox1p recém-produzido (PEREZ-MARTINEZ et al., 2003) e permanece ligado até que haja a formação de um dado intermediário do módulo de montagem de COX. Foi demonstrado em estudos anteriores que a formação deste intermediário de montagem depende também da presença de outras subunidades nucleares do complexo IV, sendo essas importadas do citosol para as mitocôndrias. Enquanto não há a finalização da formação do intermediário de montagem, Mss51p não está disponível para induzir novas rodadas de tradução do mRNA de *COX1* (BARRIENTOS et al., 2004).

O sequestro de Mss51p nesse processo é dependente de dois fatores de montagem para a enzima COX: Coa3p e Cox14p (MICK et al., 2010). Muitos estudos demonstraram que situações de baixos níveis de tradução do mRNA de *COX1* podem ser revertidas quando há deleção do gene *COX14*, acarretando, assim, no aumento da disponibilidade de Mss51p para ativação da tradução de *COX1* (BARRIENTOS et al., 2004). Assim, este tipo de regulação através dos ativadores de tradução representa uma maneira eficiente de coordenar a expressão gênica mitocondrial e nuclear durante a tradução e montagem das subunidades na cadeia respiratória (OTT et al., 2016).

Em mamíferos, os mRNAs mitocondriais são divergentes com os das leveduras. Devido a presença de longas caudas poli A e a ausência das longas 5'-UTRs, poucas proteínas homólogas a ativadores de tradução foram encontradas nessas espécies (CHRISTIAN; SPREMULLI, 2012). Por exemplo, a proteína LRPPRC (*Leucine-Rich PPR motif-Containing*) foi descoberta como um homólogo distante de Pet309 e mutações em seus sítios específicos resultam na síndrome de Leigh já mencionada, sendo essa caracterizada pela deficiência do complexo IV (MOOTHA et al., 2003). Ainda, LRPPRC não tem um mRNA específico para atuação como é o caso dos ativadores de tradução e, também, está associado com estabilidade de mRNAs, poliadenilação (RUZZENENTE et al., 2012) e tradução (SASARMAN et al., 2010).

A proteína TACO1 (*Translational Activator of COXI*) foi proposta para ser um ativador de tradução de *COXI* em humanos (WERAARPACHAI et al., 2009). Ao contrário da proteína LRPPRC, TACO1 parece agir especificamente com o mRNA de *COXI* e, ainda, não foi encontrada em mitocôndrias de leveduras. Atualmente, não é bem compreendido como TACO1 modula a síntese de Cox1p em humanos (OTT et al., 2016).

1.5 A descoberta do complexo MIOREX

A evolução das mitocôndrias de leveduras e mamíferos percorreu caminhos divergentes em determinados aspectos, tendo em vista as características dos genomas, mRNAs e estruturas ribossomais. Embora algumas proteínas semelhantes a ativadores de tradução já tenham sido encontradas em humanos, a tradução mitocondrial é orquestrada de forma diferente nos dois sistemas (MÖLLER-HERGT, 2018).

Nos últimos anos, estudos mitocondriais em humanos e *S. cerevisiae* mostraram a existência de *foci* (grânulos) de RNAs com certa semelhança ao nucléolo, havendo a proposição da existência de uma espécie de *mitochondriolus* (BARRIENTOS, 2015) que organiza a biogênese de mitorribossomos. Análises de espectrometria de massas revelaram que o ribossomo mitocondrial está associado a diversos fatores proteicos envolvidos em várias etapas da expressão gênica pós-transcrição. Assim, foi compreendido que os mitorribossomos formam grupos distintos com diversas proteínas, no qual foi denominado de complexo MIOREX (*Mitochondrial Organization of Gene Expression*). Entre a variedade de proteínas agrupadas nesse sistema de tradução estão os ativadores de tradução, proteínas responsáveis por processamento de RNA e metabolismo de mtDNA, e proteínas com funções desconhecidas nomeadas de Mrx (KEHREIN et al., 2015).

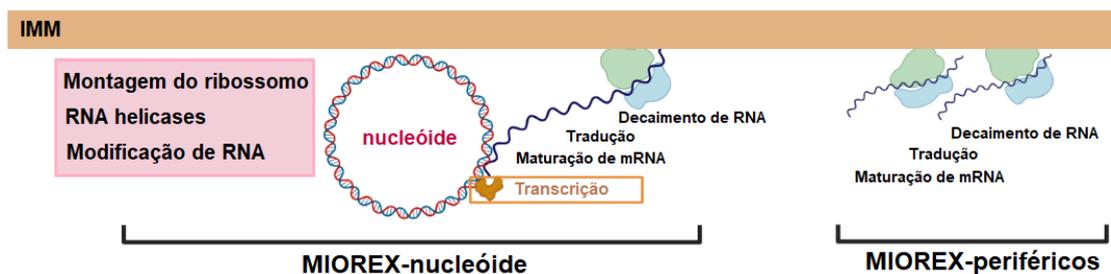


Figura 4. Distribuição do complexo MIOREX na rede mitocondrial. O complexo MIOREX-nucleóide abrange o nucleóide mitocondrial e o mitorribossomo, juntamente com proteínas necessárias para transcrição, maturação de mRNA, tradução e decaimento de RNA. O complexo MIOREX-periférico abrange o mitorribossomo e proteínas necessárias para maturação de mRNA, tradução e decaimento de RNA. IMM, membrana interna mitocondrial (Fonte: adaptado de KEHREIN et al., 2015).

Através de técnicas de microscopia de alta resolução, foi revelado que a maioria dos complexos MIOREX está distribuída uniformemente por toda a rede mitocondrial, onde uma

pequena parcela está localizada próxima ao nucleóide mitocondrial (“MIOREX- nucleóide”), abrangendo todo o espectro da expressão gênica da organela. Essa organização pode ter se desenvolvido para tornar a expressão gênica um processo rápido e eficiente. Estabelece-se, também, a hipótese de haver complexos “MIOREX-periféricos” que podem colaborar na coordenação entre a tradução e a montagem dos componentes da cadeia respiratória (Figura 4) (KEHREIN et al., 2015).

A organização em *foci* de RNAs, ou MIOREX, permite que os mRNAs mitocondriais não se distribuam livremente pela matriz mitocondrial para encontrar um ribossomo competente para a tradução. De modo contrário, a maturação e tradução de mRNAs realiza-se de modo canalizado nos complexos MIOREX, tornando, assim, as reações bioquímicas em processos mais eficientes (KEHREIN et al., 2015).

Diversas proteínas descritas fazem parte do complexo MIOREX em leveduras, sendo nomeadas de Mrx1p, Mrx2p, Mrx3p... Mrx17p. Algumas delas foram caracterizadas em estudos posteriores que serão sumarizados a seguir.

Os estudos com Mrx2p mostraram que a proteína mitocondrial é um componente com função já descrita na literatura, denominada anteriormente como Coq11p. Mrx2p é necessário para a biossíntese da Coenzima Q (CoQ), sendo essa última uma molécula lipídica essencial que transfere elétrons do complexo I e II para o complexo III da fosforilação oxidativa. Localizada na membrana interna mitocondrial e também em outras membranas da levedura, CoQ atua como antioxidante, sendo comumente relacionada aos processos de envelhecimento. Até o momento, não se sabe como Mrx2p/Coq11p atuaria em etapas da regulação da expressão gênica mitocondrial, mas é possível que esta proteína assuma um papel regulatório que combine a síntese proteica mitocondrial com a síntese de CoQ (Figura 5) (ALLAN et al., 2015; BRADLEY et al., 2020).

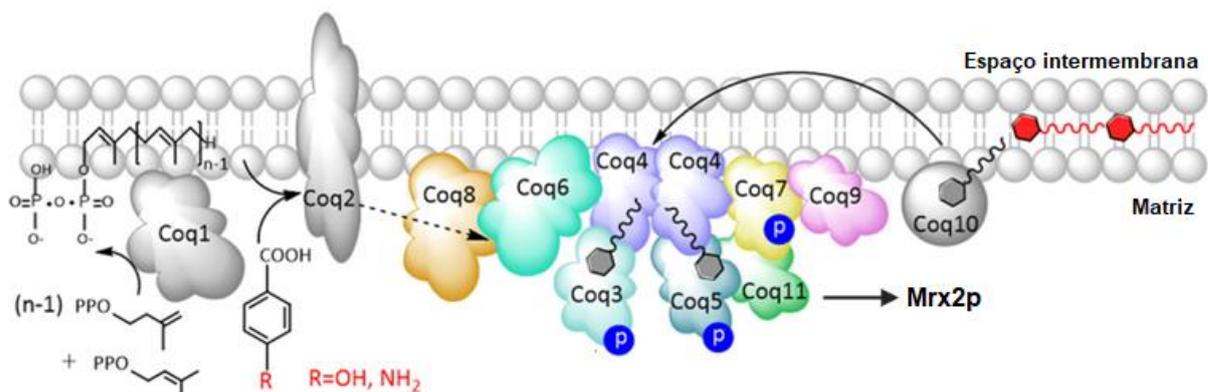


Figura 5. Mrx2p (Coq11p) participa na biossíntese de Coenzima Q. Em *S. cerevisiae*, a biossíntese de Coenzima Q é realizada através de um complexo multi-enzimático, ocorrendo exclusivamente nas mitocôndrias. As proteínas Coq1p-Coq11p são codificadas pelo genoma nuclear e estão inseridas na face da matriz da

membrana interna mitocondrial. A ausência de um único polipeptídeo Coq do complexo causa uma diminuição drástica dos níveis de algumas proteínas Coq e da Coenzima Q (Fonte: adaptado de ALLAN et al., 2015).

Já Mrx5p foi também nomeado como Smt1p (*Suppression of Mitochondrial Translation 1*), sendo o primeiro componente do proteoma mitocondrial descoberto como um repressor da tradução, agindo diretamente sobre o mRNA bicistrônico de *ATP8/ATP6* (RAK et al., 2016). O complexo V (ATP sintase) é responsável pela produção de ATP na etapa final da fosforilação oxidativa, sendo composto por duas porções: F₁ e F₀ (KAGAWA; RACKER, 1966). Na ausência da porção F₁, o mRNA de *ATP8/6* é sequestrado por Mrx5p/Smt1p na membrana interna. Essa ligação impede a interação deste mRNA com seu ativador de tradução, o Atp22p. Assim, a presença da porção F₁ da ATP sintase foi sugerida para enfraquecer a ligação entre Mrx5p e o mRNA, disponibilizando este último para Atp22p (Figura 6) (RAK et al., 2016).

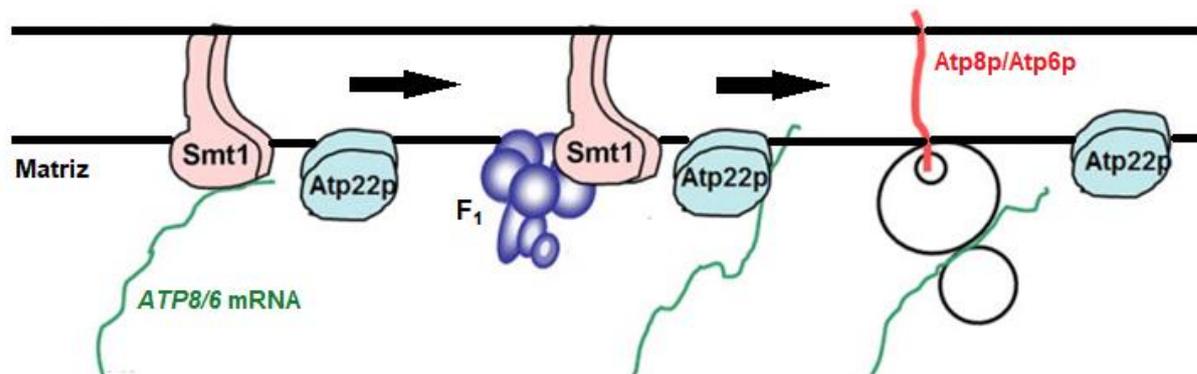


Figura 6. Mrx5p (Smt1p) reprime a tradução do mRNA de *ATP8/6*. Na ausência da porção F₁ da ATP sintase, o mRNA de *ATP8/6* está associado com Mrx5p. Ao estar ligado a essa proteína repressora, o mRNA está impedido de interagir com seu ativador de tradução, o Atp22p. A presença de F₁ enfraquece esta ligação, liberando o transcrito para interagir com Atp22p, havendo, posteriormente, tradução pelos mitorribossomos (Fonte: adaptado de RAK et al., 2016).

Mrx6p foi visualizado no MIOREX-nucleóide, regulando o número de cópias do mtDNA. Todavia, essa função é realizada quando Mrx6p está associado a um complexo juntamente com o ativador de tradução Mam33p, uma protease conservada denominada Pim1p e uma proteína que regula a estabilidade do genoma mitocondrial conhecida como Pet20p (Figura 7A). A presença de Pet20p é dispensável no complexo para o controle da quantidade de mtDNA (Figura 7B). A presença de Mrx6p facilita o reconhecimento de Pim1p ao seu substrato, ocasionando na degradação de fatores de replicação (RF) responsáveis por estimular a replicação do genoma mitocondrial (GÖKE et al., 2019).

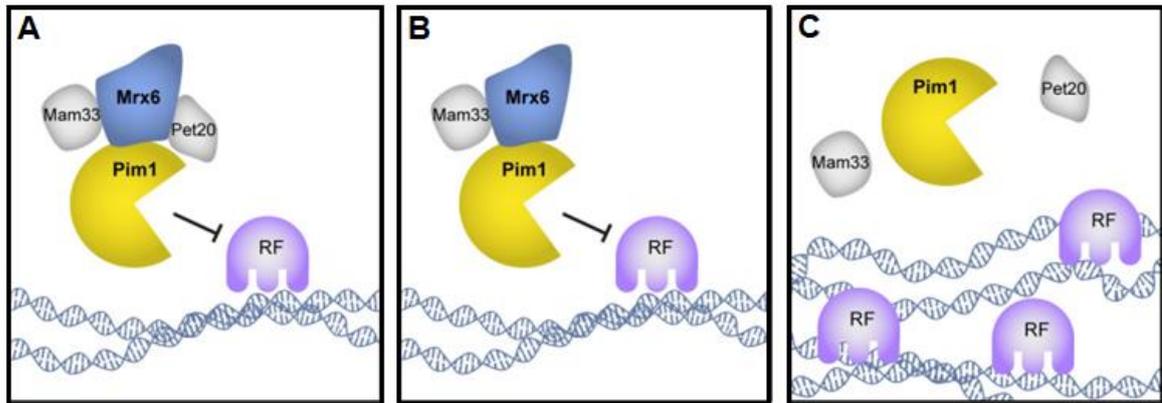


Figura 7. Modelo da participação de Mrx6p no complexo de replicação do mtDNA. A) O complexo com Mrx6p, contendo Mam33p/Pim1p/Pet20p, localiza-se preferencialmente com o mtDNA. Os componentes “soltos” deste complexo são encontrados na rede mitocondrial distante do mtDNA. B) Mrx6p é essencial para facilitar a interação de Pim1p com outros fatores que regulam a quantidade de mtDNA, sendo Pet20p um componente dispensável neste complexo. C) A ausência de Mrx6p desestabiliza a interação de Pim1p com os fatores de replicação (RF), havendo, portanto, aumento nos níveis de mtDNA (Fonte: adaptado de GÖKE et al., 2019).

A proteína Mrx15p foi outro componente do complexo MIOREX com função estudada. Em leveduras, a inserção das subunidades proteicas na membrana interna mitocondrial é mediada pelos fatores: Oxa1p e Mba1p (OTT et al., 2006). Mrx15p, juntamente com Mba1p, mostrou ser um receptor para os mitorribossomos na membrana interna, interagindo diretamente com a LSU e proteínas recém-sintetizadas. Ainda, experimentos com duplos mutantes $\Delta mrx15\Delta mba1$ demonstraram um fenótipo de deficiência da atividade do complexo IV e falha na incorporação de subunidades na cadeia respiratória, em virtude da perda do ancoramento do mitorribossomo na membrana interna (Figura 8) (MÖLLER-HERGT et al., 2018).



Figura 8. Mrx15p e Mba1p são receptores para o mitorribossomo na membrana interna mitocondrial. Nas leveduras, Oxa1p realiza inserção de subunidades nucleares e mitocondriais da cadeia respiratória na membrana interna, possuindo, ainda, interação com o mitorribossomo. Mba1p, também auxilia a incorporação das subunidades nas membranas e funciona como receptor para o mitorribossomo. Mrx15p foi recentemente descrito também como um fator necessário para o ancoramento do mitorribossomo. Mutantes para os genes *MRX15* e *MBA1* não possuem o mitorribossomo aderido na membrana interna, ocasionando déficit nas inserções de subunidades mitocondriais e deficiência respiratória (Fonte: adaptado de MÖLLER-HERGT et al., 2018).

Mrx8p foi a última proteína do grupo Mrx com função estudada, sendo necessário para a iniciação e alongamento da tradução do mRNA de *COX1* em temperaturas de crescimento abaixo do ideal, à 16°C. Além de regular a síntese de Cox1p em estresse frio, Mrx8p foi caracterizado também como uma GTPase da família YihA, esta última em bactérias regula a biogênese e estabilidade da LSU do ribossomo. Curiosamente, Mrx8p possui um ortólogo em humanos denominado GTPBP8 (VERMA et al., 2021).

Conforme explicado, o conjunto de proteínas Mrx importadas para as mitocôndrias se localizam juntamente com o complexo MIOREX, onde a maioria executa papéis relacionados à regulação de síntese proteica (KEHREIN et al., 2015). Entretanto, muitos fatores Mrx ainda possuem funções desconhecidas associadas à maquinaria de tradução mitocondrial.

A partir de informações sobre genes do complexo MIOREX obtidas através do banco de dados de *S. cerevisiae* (SGD) (www.yeastgenome.org), foram realizados experimentos prévios para avaliar o perfil de tradução mitocondrial de linhagens super-expressando fatores Mrx não caracterizados, a fim de gerar fenótipos tóxicos que reprimam a síntese proteica de transcritos mitocondriais. Isso será explicado com maiores detalhes na seção de Resultados deste trabalho. Essa estratégia permitiu identificar o componente Mrx9p como um fator relacionado à síntese de Cox1p, cujo seu excesso reduz a tradução de Cox1p e resulta numa versão defeituosa deste polipeptídeo do complexo IV na cadeia respiratória.

Portanto, este trabalho apresenta como proposta estudar o produto gênico *MRX9*, compreendendo, assim, sua funcionalidade no complexo MIOREX e na tradução mitocondrial. A elucidação do papel do proteoma mitocondrial em leveduras vem sendo realizado por diversos grupos de pesquisas, buscando caracterizar proteínas envolvidas na expressão gênica em nível de tradução.

2 OBJETIVOS

Identificar a função de fatores Mrx que possam estar envolvidos no processo de tradução mitocondrial em *Saccharomyces cerevisiae*.

2.1 Objetivos específicos

- Construção de linhagens super-expressando genes *MRX* e identificar as que possuem déficit na tradução de produtos mitocondriais;
- Caracterização dos fenótipos decorrentes da super-expressão de *MRX9*;
- Construção de um alelo nulo $\Delta mrx9$ e estudo fenotípico;
- Localização intramitocondrial de Mrx9p;
- Propriedades de sedimentação de Mrx9p em relação às subunidades do mitorribossomo e possíveis parceiros funcionais.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Linhagens utilizadas

As linhagens utilizadas de *S. cerevisiae* e *E. coli* estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Linhagens utilizadas

| Linhagens <i>E. coli</i> | Genótipo | Referência |
|-------------------------------------|---|---|
| RR1 | (Δ (<i>gpt-proA</i>)62, <i>leuB6</i> , <i>thi-1</i> , <i>lacY1</i> , <i>hsdB20</i> , <i>rpsL20</i> (<i>Strr</i>), <i>ara-14</i> , <i>galK2</i> , <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>supE44</i> , <i>mcrBB</i>) | HANAHAN, 1983 |
| Linhagens <i>S. cerevisiae</i> | Genótipo | Referência |
| W303-1B | MAT α <i>ade2-1 trp1-1 his3-1,15 leu2-3,112 ura3-1</i> | Rothstein, R. Columbia University |
| W303-I ^o | MAT α <i>ade2-1 trp1-1 his3-1,15 leu2-3,112 ura3-1 intronless $\rho+$ mtDNA</i> | BARROS et al., 2006 |
| MR6-I ^o | MAT α <i>ade2-1 trp1-1 his3-1,15 leu2-3,112 ura3-1 arg8:: HIS3 intronless $\rho+$ mtDNA</i> | RAK; TZAGOLOFF, 2009 |
| W303/GAL10MRX1 | MAT α <i>ade2-1 trp1-1 his3-1,15 leu2-3,112 ura3-1, LEU2, GAL10/MRX1</i> | Este laboratório |
| W303/GAL10MRX3 | MAT α <i>ade2-1 trp1-1 his3-1,15 leu2-3,112 ura3-1, LEU2, GAL10/MRX3</i> | Este laboratório |
| W303/GAL10MRX4 | MAT α <i>ade2-1 trp1-1 his3-1,15 leu2-3,112 ura3-1, LEU2, GAL10/MRX4</i> | Este laboratório |
| W303/GAL10MRX5 | MAT α <i>ade2-1 trp1-1 his3-1,15 leu2-3,112 ura3-1, LEU2, GAL10/MRX5</i> | Este laboratório |
| W303/GAL10MRX6 | MAT α <i>ade2-1 trp1-1 his3-1,15 leu2-3,112 ura3-1, LEU2, GAL10/MRX6</i> | Este laboratório |
| W303/GAL10MRX9 | MAT α <i>ade2-1 trp1-1 his3-1,15 leu2-3,112 ura3-1, LEU2, GAL10/MRX9</i> | Este trabalho |
| W303/GAL10MRX11 | MAT α <i>ade2-1 trp1-1 his3-1,15 leu2-3,112 ura3-1, LEU2, GAL10/MRX11</i> | Este laboratório |
| W303/GAL10MRX12 | MAT α <i>ade2-1 trp1-1 his3-1,15 leu2-3,112 ura3-1, LEU2, GAL10/MRX12</i> | Este laboratório |
| W303/GAL10MRX13 | MAT α <i>ade2-1 trp1-1 his3-1,15 leu2-3,112 ura3-1, LEU2, GAL10/MRX13</i> | Este laboratório |
| W303 Δ <i>mrx9</i> | MAT α <i>ade2-1 trp1-1 his3-1,15 leu2-3,112 ura3-1, mrx9::HIS3</i> | Este trabalho |
| W303/GAL10MRX9-HA | MAT α <i>ade2-1 trp1-1 his3-1,15 leu2-3,112 ura3-1, LEU2, GAL10/MRX9-HA</i> | Este trabalho |
| W303/TEF1MRX9-HA | MAT α <i>ade2-1 trp1-1 his3-1,15 leu2-3,112 ura3-1, LEU2, TEF1/MRX9-HA</i> | Este trabalho |
| W303/GPDMRX9-HA | MAT α <i>ade2-1 trp1-1 his3-1,15 leu2-3,112 ura3-1, LEU2, GPD/MRX9-HA</i> | Este trabalho |
| W303/ADH1MRX9-HA | MAT α <i>ade2-1 trp1-1 his3-1,15 leu2-3,112 ura3-1, URA3, ADH1/MRX9-HA</i> | Este trabalho |
| W303/MRX9-HA | MAT α <i>ade2-1 trp1-1 his3-1,15 leu2-3,112 ura3-1, URA3, MRX9-HA</i> | Este trabalho |
| W303-I ^o /GPDMRX9 | MAT α <i>ade2-1 trp1-1 his3-1,15 leu2-3,112 ura3-1, TRP1, GPD/MRX9 intronless $\rho+$ mtDNA</i> | Este trabalho |
| MR6-I ^o /GPDMRX9 | MAT α <i>ade2-1 trp1-1 his3-1,15 leu2-3,112 ura3-1 TRP1, arg8:: HIS3 GPD/MRX9 intronless $\rho+$ mtDNA</i> | Este trabalho |
| W303/COX24-HA | MAT α <i>ade2-1 trp1-1 his3-1,15 leu2-3,112 ura3-1 URA3, COX24-HA</i> | BARROS et al., 2006 |
| W303/GAL10MRX9/COX24-HA | MAT α <i>ade2-1 trp1-1 his3-1,15 leu2-3,112 ura3-1 LEU2, URA3, COX24-HA, GAL10/MRX9</i> | Este trabalho |
| W303 Δ <i>mrx9</i> /COX24-HA | MAT α <i>ade2-1 trp1-1 his3-1,15 leu2-3,112 ura3-1, mrx9::HIS3, URA3, COX24-HA</i> | Este trabalho |

3.2 Meios de cultura

Tabela 3. Meios de cultura utilizados

| Meios de cultura | Composição |
|------------------|--|
| YPD | 1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% glicose |
| YPEG | 1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% glicerol, 2% etanol |
| YPGAL | 1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% galactose |
| WO | 0,67% bases nitrogenadas para leveduras, 2% glicose, sem aminoácidos |
| WO-GAL | 0,67% bases nitrogenadas para leveduras, 2% galactose |
| KAC | 0,5% extrato de levedura, 1% acetato de potássio, 0,05% glicose |
| LB | 1% triptona, 0,5% extrato de levedura, 0,5% NaCl, 0,1% glicose |
| LA | LB + ampicilina 200µg/ml |

Para o cultivo de leveduras sem a necessidade de seleção foi utilizado o meio rico YPD. Por ser não fermentável, o meio rico contendo etanol-glicerol como fonte de carbono (YPEG) foi utilizado para avaliação da capacidade respiratória mitocondrial de leveduras. O meio rico YPGal foi utilizado para a cultura de leveduras em experimentos de isolamentos de mitocôndrias, e análise de produtos mitocondriais recém sintetizados. Para a seleção de linhagens de acordo com suas auxotrofias, foi utilizado o meio mínimo WO. O meio WO-GAL foi usado para seleção de transformantes contendo plasmídeos cuja expressão é regulada pelo promotor *GAL10*. O meio KAC foi utilizado para propiciar esporulação de leveduras. Para induzir o crescimento de bactérias foi utilizado o meio LB (Luria-Bertani). Por fim, quando necessário a seleção plasmidial para ampicilina foi utilizado o meio LA. A composição dos meios de cultura utilizados está descrita na Tabela 3 acima.

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

- Reações de polimerase em cadeia (PCR), ligações entre moléculas de DNA (presença de DNA ligase), eletroforese e recuperação de DNA em gel por eletroeluição (SAMBROOK et al., 1989).
- Preparação de bactérias competentes pelo método de CaCl_2 e transformação de *E. coli* com DNA exógeno (SAMBROOK et al., 1989).
- Transformação de *S. cerevisiae* pelo método LiAc (ANDREWS et al., 2016).
- Mini preparação de DNA plasmidial (BIMBOIM; DOLY, 1979).
- Mini preparação de DNA plasmidial utilizando o conjunto de reagentes *Pure Yield™ Mini-Prep system* da Promega.
- Mini preparação de DNA total de *S. cerevisiae* (ANDREWS et al., 2016).

- Preparação de DNA plasmidial em média escala por lise com Triton X-100 (AUSUBEL et al., 1989).

3.4 Desenho de Primers

Todas as informações sobre genes e proteínas de *S. cerevisiae* foram obtidas no banco de dados SGD (www.yeastgenome.org). Os iniciadores foram utilizados para amplificar fragmentos gênicos de interesse. A Tabela 4 ilustra os primers utilizados, juntamente com suas sequências (5'→3') e finalidade do uso.

Tabela 4. Primers utilizados

| Primer | Sequência (5' > 3') | Finalidade |
|----------|--|--|
| MRX1-1 | GGCGGATCCATGGGTCTAAAAATTACAAAAGG | Clonagem da ORF <i>YER077C</i> (<i>MRX1</i>) no vetor YIp351-GAL |
| MRX1-2 | GGCCTGCAGTCATTTATCGTCATCGTCTTTATAATCAA | |
| MRX3-1 | GGCGGATCCATGTCCAGAACTATTCCATTTTC | Clonagem da ORF <i>YBL095W</i> (<i>MRX3</i>) no vetor YIp351-GAL |
| MRX3-3 | GGCGGATCCATGTCCAGAACTATTCCATTTTC | |
| MRX4-1 | GGCGGATCCATGACAGTTTTATACACATCTGCATCG | Clonagem da ORF <i>YPL168W</i> (<i>MRX4</i>) no vetor YIp351-GAL |
| MRX4-3 | GGCCTGCAGTGCAGGACGTGCAGTTA | |
| MRX5-1 | GGCGGATCCATGAGGAGGACTTTTTTCTC | Clonagem da ORF <i>YJL147C</i> (<i>MRX5</i>) no vetor YIp351-GAL |
| SMT1-R | GGCGGATCCGTTACATCACGACGATG | |
| MRX9-1 | GGCGGATCCATGTTCAAAGTTCCAGTGGG | Clonagem da ORF <i>YDL027C</i> (<i>MRX9</i>) no vetor YIp351-GAL |
| MRX9-2 | GGCGGATCCTATTCAGACTTCAGTGGGC | Clonagem da ORF <i>YDL027C</i> (<i>MRX9</i>) nos vetores YIp351-GAL e pUC18 |
| MRX11-10 | GGCGGATCCATGACTGTCATGAATCTT | Clonagem da ORF <i>YPL041C</i> (<i>MRX11</i>) no vetor YIp351-GAL |
| MRX11-11 | GGCGGATCCATGACTGTCATGAATCTT | |
| MRX12-2 | GGCGGATCCATGAAAGAGTTCGATGAGAGC | Clonagem da ORF <i>YJR003C</i> (<i>MRX12</i>) no vetor YIp351-GAL |
| MRX12-4 | GGCCTGCAGGGTGAAAAGAAAGATGTTTCCGG | |
| MRX13-1 | GGCGGATCCATGATGACCAAAGCTTTT | Clonagem da ORF <i>YLR253W</i> (<i>MRX13</i>) no vetor YIp351-GAL |
| MRX13-2 | GGGCCTGCAGACGCTAACGATTTAAGATGAC | |
| MRX9-F0 | GGCAGTCGACGACCAAGCAACACGGGAATA | Clonagem da ORF <i>YDL027C</i> (<i>MRX9</i>) nos vetores pUC18 e YIp352, utilizado, respectivamente, com os iniciadores MRX9-2 e MRX9-HA |
| MRX9-HA | GGCGGATCCTCAAGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGG | Adição do <i>tag</i> na porção C-terminal da ORF <i>YDL027C</i> (<i>MRX9</i>), utilizado com os iniciadores MRX9-1 e MRX9-F0 |
| MRX9-D1 | GGCTGATCACTCATATGTGGTTATGGTGG | Construção do alelo mutante <i>mrx9</i> (explicação detalhada no item 3.5) |
| MRX9-D2 | GGCTGATCAGAGCATTACTGTGATGCCAC | |

| | | |
|----------|--------------------------------------|---|
| MRX9-F02 | GGCGT <u>CGACCCTT</u> ATTTGGCTCCTGAG | Construção do alelo mutante <i>mrx9</i> (explicação detalhada no item 3.5) |
| HIS3-11 | GGGATTGCTCTCGGTCAAGCTT | Diagnóstico do alelo mutante <i>mrx9</i> (explicação detalhada no item 3.5) |

*As regiões sublinhadas referem-se aos sítios de restrição

3.5 Clonagem dos genes *MRX* e construção do mutante $\Delta mrx9$

Os pares de primers indicados na Tabela 4 foram utilizados na amplificação por PCR, havendo, assim, clonagem dos genes *MRX* no plasmídeo integrativo YIp351-*GAL10* que contém o promotor forte induzível *GAL10* (BARROS et al., 2002).

Para a construção do alelo nulo *mrx9* foram utilizados os iniciadores MRX9-F0 e MRX9-2. Após a amplificação, o fragmento contendo o gene *MRX9* de aproximadamente 2021 pb foi digerido com as enzimas de restrição *Bam-HI* e *Sal-I* e ligado ao vetor pUC18 digerido com as mesmas enzimas, gerando o vetor recombinante pUC18/*MRX9*. O plasmídeo recombinante pUC18/*MRX9* foi utilizado como DNA molde em nova reação de PCR com os primers MRX9-D1 e MRX9-D2 que anelam de forma bidirecional oposta. O produto de PCR, contendo somente as sequências flanqueadoras de *MRX9*, foi ligado gerando o vetor recombinante pUC18/*MRX9-D1D2* (Figura 9A). Este vetor foi digerido com a enzima *Bcl-I* e ligado ao gene *HIS3*, sendo este último obtido a partir de digestão com *Bam-HI* do vetor pUC18-*HIS3* (TZAGOLOFF, Columbia University).

O plasmídeo recombinante pUC18-*mrx9::HIS3* foi utilizado como DNA molde em uma reação de PCR com os iniciadores MRX9-F0 e MRX9-2. O alelo *mrx9::HIS3* foi amplificado e utilizado para transformar e substituir o alelo *MRX9* selvagem na linhagem W303-1B de *S. cerevisiae* (Figura 9B). A fim de confirmar a inserção correta do alelo *mrx9::HIS3* na levedura, o DNA total das colônias transformantes foi isolado (ANDREWS et al., 2016) e utilizado como molde em reações de PCR diagnóstico com os pares de iniciadores MRX9-F02/MRX9-D1 e MRX9-F02/HIS3-11.

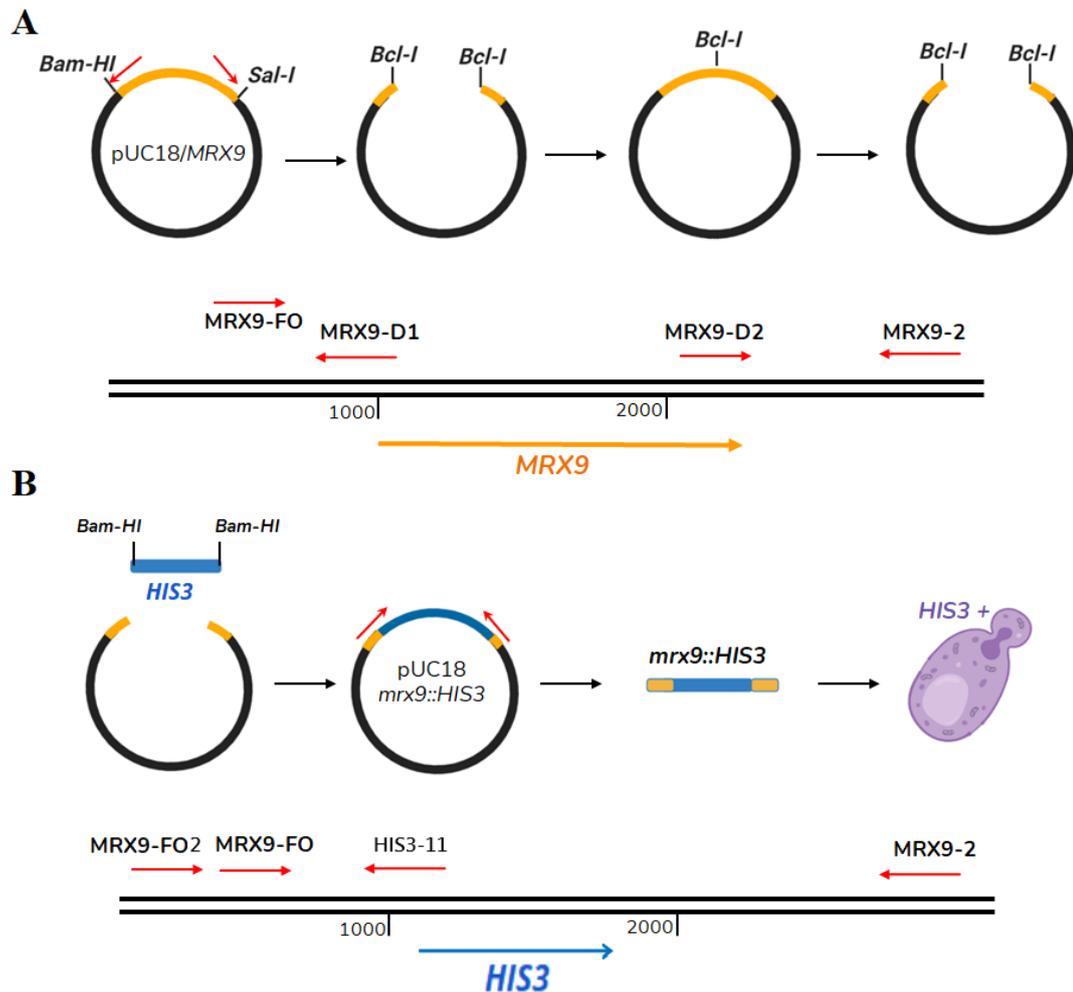


Figura 9. Obtenção do alelo nulo *mrx9* em *S. cerevisiae*. **A)** Clonagem do gene *MRX9* no plasmídeo pUC18 e, posteriormente, reações de PCR para amplificar o plasmídeo contendo as sequências flanqueadoras do gene. **B)** Inserção do fragmento *HIS3* no plasmídeo e reações de PCR para amplificar o fragmento *mrx9::HIS3*, havendo, por fim, transformação de levedura.

3.6 Construção de ORFs fusionadas com epítomos

Para a inserção do *tag* de Hemaglutinina A (HA) na porção C-terminal do alelo *MRX9* foi necessário realizar reações de PCR com os pares de iniciadores MRX9-1/MRX9-HA e MRX9-F0/MRX9-HA. O uso do iniciador MRX9-F0 mantém a sequência do promotor endógeno do gene. Nessa amplificação, o fragmento gerado de 1718 pb foi digerido com *Bam*-HI e *Sal*-I e ligado ao vetor integrativo YIp352 (HILL et al., 1985), também cortado com as mesmas enzimas. O plasmídeo recombinante YIp352/MRX9-HA foi linearizado com a enzima *Nco*-I no gene de seleção *URA3* e utilizado na transformação da linhagem de levedura W303-1B.

Já com os primers MRX9-1/MRX9-HA, o produto de PCR resultante de 1298 pb foi digerido com *Bam*-HI e ligado nos vetores integrativos YIp351-GAL10 (BARROS et al., 2002), YIp352-ADH1, YIp351-GPD e YIp351-TEF1 (ZAMPOL et al., 2010). Os vetores

recombinantes foram linearizados com enzimas de sítio único no gene de seleção *URA3* ou *LEU2* (*Nco-I* ou *Bste-II*) e utilizados para transformar a linhagem de levedura W303-1B (ANDREWS et al., 2016).

3.7 Ensaio de crescimento com diluição seriada

As linhagens foram cultivadas em meio rico (YPD ou YPGal) a fim de avaliar a capacidade de crescimento. O ensaio foi realizado plaqueando-se 3 μ L de suspensão celular com valores de absorbância (600nm) 0,0001; 0,001; 0,01; 0,1; 1, de forma sequencial em meio YPD, YPGal e meio seletivo para respiração (YPEG).

3.8 Obtenção de linhagens por cruzamento

As linhagens *GAL10/MRX9* e Δ *mrx9* contendo a proteína Cox24p fusionada com o tag HA na porção C-terminal foram obtidas a partir de cruzamento das leveduras haplóides. Desta forma, cruzou-se a linhagem mutante *mrx9::HIS3* (MAT α) com a linhagem selvagem do tipo sexual oposto W303/*COX24*-HA (MATa) e a linhagem *GAL10/MRX9* (MAT α) com a linhagem selvagem do tipo sexual oposto W303/*COX24*-HA (MATa). Foi realizado a seleção de diplóides e, posteriormente, a indução da esporulação em meio KAC. Os produtos da esporulação, isto é, células haplóides, foram dissecados em meio YPD através de micromanipulação. Por fim, as linhagens resultantes foram identificadas pelas marcas genéticas em meio mínimo seletivo: *GAL10/MRX9-COX24*-HA (*LEU2/URA3*) e Δ *mrx9-COX24*-HA (*HIS3/URA3*).

3.9 Análise de proteínas mitocondriais recém-sintetizadas

Em células de leveduras previamente tratadas com cicloheximida, os polipeptídeos mitocondriais recém-sintetizados foram marcados *in vivo* com uma mistura de aminoácidos radioativos metionina/cisteína [³⁵S] (HERRMANN et al., 1994).

Para realização deste protocolo, os inóculos de diferentes linhagens foram cultivados em meio rico com galactose (YPGal) por 16 horas. Em seguida, as células foram centrifugadas e lavadas com meio mínimo contendo galactose (WO-GAL) como fonte de carbono, e cultivadas nesse mesmo meio sob agitação por 2 horas. Após o ajuste da quantidade de células por absorbância, as mesmas foram coletadas e incubadas na presença de cicloheximida (14 mg/mL) por 10 minutos a fim de bloquear a síntese de proteínas no citosol.

Na sequência, adicionou-se 5 μ l (1mCi/mL) de metionina/cisteína [³⁵S] em nova incubação a temperatura ambiente por 12 minutos. As células foram centrifugadas e suspensas

em 75 uL de tampão de lise (5,56 mL de NaOH 5M; 1,11 mL de β -mercaptoethanol; 6,84 mL de H₂O; 1,5 mL de PMSF 0.1M), 500 uL de solução contendo metionina e cisteína não marcadas e 575 uL de ácido tricloroacético (TCA) 50%. As amostras foram centrifugadas, lavadas com H₂O e suspensas em 45 uL do tampão de Laemmli 1x para corrida em gel SDS-PAGE 17,5% acrilamida ou 12,5% acrilamida, Urea 6 M. Após a eletroforese, transferiu-se as proteínas para a membrana de nitrocelulose que, posteriormente, foi corada com solução *Ponceau* (*Ponceau S* 0,2%, TCA 3% e ácido sulfosalicílico 3%). Por fim, a membrana foi seca à 60°C por 1 hora e exposta ao filme de raio-X para detecção das proteínas mitocondriais radioativamente marcadas.

3.10 Isolamento de mitocôndrias

As leveduras foram pré-cultivadas até a fase estacionária em 50 mL de meio rico com galactose (YPGal) por 24 horas à 30°C. A cultura foi transferida para 800 mL de YPGal e, neste último, cresceram por 18 horas sob agitação à 30°C. Após o crescimento, as células foram coletadas por centrifugação e digeridas com zimoliase (1 mg/mL) para remoção da parede celular e geração de esferoplastos. Assim, os esferoplastos resultantes foram lisados com rompimento de membrana plasmática utilizando-se homogeneizador tipo Potter e agitador Blender. As mitocôndrias foram isoladas através de centrifugação diferencial, sendo lavadas e suspensas em tampão contendo sorbitol 0.6 M, HEPES 10 mM pH 7.5 (FAYE et al., 1974). A dosagem de proteínas presentes nas mitocôndrias isoladas foi realizada pelo método de Lowry (1951), ajustando para uma concentração final de 10 mg/mL.

3.11 Medição da atividade dos complexos respiratórios mitocondriais III e IV

As mitocôndrias isoladas das diferentes linhagens foram utilizadas para ensaios espectrofotométricos a fim de medir a atividade dos complexos III e IV da cadeia respiratória (FRANCO et al., 2019).

A medida da atividade do complexo III (citocromo *c* redutase) foi realizada a partir de uma reação enzimática contendo 1% de citocromo *c*, tampão fosfato/KCN 10 mM pH 7.5, NADH 0.1M e 10 mg/mL de mitocôndrias. O Cianeto inibe o complexo IV e o NADH foi adicionado por último, havendo, em seguida, a medição. A última medida com antimicina A ocorreu para bloquear o complexo III. Acompanhando a velocidade de redução da citocromo *c* com intervalos de 5 segundos, as leituras foram feitas em triplicatas a 550 nm (Adaptado de TZAGOLOFF; AKAI; NEEDLEMAN, 1975).

A medida da atividade do complexo IV (citocromo *c* oxidase) foi realizada a partir de uma reação enzimática contendo 1% de citocromo *c* reduzido com ditonito de sódio, 5 mg/mL de mitocôndrias e tampão fosfato 20mM pH 7.5. Neste caso, não há a presença de Cianeto no tampão e as mitocôndrias foram adicionadas por último, havendo, posteriormente, a medição. Acompanhando a velocidade de oxidação da citocromo *c* com intervalos de 5 segundos, as leituras foram realizadas em triplicatas a 550 nm (Adaptado de TZAGOLOFF; AKAI; NEEDLEMAN, 1975).

Para calcular a atividade específica dos complexos foi utilizado o coeficiente de extinção molar da citocromo *c* (29,5 L.mmol⁻¹.cm⁻¹, forma reduzida). As fórmulas estão representadas abaixo (Figura 10).

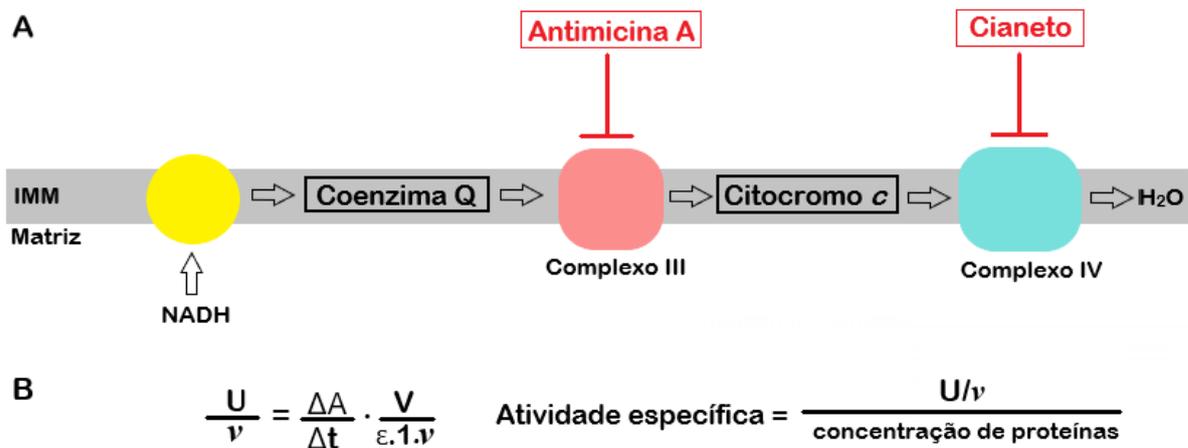


Figura 10. Medição da atividade específica dos complexos respiratórios. A) As setas representam a passagem de elétrons na cadeia respiratória. A velocidade de redução da citocromo *c* foi medida para analisar a atividade do complexo III. Utilizou-se cianeto para bloquear o complexo IV. A última leitura usou antimicina A para bloquear o complexo III. Por fim, a velocidade de oxidação da citocromo *c* foi medida para analisar a atividade do complexo IV. B) Fórmulas para cálculo da atividade específica. U, unidade de atividade enzimática (μmol.min⁻¹); v, volume de enzima; ΔA/ Δt, variação da absorbância em 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 L.mmol⁻¹.cm⁻¹).

3.12 Ensaio de localização proteica intramitocondrial

Para descobrir a localização de Mrx9p nas mitocôndrias, foram utilizadas mitocôndrias que mantiveram suas membranas externas intactas suspensas em tampão sorbitol 0.6 M, HEPES 10 mM pH 7.5. Assim, as mitocôndrias na concentração de 10 mg/mL foram colocadas em quatro tubos. Conforme descrito na Tabela 5, cada tubo recebeu tratamentos diferenciados.

Tabela 5. Tratamentos para a realização do ensaio de localização intramitocondrial

| | Tubo 1 | Tubo 2 | Tubo 3 | Tubo 4 |
|------------------------------------|--------|--------|--------|--------|
| Mitocôndrias 10 mg/ul | 40 uL | 40 uL | 40 uL | 40 uL |
| Sorbitol 0.6 M, HEPES 10 mM pH 7.5 | 210 uL | 210 uL | - | - |
| HEPES 10 mM pH 7.5 | - | - | 210 uL | 210 uL |

| | | | | |
|-----------------------|---|--------|---|--------|
| Proteinase K 10 mg/mL | - | 2,5 uL | - | 2,5 uL |
|-----------------------|---|--------|---|--------|

Posteriormente, as amostras foram incubadas em gelo num período de 60 minutos e foi adicionado 5 uL de PMSF 0.1 M. Realizou-se uma centrifugação à 17.920 g por 25 minutos e separou-se o sobrenadante. Assim, o precipitado foi suspenso em 100 uL de sorbitol 0.6 M, HEPES 10 mM pH 7.5. Foi adicionado 10 uL de ácido tricloroacético (TCA) 50%. As amostras foram centrifugadas durante 5 minutos e o precipitado foi suspenso em 110 uL de tampão de Laemmli.

Desta forma, a amostra 1 representa mitocôndrias intactas; a amostra 2 corresponde as mitocôndrias sujeitas a digestão das proteínas de suas membranas externas, devido ao tratamento com Proteinase K; a amostra 3 são os mitoplastos, ou seja, as mitocôndrias sem a membrana externa e, conseqüentemente, sem o espaço intermembranas; a amostra 4 compreende aos mitoplastos sujeitos a digestão de proteínas de sua membrana com Proteinase K. As amostras foram analisadas por *western blot*.

3.13 Ensaio de solubilidade proteica

Para investigar e confirmar o ensaio de localização de Mrx9p nas mitocôndrias, foi verificado a solubilidade de proteínas mitocondriais na concentração de 10 mg/mL.

As mitocôndrias foram sonicadas por 8 segundos (processador ultrassônico *Vibra Cell-Sonics*) e, em seguida, centrifugadas a 30.000 g por 30 minutos. Foi coletado o sobrenadante, que corresponde às proteínas solúveis presentes na matriz mitocondrial. O precipitado, isto é, as proteínas associadas às membranas mitocondriais, foi suspenso em um volume equivalente de tampão. Uma alíquota dessa suspensão do precipitado foi guardada e o restante de amostra foi incubado na presença de carbonato de sódio 0.2 M por 30 minutos em gelo. Por fim, repetiu as centrifugações conforme descrito acima. O sobrenadante obtido nessa etapa representa as proteínas levemente associadas às membranas mitocondriais. O precipitado corresponde as proteínas que estão intrinsecamente associadas às membranas mitocondriais. Todas as amostras foram analisadas por *western blot*.

3.14 Gradiente de sacarose

5 mg de mitocôndrias isoladas de diferentes linhagens foram solubilizadas em 400 mL de tampão de extração (HEPES 20 mM pH 7.5, KCl 25 mM, MgCl₂ 0.5 mM, PMSF 0.5 mM, Digitonina 0.8 % ou Triton x-100 0.8 %) no gelo por 5 minutos (DE SILVA et al., 2013). As amostras foram centrifugadas em 19.757 g por 15 minutos à 4°C. O sobrenadante (360 uL) foi

aplicado em um gradiente contínuo de sacarose (0.3-1M) contendo HEPES 20 mM pH 7.5, KCl 25 mM, MgCl₂ 0.5 mM, PMSF 0.5 mM, Digitonina 0.1 % ou Triton x-100 0.1 %. As amostras foram centrifugadas em 152.320 g por 4h10min a 4°C no rotor SW-55Ti *Beckman*. Por fim, foi realizado *western blot* das frações coletadas do fundo para o topo do gradiente através de gotejamento (ZENG et al., 2018).

3.15 Western blot

A eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida na condição desnaturante (SDS-PAGE) foi realizada conforme descrito em Laemmli (1970). As proteínas foram misturadas com tampão de Laemmli 1x e aplicadas em géis SDS-PAGE 12.5% de acrilamida. A corrida eletroforética ocorreu em 150 V em tampão Tris 3,03% glicina 14,4% SDS 1%. A transferência ocorreu para a membrana de nitrocelulose ou PVDF (*Polyvinylidene fluoride*) em solução com Tris 0,3 % glicina 1,437% metanol 20%, utilizando o sistema semi-seco por 200 mA à 1 hora (TOWBIN et al., 1979).

Para confirmar a transferência realizada as membranas foram coradas com solução *Ponceau* (*Ponceau S* 0,2%, TCA 3% e ácido sulfosalicílico 3%). Após coloração, a membrana foi bloqueada com leite 5% em tampão (NaCl 150 mM, Triton 0.1%, Tris-Cl 10 mM pH 7.5) por 1 hora à temperatura ambiente. As proteínas foram detectadas através da incubação da membrana com anticorpo primário (1:1000) overnight e anticorpo secundário (1:5000 ou 1:10000) por 1 hora, conforme indicados na Tabela 6. A análise das bandas foi feita pela reação da membrana com H₂O₂ associado aos reagentes de luminol e ácido cumárico. Por fim, a membrana foi exposta a um filme de raio-X.

Tabela 6. Anticorpos utilizados para western blot

| Anticorpo primário | Anticorpo secundário | Fonte |
|--------------------|----------------------|---------------------------------|
| Anti-HA | Rabbit | Sigma-Aldrich |
| Anti-Cox1 | Rabbit | Tzagoloff (Columbia University) |
| Anti-Cox2 | Rabbit | Tzagoloff (Columbia University) |
| Anti-Cytb | Rabbit | DIECKMANN; TZAGOLOFF, 1985 |
| Anti-Rip1 | Rabbit | CRIVELLONE et al., 1988 |
| Anti-Coq3 | Rabbit | POON et al., 1999 |
| Anti-Coq4 | Rabbit | Clarke (UCLA) |
| Anti-Atp6 | Rabbit | JP D-iRago (Univ. Bordeaux) |
| Anti-uL24 | Rabbit | KAUR; STUART, 2011 |
| Anti-Porina | Mouse | Invitrogen |
| Anti-Kgd2 | Rabbit | REPETTO; TZAGOLOFF, 1990 |
| Anti-Sco1 | Rabbit | GLERUM et al., 1996 |

| | | |
|------------|--------|---------------------------------|
| Anti-Cyb2 | Rabbit | Tzagoloff (Columbia University) |
| Anti-bL31m | Rabbit | GRUSHKE et al., 2010 |
| Anti-mS37 | Rabbit | JIN et al., 1997 |
| Anti-Mss51 | Rabbit | Barrientos et al., 2002 |
| Anti-Prx1 | Rabbit | GOMES et al., 2017 |

3.16 Curvas de crescimento

A avaliação da transição do processo de fermentação para a respiração mitocondrial foi realizada através de curvas de crescimento. As linhagens foram crescidas em meio rico com glicose (YPD) por 24 horas à 30°C, a fim de atingirem a fase estacionária de crescimento. Em seguida, foi feito o reinóculo em YPD com o ajuste da densidade óptica para $OD_{600} = 0.01$. As células cresceram à 30°C até chegarem em uma OD_{600} na faixa de 0.5-1, representando o início da fase logarítmica. Foi realizado a centrifugação das células, onde foram suspensas em 1 ml de H₂O. Por fim, as linhagens foram inoculadas em 10 ml de meio YPD e YPEG com o ajuste de $OD_{600} = 0.1$. As medidas das densidades ópticas foram realizadas a cada 3 horas durante 2 dias.

4 RESULTADOS

4.1 Super-expressão de genes *MRX*

A montagem dos complexos de múltiplas subunidades da cadeia respiratória é um processo estritamente regulado, pois depende da expressão gênica de dois genomas distintos. Em mitocôndrias, diversos exemplos de *feedback loops* regulatórios foram descritos como determinantes no acúmulo estequiométrico de subunidades proteicas da cadeia respiratória, como foi discutido anteriormente para Mss51p. Assim, a tradução mitocondrial está sujeita a ação de vários fatores regulatórios visando à produção equilibrada dessas proteínas codificadas pelo mtDNA (KEHREIN et al., 2012).

Um dos possíveis papéis que podem estar sendo desempenhados pelos genes *MRX* é o da repressão da tradução mitocondrial. Produtos de genes repressores devem interromper a tradução de um dado transcrito, ou até mesmo de um conjunto de mRNAs mitocondriais. Os genes *SMT1* (*MRX5*) e *CBS1* são os únicos até hoje descritos como repressores da tradução do mRNA mitocondrial de *ATP8/6* e *COB*, respectivamente (RAK et al., 2016; SALVATORI et al., 2020).

Como hipótese inicial, foram realizadas construções super-expressando *MRX5* e outros componentes do complexo MIOREX não caracterizados, a fim de obter um desequilíbrio de tradução de proteínas mitocondriais e identificar novos repressores de tradução.

Portanto, foram clonados os genes *MRX1*, *MRX3*, *MRX4*, *MRX5*, *MRX9*, *MRX11*, *MRX12* e *MRX13* sob o controle do promotor forte induzível *GAL10* e, em seguida, avaliado as propriedades de tradução mitocondrial das cepas de levedura cultivadas em galactose. Em *S. cerevisiae*, o promotor *GAL10* é controlado por fatores de transcrição denominados Gal4p e Gal80p. Gal4p ativa o promotor *GAL10* na presença de galactose e Gal80p liga-se a Gal4p bloqueando sua ação na ausência de galactose (WEST et al., 1987). O uso do promotor *GAL10* em estudos anteriores do laboratório demonstrou que os níveis de expressão da proteína alvo podem ser até 500 vezes aumentado em uma única cópia em vetor integrativo (ZAMPOL et al., 2011).

Desta forma, avaliou-se o perfil de síntese de produtos mitocondriais em linhagens super-expressando alguns genes *MRX*. Células crescidas em galactose foram tratadas com cicloheximida para inibição da síntese de proteínas no citosol e marcadas *in vivo* com uma mistura de aminoácidos radioativos metionina/cisteína [³⁵S].

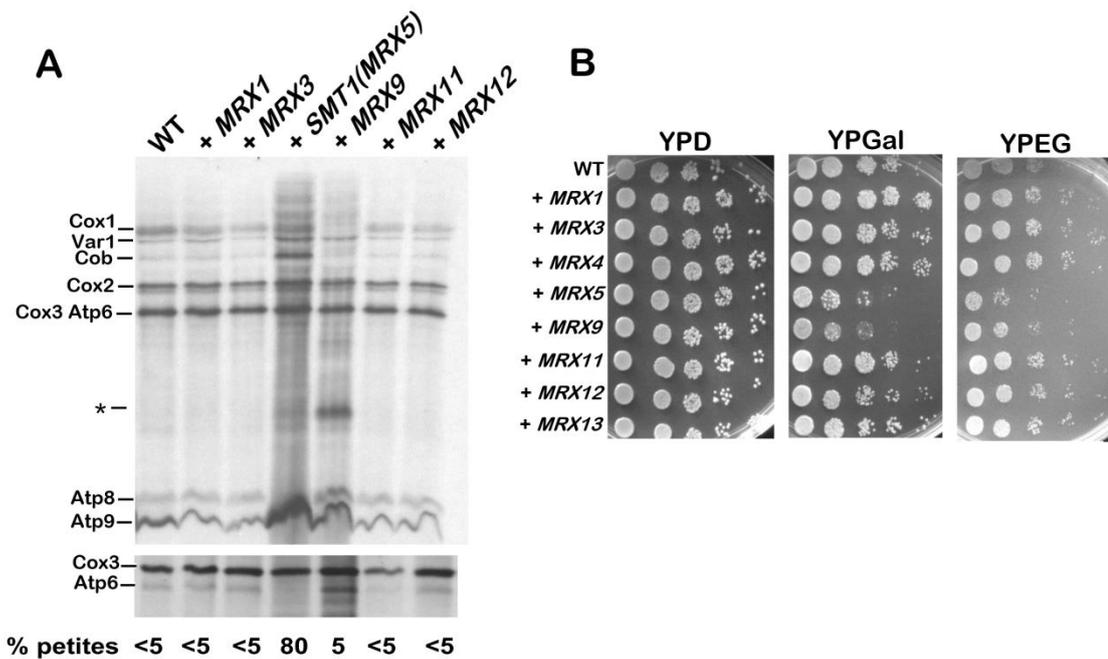


Figura 11. Super-expressão de componentes do complexo MIOREX e propriedades na tradução mitocondrial. A) Capacidade de tradução de proteínas mitocondriais na linhagem selvagem (WT) e em linhagens super-expressando alguns genes *MRX*. A posição esperada para o polipeptídeo mitocondrial está indicada à esquerda dos dois filmes. As linhagens foram incubadas a 30°C em meio rico com galactose (YPGal). A incorporação de metionina [³⁵S] e cisteína [³⁵S] nas proteínas mitocondriais foi realizada *in vivo* em temperatura ambiente. No painel em cima, fez-se a separação das proteínas em gel de acrilamida 17,5%, e no painel a baixo em gel de acrilamida 12,5%, Urea 6M. B) Testes de crescimento para avaliação da super-expressão de alguns genes *MRX*. Fez-se o crescimento em meio YPGal da linhagem selvagem (WT) e das linhagens super-expressando os genes indicados na figura. As células foram plaqueadas com diluições seriadas em meio rico com glicose (YPD), em meio rico YPGal e em meio rico com etanol-glicerol (YPEG). A foto representa o crescimento de 48 horas.

Como prova de conceito, a super-expressão do gene *MRX5/SMT1* levou de fato a perda da tradução do mRNA de *ATP8/6*, confirmando codificar um repressor de tradução. Ao analisar o perfil de tradução de outros polipeptídeos mitocondriais, a super-expressão de *MRX9* chamou a atenção devido à diminuição na tradução de Cox1p selvagem, acompanhado de uma banda adicional que se comporta de forma semelhante ao polipeptídeo resultante da interrupção precoce da tradução de Cox1p* (Figura 11A).

Estudos anteriores relataram que este novo polipeptídeo de baixo peso molecular aparece como um intermediário de migração entre as proteínas Atp6p e Atp8p em gel SDS-PAGE. Esta proteína, renomeada de mp15, é codificada por uma transcrição do mRNA de *COX1* parcialmente não processado e possui um peso molecular de 15 kDa. Ainda, mp15 é produzido, por exemplo, em mutantes *Δmss51* e outros mutantes da citocromo *c* oxidase nos quais a tradução de Cox1p é comprometida (ZAMBRANO et al., 2007).

Também foram realizados testes de crescimento com diluições seriadas em meios de cultura específicos. Em meio rico com galactose (YPGal), foi avaliado o efeito da máxima expressão dos genes *MRX*, em virtude da ativação do promotor *GAL10*. A galactose embora

seja preferencialmente fermentada, não possui o mesmo efeito catabólico repressor na respiração mitocondrial tal como ocorre com a glicose. Em meio contendo fontes de carbono não fermentáveis, como etanol-glicerol (YPEG), foi avaliado a capacidade das linhagens em realizar respiração mitocondrial. Portanto, a super-expressão de *MRX5* e *MRX9* alterou o crescimento das linhagens transformadas em meio YPEG e, principalmente, YPGal, indicando um menor metabolismo respiratório em razão do excesso dessas proteínas do complexo MIOREX (Figura 11B).

A partir destes resultados iniciais, foi priorizado seguir os estudos de caracterização do gene *MRX9*, a fim de avaliar sua função no processo de tradução mitocondrial.

4.2 Propriedades fenotípicas de mutantes $\Delta mrx9$

O gene *MRX9* é codificado pela ORF denominada *YDL027C*, com localização no cromossomo IV da levedura. Codifica uma proteína de aproximadamente 48 kDa que é importada para as mitocôndrias, onde foi visualizada pela primeira vez juntamente com o mitorribossomo no grande complexo MIOREX (KEHREIN et al., 2015). Mrx9p possui 420 aminoácidos e com o advento de algoritmos que permitem a modelagem *ab initio*, como o *AlphaFold*, é possível ter uma ideia de sua estrutura que aparenta incluir domínios transmembranas (Figura 12A).

Uma das formas clássicas de avaliar a função de um dado gene é através da construção de um alelo nulo. Com a obtenção da linhagem $\Delta mrx9$, conforme descrito detalhadamente no item 3.5 da seção “Materiais e Métodos”, realizou-se testes de crescimentos comparativos entre a linhagem WT e o mutante $\Delta mrx9$, os quais mostraram que a ausência do gene *MRX9* não interfere na capacidade de crescimento da levedura em meios contendo fontes de carbono não fermentáveis (Figura 12B).

Embora no resultado anterior (Figura 11A), no qual a super-expressão de *MRX9* resultou em baixa tradução de Cox1p e numa versão incompleta da proteína, a ausência do gene não propiciou nenhuma alteração nas propriedades de tradução mitocondrial em comparação com as células do tipo selvagem (Figura 12C).

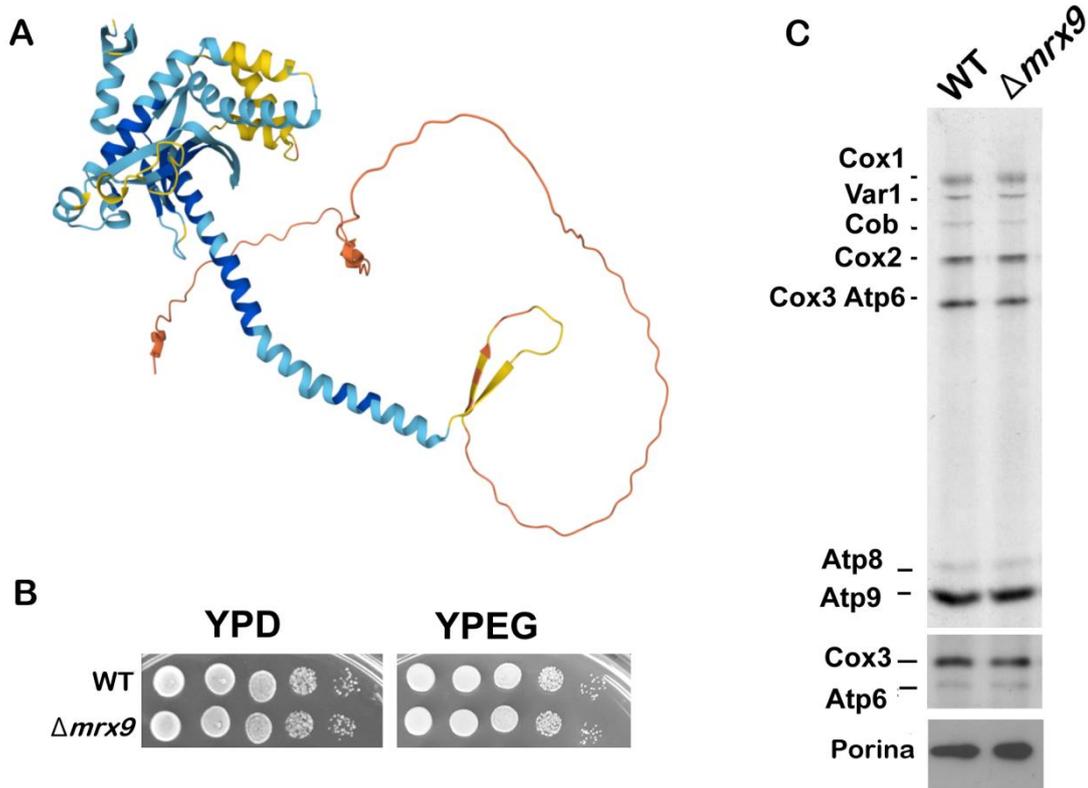


Figura 12. Propriedades de mutantes $\Delta mrx9$ e informações estruturais de Mrx9p. A) Informações estruturais de Mrx9p obtidas através da plataforma *AlphaFold*. Este banco de dados produz uma pontuação de confiança por resíduo (pLDDT) entre 0 e 100: região azul escuro (pLDDT > 90); região azul claro (90 > pLDDT > 70); região amarela (70 > pLDDT > 50); região laranja (pLDDT < 50). B) Avaliação da capacidade de crescimento da linhagem selvagem (WT) e $\Delta mrx9$. As leveduras cresceram em meio rico com glicose (YPD) à 30°C. Em seguida, foram plaqueadas em meio rico YPD e em meio contendo fontes de carbono não fermentáveis (YPEG). A foto representa o crescimento de 48 horas. C) Capacidade de tradução de proteínas mitocondriais na linhagem selvagem (WT) e mutante $\Delta mrx9$. A posição esperada para o polipeptídeo mitocondrial está indicada à esquerda dos dois filmes. As linhagens foram incubadas a 30°C em meio com galactose. A incorporação de metionina [^{35}S] e cisteína [^{35}S] nas proteínas mitocondriais foi realizada *in vivo* em temperatura ambiente. No painel em cima, fez-se a separação das proteínas em gel de acrilamida 17,5%, e no painel a baixo em acrilamida 12,5%, Ureia 6M. O anticorpo anti-porina (Invitrogen™) foi utilizado como controle de carregamento de proteínas no gel.

4.3 Excesso de Mrx9p acarreta em baixos níveis endógenos de Cox1p e menor atividade de COX

Como mencionado, o mutante $\Delta mrx9$ não apresenta fenótipos de perda de atividade respiratória ou deficiência na capacidade de traduzir proteínas mitocondriais. Considerando o déficit na tradução de Cox1p sob as condições de excesso de Mrx9p, foi avaliado como a super-expressão e a deleção do gene afetariam os níveis endógenos de Cox1p e outras proteínas presentes na organela.

Proteínas mitocondriais de ambas as linhagens foram aplicadas em gel SDS-PAGE 12,5% para realização de *western blot*, utilizando alguns anticorpos de interesse que avaliassem os níveis endógenos de alguns complexos proteicos da organela (Tabela 6). Neste ensaio, foram avaliados os níveis endógenos de Cox3p e Cox4p, duas proteínas necessárias

para a biossíntese da Coenzima Q e presentes no complexo proteico conhecido como CoQ sintetoma (MARBOIS et al., 2005); Cobp (Cytbp) e Rip1p, dois componentes estruturais do complexo III; Cox1p e Cox2p, presentes no complexo IV; Atp6p, uma subunidade da ATP sintase; uL24, uma proteína da LSU do mitorribossomo. A porina, uma proteína de membrana externa mitocondrial, foi utilizada como controle de carregamento de proteínas no gel.

Com a deleção do gene *MRX9*, os níveis de estado estacionário de Cox1p foi aproximadamente igual ao observado nas mitocôndrias do tipo selvagem. Em contraste, a super-expressão de *MRX9* resultou em redução nos níveis endógenos de Cox1p. O nível de Cox2p também foi reduzido para uma taxa semelhante. Todas as outras proteínas mitocondriais não mostraram nenhuma mudança significativa nas cepas testadas (Figura 13A).

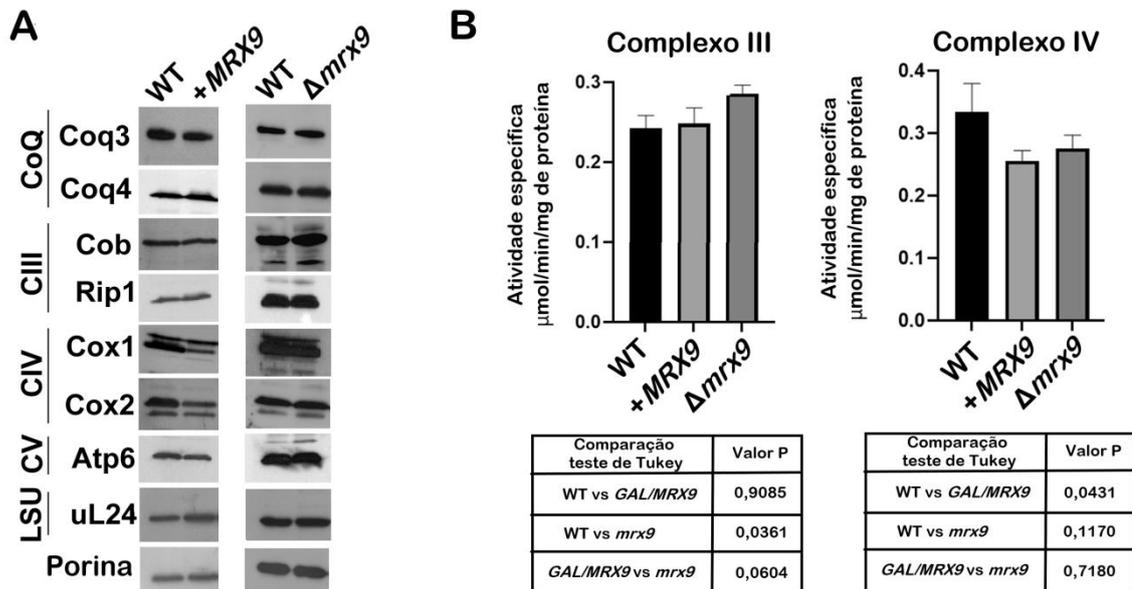


Figura 13. Níveis endógenos de proteínas mitocondriais e atividade dos complexos respiratórios III e IV. A) Avaliação dos níveis de estado estacionário de proteínas presentes nas mitocôndrias de *S. cerevisiae*. Mitocôndrias da linhagem selvagem (WT), mutante $\Delta mrX9$ e super-expressando *MRX9* com o uso do promotor *GAL10* foram isoladas de células crescidas em meio rico com galactose (YPGal). 40 μ g de proteínas mitocondriais foram aplicadas em gel SDS-PAGE 12.5%, transferidas para uma membrana de nitrocelulose e submetidas aos anticorpos indicados à esquerda do filme. O uso do anticorpo anti-porina (Invitrogen™) serviu como controle do carregamento de proteínas no gel. B) Atividade enzimática dos complexos da fosforilação oxidativa. Mitocôndrias isoladas da linhagem selvagem (WT), mutante $\Delta mrX9$ e super-expressando *MRX9* com o uso do promotor *GAL10* tiveram as atividades do complexo III e IV medidas, sendo comparadas estatisticamente no software *GraphPad Prism* (*GraphPad Prism Software, Inc., Califórnia*).

Após detectar redução dos níveis endógenos de algumas subunidades do complexo IV da cadeia respiratória, foi avaliado o funcionamento das mitocôndrias através da medição da atividade do complexo III (citocromo *c* redutase) e complexo IV (citocromo *c* oxidase). Dessa forma, utilizou-se o software *GraphPad Prism* (*GraphPad Prism Software, Inc., Califórnia*) para comparar os resultados estatisticamente e a análise de Variância (ANOVA) para o teste

comparativo de Tukey, onde este último compara os resultados entre si para verificar se a diferença é significativa. A medição e os dados estatísticos foram obtidos em conjunto com a aluna de doutorado, Maria Kfoury Soares. As atividades de cada complexo (expressa em $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína) da linhagem selvagem, mutante $\Delta\text{mr}x9$ e $\text{GAL}/\text{MRX9}$ foram medidas, conforme detalhado no item 3.11 da seção “Materiais e Métodos”.

Os resultados mostraram que a atividade enzimática de COX foi diminuída nas mitocôndrias isoladas de leveduras que super-expressam MRX9 . Nesta cepa, também não foi visto alteração para a atividade do complexo III (Figura 13B). Ao todo, os dados até aqui indicaram que MRX9 em excesso altera especificamente a biogênese e a atividade da COX.

4.4 Super-expressão de MRX9 atrasa a adaptação ao metabolismo respiratório

S. cerevisiae tem como característica clássica a alta capacidade fermentativa, apresentando repressão do catabolismo aeróbio na presença de glicose (DE DENKEN, 1966). O metabolismo respiratório somente é ativado quando há o término do processo fermentativo com esgotamento de glicose do meio, sendo possível identificar linhagens que demandam um maior tempo de transição. A adaptação para o metabolismo respiratório é marcada com mudanças drásticas na expressão das enzimas do ciclo de Krebs e componentes da cadeia mitocondrial de transporte de elétrons (DERISI et al., 1997).

Para acompanhar os efeitos individuais da super-expressão de MRX9 no metabolismo fermentativo e respiratório, foram construídas linhagens expressando MRX9 sob o controle de diferentes promotores, como também foi adicionado um *tag* de hemaglutinina A (HA) na sua porção C-terminal. Assim, testou-se além do promotor induzível GAL10 já mencionado, os promotores constitutivos ADHI , TEF1 , GPD e o promotor endógeno do próprio gene. A metodologia dessas construções está descrita no item 3.6 da seção “Materiais e Métodos”. O promotor constitutivo TEF1 é derivado do gene que codifica o fator de alongação de tradução 1α (EF-1 α) (MUMBERG et al., 1995). Já o promotor ADHI é proveniente do gene que codifica para a enzima álcool desidrogenase I (HITZEMAN et al., 1981). Por fim, o promotor GPD é derivado do gene que codifica a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (MUSTI et al., 1983; BITTER et al., 1984).

Em células cultivadas em meio com galactose, MRX9-HA sob o controle dos promotores constitutivos TEF1 e GPD resultou em teores elevados da proteína. Contudo, o transformante que abriga a fusão $\text{GAL10}/\text{MRX9-HA}$ acumula mais quantidades de Mrx9p-HA do que as linhagens com promotores constitutivos (Figura 14A).

A expressão de *MRX9*-HA também foi avaliada em células no início do crescimento logarítmico em meio com glicose (condição fermentativa) e em meio com etanol-glicerol (condição de respiração). Nestas condições, os transformantes *TEF1*/*MRX9*-HA e *GPD*/*MRX9*-HA apresentaram alto rendimento de Mrx9p-HA e a versão não processada da proteína também é acumulada em ambas as condições de crescimento. Em células cultivadas com glicose, o sinal de Mrx9p-HA não processado é mais forte provavelmente devido a uma limitação de importação mitocondrial presente em condições de crescimento fermentativo. Assim, o nível do controle porina foi mostrado mais forte nas células que cresceram na condição respiratória (Figura 14B).

Curiosamente, o nível de estado estacionário do produto Mrx9p-HA foi maior quando expresso sob o controle do seu promotor endógeno em comparação com a versão sob o controle do promotor *ADHI* (Figura 14B).

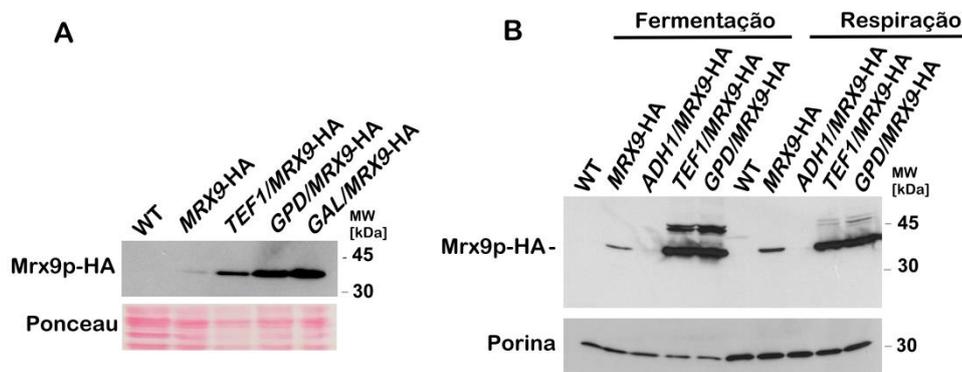


Figura 14. Níveis de expressão de *MRX9*-HA com o uso de diferentes promotores. A) Perfil de expressão de *MRX9*-HA com o uso do promotor endógeno, *TEF1*, *GPD* e *GAL10*. Para checar os níveis de Mrx9p, as leveduras foram crescidas em meio rico com galactose (YPGal) à 30°C. Posteriormente, foi realizado a precipitação de proteínas na presença de TCA 50%. As proteínas foram aplicadas em gel SDS-PAGE 12.5%, transferidas para a membrana de nitrocelulose e submetidas ao anticorpo anti-HA (Sigma). A foto da membrana de nitrocelulose corada com *Ponceau-Red* representa um controle de carregamento de proteínas no gel. B) Expressão de *MRX9*-HA sob o controle de diferentes promotores em metabolismo de fermentação e de respiração mitocondrial. As células em estado de fermentação foram obtidas a partir do cultivo em meio rico com glicose (YPD) e as proteínas foram precipitadas com TCA 50% na fase de exponencial crescimento ($OD_{600} = 1.0$). As células em estado de respiração mitocondrial foram obtidas a partir do cultivo em meio com etanol-glicerol e as proteínas foram precipitadas também com TCA 50% na fase de exponencial crescimento ($OD_{600} = 1.0$). Foi realizado *western blot* como descrito em “A”. O uso do anticorpo anti-porina (Invitrogen™) serviu como controle do carregamento de proteínas no gel.

Estudos recentes com *S. cerevisiae* demonstraram que grande parte da maquinaria metabólica da célula sofre condições de remodelação para transitar do crescimento fermentativo ao respiratório (MAY et al., 2020). Um exemplo desse processo é o ativador de tradução Mam33p, que foi caracterizado como necessário para a tradução do mRNA de *COX1* e adaptação ao metabolismo respiratório (ROLOF; HENRY, 2015). Portanto, foi investigado se a super-expressão de *MRX9* afetaria atraso na transição do metabolismo fermentativo para o respiratório.

Neste experimento, as células foram cultivadas em glicose até o início da fase exponencial de crescimento ($OD_{600} = 0.5-1.0$), onde estariam realizando fermentação. Em seguida, as leveduras foram plaqueadas em diluição seriadas em meio rico com glicose e etanol-glicerol. De maneira geral, quanto mais rápida a adaptação ao metabolismo respiratório, mais rápido ocorre o crescimento das células em meio com etanol-glicerol. Após 24 horas, foi visto que as células que expressam o promotor constitutivo forte *GPD* apresentam um atraso claro em seu crescimento respiratório. Ainda, a taxa de crescimento é ligeiramente menor também nas células que expressam o promotor constitutivo *TEF1*. Todavia, a deleção de *MRX9* não alterou significativamente a adaptação ao meio respiratório (Figura 15A).

O resultado obtido nesta etapa pode ser confirmado através da realização de curvas de crescimento em meio com glicose e etanol-glicerol. Sob as mesmas condições descritas, as leveduras em metabolismo fermentativo foram inoculadas em meio líquido YPD e YPEG, onde os valores de absorbância foram medidos a cada três horas. Em meio contendo fontes de carbono não fermentáveis, a linhagem que super-expressa *MRX9* com o promotor *GPD* possui uma fase lag levemente prolongada em relação ao selvagem. Esse atraso representa dificuldades em remodelar a maquinaria mitocondrial para o início da atividade respiratória (fase logarítmica). Da mesma forma, o mutante não apresentou quaisquer dificuldades em adaptação (Figura 15B).

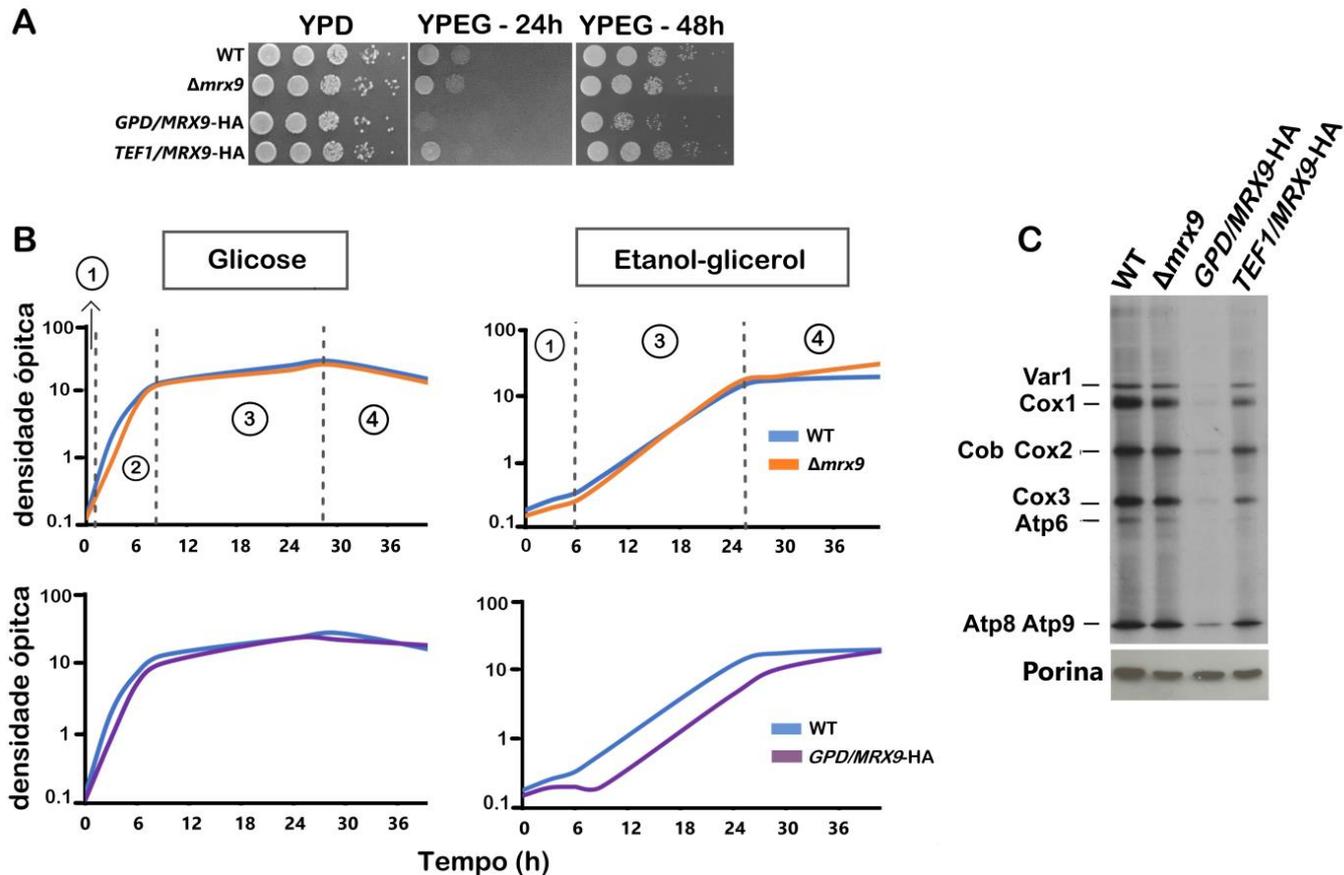


Figura 15. Excesso de Mrx9p atrasa a adaptação do metabolismo fermentativo para a respiração mitocondrial. **A)** Teste de crescimento com diluição seriada para avaliação da transição de metabolismo. As células das linhagens indicadas cresceram em meio rico com glicose (YPD) até atingirem o início da fase log de crescimento, em condição fermentativa ($OD_{600} = 0.5 - 1.0$). Em seguida, as leveduras foram plaqueadas por diluições seriadas em meio fermentativo (YPD) e em meio respiratório (YPEG). Foram tiradas fotos em 24 horas e 48 horas de crescimento. **B)** Curvas de crescimento para a avaliação da transição de metabolismo. As leveduras estavam na condição de fermentação assim como mencionado em “A”. As células foram inoculadas em meio líquido YPD e YPEG. Os valores de absorbância foram medidos a cada 3 horas. Estágios da curva de crescimento: 1 (fase lag); 2 (fase log de crescimento – fermentação); 3 (fase log de crescimento – respiração); 4 (fase pós-log ou estacionária). **C)** Avaliação da capacidade de tradução de proteínas mitocondriais em células com transição do metabolismo fermentativo para o respiratório. A incorporação de metionina [^{35}S] e cisteína [^{35}S] nas proteínas mitocondriais foi realizada *in vivo* nas mesmas condições descritas em “A”. O uso do anticorpo anti-porina (Invitrogen™) serviu como controle do carregamento de proteínas no gel.

Paralelamente, o atraso na adaptação ao metabolismo respiratório causado pela super-expressão deste componente do complexo MIOREX também é observado na avaliação dos produtos mitocondriais recém-sintetizados. Sob as mesmas condições, células que expressam GPD/MRX9-HA demonstraram um acúmulo baixíssimo de produtos mitocondriais. Assim como células que expressam TEF1/MRX9-HA, a tradução mitocondrial também é diminuída. O mutante $\Delta mrx9$ não alterou significativamente a tradução de produtos mitocondriais em comparação com as células do tipo selvagem (Figura 15C).

Os resultados obtidos indicam que o excesso de Mrx9p resulta em uma adaptação alterada ao metabolismo respiratório, o que argumenta a favor de um papel regulador de Mrx9p no sistema de expressão gênica mitocondrial.

4.5 Localização intramitocondrial de Mrx9p

Mrx9p foi descoberto presente no complexo MIOREX nas mitocôndrias de *S. cerevisiae* (KEHREIN et al., 2015). Entretanto, não havia a informação exata da sua localização intramitocondrial. A informação sobre o compartimento mitocondrial em que se encontra uma proteína também é importante para a compreensão do seu funcionamento. Dessa maneira, os ensaios de localização utilizaram a linhagem construída que possui o gene *MRX9* sob o controle do seu promotor endógeno e fusionado com o epítipo HA na sua porção C-terminal.

O primeiro experimento de localização intramitocondrial utilizou mitocôndrias (Mt) e mitoplastos (Mp) expressando Mrx9p-HA, como descrito no item 3.12 da seção “Materiais e Métodos”. Mitoplastos são mitocôndrias sem membranas externas e esta conversão foi obtida através do choque hipotônico em mitocôndrias. Assim, as amostras foram submetidas a presença ou ausência de Proteinase K (Prot K) e, posteriormente, feitas análises de *western blot* utilizando anticorpos específicos (Kgd2p, Sco1p e Cyb2p) contra marcadores de cada compartimento mitocondrial. Os anticorpos foram doados pelo Dr. Alexander Tzagoloff (*Columbia University*).

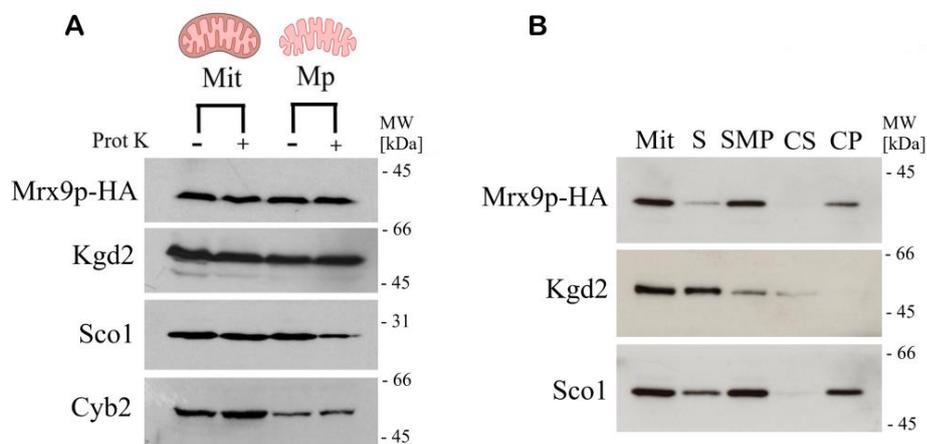


Figura 16. Mrx9p é uma proteína de membrana interna voltada para matriz. As amostras obtidas foram aplicadas em gel SDS-PAGE 12.5% e transferidas para membranas de nitrocelulose. Para imunodeteção, foi utilizado anticorpo primário na concentração 1:1000 e anticorpo secundário anti-rabbit IgG conjugado com peroxidase (Sigma) na concentração 1:5000. **A)** Ensaio de localização intramitocondrial de Mrx9p. As amostras de mitocôndrias (Mit) e mitoplastos (Mp) foram tratadas na presença ou ausência de proteinase K (Prot K). Foram utilizados anticorpos controles para Sco1p (proteína de membrana interna voltada para o espaço intermembranas), Kgd2p (proteína de matriz) e Cyb2p (proteína do espaço intermembranas). **B)** Ensaio de solubilidade de Mrx9p. Após a sonicação das mitocôndrias, houve detecção das proteínas solúveis de matriz presentes no sobrenadante (S) e proteínas de membrana presente no precipitado (SMP). Ainda, uma alíquota do precipitado foi tratada com carbonato de sódio e, após a centrifugação, coletado a fração solúvel ao carbonato (CS) e insolúvel (CP). Novamente, foram testados os anticorpos controles para Sco1p e Kgd2p.

Kgd2p ou α -cetoglutarato desidrogenase é uma proteína de matriz mitocondrial que atua no ciclo de Krebs (REPETTO; TAGALOFF, 1990); Sco1p (*Suppressor of cytochrome*

oxidase deficiency 1) é uma proteína de membrana interna voltada para o espaço intermembranas, sendo requerida para a atividade da citocromo *c* oxidase (GLERUM et al., 1996); Cyb2p ou citocromo b2 está localizado no espaço intermembranas, sendo essencial na utilização de lactato (DAUM et al., 1982). Comparando os resultados obtidos, Kgd2p estabelece-se intacta nas frações de mitocôndrias e mitoplastos submetidos à proteinase K, confirmando ser uma proteína de matriz. Curiosamente, Mrx9p-HA apresentou o mesmo padrão de bandas de Kgd2p, sugerindo a hipótese deste componente do complexo MIOREX ser uma proteína de matriz ou até mesmo de membrana interna voltada para matriz, pois não sofreu degradação por proteinase K na fração de mitoplastos (Figura 16A).

A fim de confirmar se Mrx9p-HA é uma proteína de matriz ou de membrana interna, foi realizado um segundo experimento, denominado ensaio de solubilidade (descrito no item 3.13 da seção “Materiais e Métodos”). Desta forma, foram avaliadas as propriedades de solubilização das proteínas após a sonicação das mitocôndrias, havendo rompimento de membranas mitocondriais. Nesta etapa, foi feita a primeira centrifugação para ter acesso as frações de proteínas solúveis presentes na matriz mitocondrial, chamada de sobrenadante (S), e as frações de proteínas associadas à membrana mitocondrial, sendo essa o precipitado (SMP). Uma alíquota do precipitado foi tratada com carbonato de sódio, que possui a função de liberar todas as proteínas que estão levemente associadas às membranas mitocondriais. Por fim, foi realizada uma última centrifugação para obter as frações de proteínas intrinsecamente associadas às membranas (CP) e as frações de proteínas que estão levemente associadas às membranas (CS).

Os resultados obtidos neste último ensaio mostram que Mrx9p aparece com o mesmo perfil de solubilidade de Sco1p, demonstrando ser uma proteína de membrana interna pois participa da fração SMP e, também, intrinsecamente associada à membrana em razão da sua presença na fração CP (Figura 16B). Confirmando, portanto, ser uma proteína de membrana interna voltada para a matriz mitocondrial.

Esses dados entram em concordância com as informações estruturais de Mrx9p no banco de dados sobre domínios proteicos, denominado *Universal Protein* (www.uniprot.org.br), que prediz que a proteína possui duas hélices transmembranas nas posições 125-145 e 149-169 da sequência de aminoácidos.

4.6 Perfil de co-sedimentação de Mrx9p com o mitorribossomo

Estudos recentes mostraram que Mrx9p co-sedimenta com a SSU do mitorribossomo (MÖLLER-HERGT et al., 2018) e está localizado perto do túnel de saída de proteínas da LSU

(SINGH et al., 2020). Para checar a distribuição de Mrx9p e sua associação com o mitorribossomo foi realizado experimentos com gradientes de sacarose.

A ultracentrifugação com gradiente de densidade é uma técnica comumente utilizada para fracionar partículas e isolar moléculas. Esse método abrange amostras contendo macromoléculas de diferentes tamanhos na superfície de um tubo de ultracentrifuga, por exemplo, havendo também a presença de um líquido como sacarose, glicerol ou outra substância química, cuja sua densidade aumenta de cima para baixo, formando, portanto, um gradiente. Nesse caso, utilizou-se um gradiente de sacarose (0.3-1M), no qual as partículas são separadas com base na sua densidade (CHOI; BARRIENTOS, 2020).

A fim de identificar Mrx9p e outras proteínas da LSU e SSU no proteoma do mitorribossomo, as mitocôndrias isoladas tiveram seus mitorribossomos extraídos na presença de $MgCl_2$ 0.5 mM. O magnésio é importante para estabilizar RNAs e suas interações com proteínas, entretanto, foi utilizado em baixas concentrações para não dissociar os ribossomos mitocondriais dos seus fatores de interação (KEHREIN et al., 2015). Ainda na extração, houve a presença de detergentes mais fortes como Triton x-100, e outros mais suaves como Digitonina. As amostras foram submetidas à sedimentação em gradiente de sacarose por ultracentrifugação, conforme descrito anteriormente (GUEDES-MONTEIRO et al., 2018). As frações coletadas foram analisadas por *western blot*. Como controle, o anticorpo bL31m foi testado para acompanhar a sedimentação da subunidade 54S (LSU) e o anticorpo mS37 para seguir a subunidade 37S (SSU). O anticorpo Prx1p foi usado como controle de sedimentação. Prx1p é uma enzima que catalisa a redução de H_2O_2 gerado no interior da organela, possuindo dupla localização mitocondrial: solúvel no espaço intermembranas e uma fraca associação com a membrana interna no lado da matriz (GOMES et al. 2017).

Como já visto nos resultados iniciais deste trabalho, Mrx9p em excesso interfere na síntese de Cox1p, resultando em uma tradução incompleta da proteína. Dessa forma, foi avaliado se Mrx9p estaria afetando a acessibilidade de Mss51p no mitorribossomo, pois este último realiza a ativação de tradução e controle de alongamento do mRNA de *COXI* (PEREZ-MARTINEZ et al. 2003). Embora Mss51p não tenha sido encontrado nos complexos MIOREX (KEHREIN et al., 2015), sua associação com o mitorribossomo foi relatada em algumas condições especiais de alto teor de sal (VERMA et al., 2021).

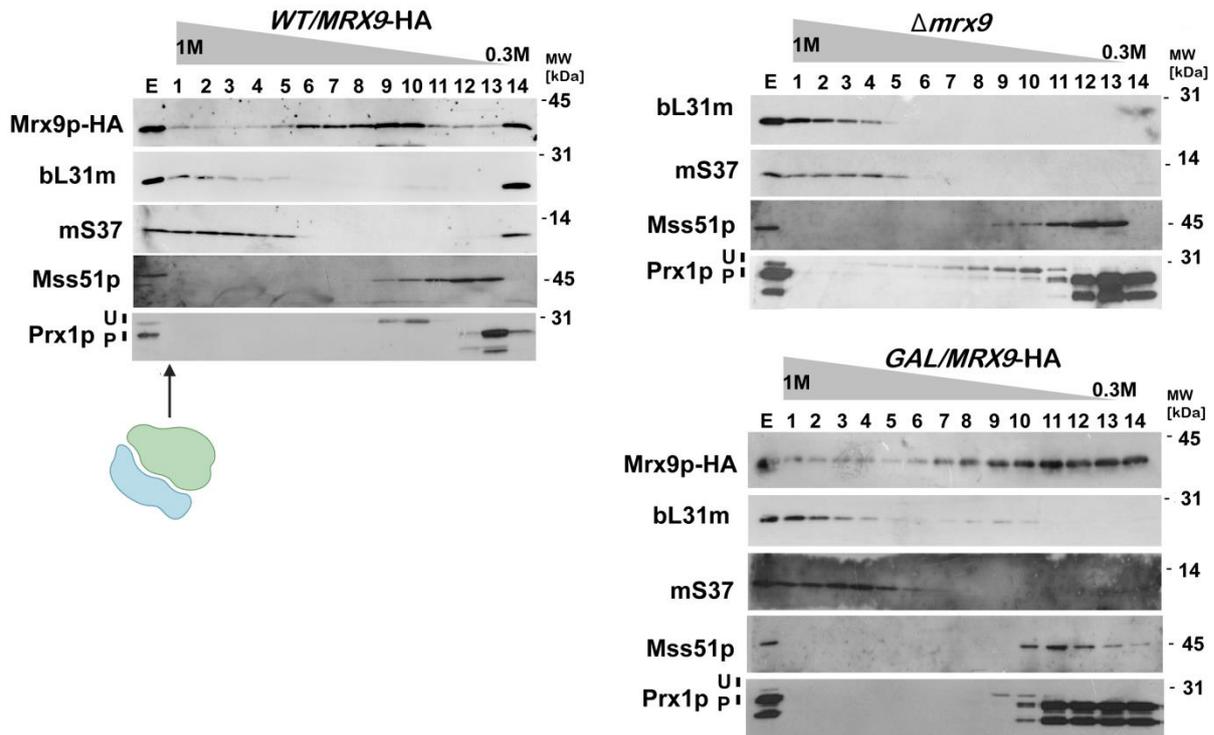


Figura 17. Sedimentação de Mrx9p e proteínas ribossomais em gradientes de sacarose com Triton. Mitocôndrias (5 mg de proteínas) foram isoladas das linhagens *WT/MRX9-HA*, $\Delta mrx9$ e *GAL/MRX9-HA*. As proteínas foram solubilizadas no tampão de extração do mitorribossomo à 4°C por 5 minutos, contendo HEPES 20 mM (pH 7.5); KCl 25 mM; MgCl₂ 0.5 mM; PMSF 0.5 mM e Triton 0.8%. O extrato (E) obtido foi centrifugado e aplicado em um gradiente de sacarose linear 0.3-1M, contendo HEPES 20 mM (pH 7.5); KCl 25 mM; MgCl₂ 0.5 mM; PMSF 0.5 mM e Triton 0.1%. Após a última centrifugação de 4h10 por 152.320 g à 4°C, foram coletadas 14 frações a partir da fração do fundo (1) até o topo (14) do gradiente. Um total de 36.5 uL de cada fração foi aplicado em gel SDS-PAGE 12.5% de acrilamida para realização de *western blot*. Foi avaliado a distribuição de Mrx9p, Mss51p, Prx1p e marcadores de subunidades ribossomais (bL31m e mS37).

Nas cepas testadas (*WT/MRX9-HA*, $\Delta mrx9$ e *GAL/MRX9-HA*), os gradientes de sacarose na presença de Triton não mostraram picos claros da LSU e SSU, conforme visto, respectivamente, para bL31m e mS37. Mrx9p-HA apresenta picos nas frações mais leves como 9 e 10 na linhagem WT, mostrando não estar presente juntamente com o mitorribossomo na fração 1. Mrx9p-HA super-expresso com o uso do promotor *GAL10* permaneceu com um pico na fração 11 e mais espalhado entre as frações 10-14. Já Mss51p apresentou picos no topo do gradiente em todas as linhagens. Como esperado, o controle Prx1p mostrou estar no topo do gradiente. Este controle apresenta-se em bandas da proteína não processada (U) e processada (P) (Figura 17).

Com o uso de Triton, Mrx9p-HA e Mss51p não aparecem associados ao mitorribossomo devido a este detergente ser mais rigoroso e dissociar as proteínas do ribossomo da organela. Como mencionado, foi testado também o uso de Digitonina, havendo, assim, uma distribuição diferente. Na linhagem WT, Mrx9p-HA aparece presente junto ao mitorribossomo na fração 1, e um pouco espalhado entre as frações 1-10. Já na linhagem em que está super-expresso, a proteína aparece discretamente na fração 1 e mais espalhada entre

as frações 4-9 (Figura 18). Esses resultados indicam que Mrx9p está associado às subunidades do mitorribossomo como sugerido anteriormente (MÖLLER-HERGT et al., 2018; SINGH et al., 2020), mas sua associação é perdida em condições rigorosas (Figura 17).

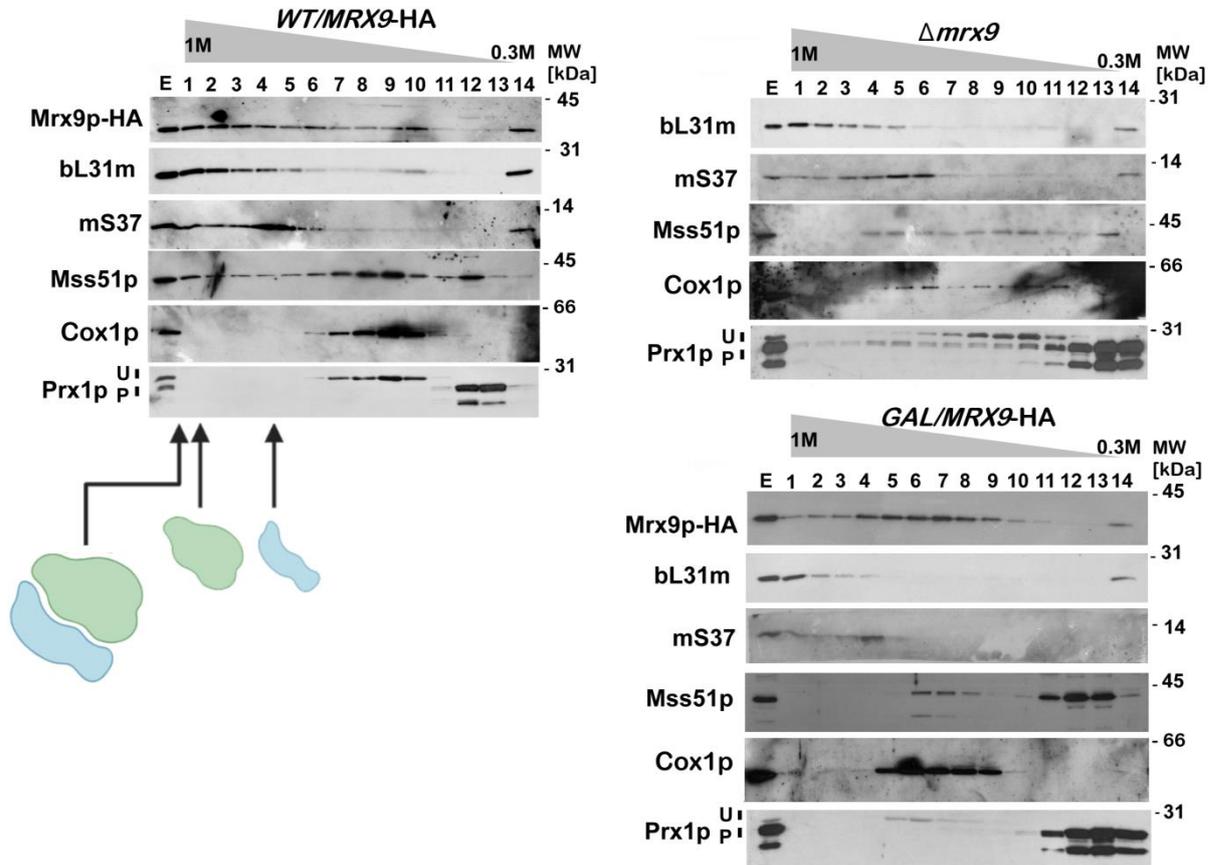


Figura 18. Sedimentação de Mrx9p e proteínas ribossomais em gradientes de sacarose com Digitonina. Mitocôndrias (5 mg de proteínas) foram isoladas das linhagens WT/MRX9-HA, $\Delta mrx9$ e GAL/MRX9-HA. As proteínas foram solubilizadas no tampão de extração do mitorribossomo à 4°C por 5 minutos, contendo HEPES 20 mM (pH 7.5); KCl 25 mM; MgCl₂ 0.5 mM; PMSF 0.5 mM e Digitonina 0.8%. O extrato (E) obtido foi centrifugado e aplicado em um gradiente de sacarose linear 0.3-1M, contendo HEPES 20 mM (pH 7.4); KCl 25 mM; MgCl₂ 0.5 mM; PMSF 0.5 mM e Digitonina 0.1%. Após a última centrifugação de 4h10 por 152.320 g à 4°C, foram coletadas 14 frações a partir da fração do fundo (1) até o topo (14) do gradiente. Um total de 36.5 μ L de cada fração foi aplicado em gel SDS-PAGE 12.5% de acrilamida para realização de *western blot*. Foi avaliado a distribuição de Mrx9p, Mss51p, Cox1p, Prx1p e marcadores de subunidades ribossomais (bL31m e mS37).

Conforme explicado no início deste trabalho (Figura 3), estudos evidenciaram que Cox1p recém-sintetizado pelos mitorribossomos forma um complexo com Mss51p e duas chaperonas específicas: Cox14p e Coa3p. Essas interações sequestram Mss51p em um complexo de pré-montagem com Cox1p de aproximadamente 450 kDa (BARRIENTOS et al., 2004). Nos gradientes da linhagem WT, esse complexo pode ser observado nas frações 8 e 9. Quando há o surgimento de proteínas necessárias para montagem definitiva de Cox1p no complexo IV da cadeia respiratória, Mss51p é liberado da sua associação com Cox1p formando um complexo de quase 120 kDa com a chaperona Ssc1p (Hsp70), sendo disponibilizado posteriormente para ativar mais rodadas de tradução de *COX1* (FONTANESI

et al., 2010). Este complexo menor se apresentou na fração 12 dos gradientes. Como esperado, Mss51p também se apresentou juntamente com o mitorribossomo na fração 1 (Figura 18).

Na linhagem mutante $\Delta mrx9$, Mss51p perde sua associação com o mitorribossomo na fração 1 e aparenta estar mais espalhado entre as frações 4-13, podendo estar presente no complexo de 450 kDa e no complexo de 120 kDa. Ainda, na linhagem *GAL/MRX9-HA* Mss51p também perde sua associação com o mitorribossomo e mostra estar em picos nas frações do topo e um pouco distribuído nas frações 6-8. Coincidentemente, Mrx9p em excesso divide picos com Mss51p neste gradiente. Em mutantes $\Delta mrx9$, não há picos claros de Mss51p no complexo maior de pré-montagem de Cox1p (Mss51/Cox1/Coa3/Cox14) e no complexo menor (Mss51/Ssc1) (Figura 18).

Os resultados dos gradientes com o uso de Digitonina propõem que o excesso de Mrx9p dificulta a associação de Mss51p ao mitorribossomo, possivelmente dando origem a tradução incompleta de Cox1p, sugerindo, assim, mudanças nos complexo de pré-montagem de Cox1p.

4.7 Super-expressão de *MRX9* em linhagens desprovidas de íntrons mitocondriais

No genoma mitocondrial de *S. cerevisiae*, *COX1* é transcrito em um mRNA policistrônico contendo *ATP8 /ATP6* antes de ser processado individualmente para a tradução. Assim como o mRNA de *COB*, o transcrito de *COX1* possui inúmeras regiões contendo íntrons (MANON; GUERIN, 1989). A maioria das cepas de laboratório utilizadas em estudos possui estas múltiplas regiões, sendo íntrons do grupo I (al3, al4, al5 α e al5 β) e íntrons do grupo II (al1, al2 e al5 γ) (DUJON, 1989). Ambos os grupos possuem a habilidade de atuar como elementos móveis. O grupo I, por exemplo, codifica endonucleases que clivam seus próprios íntrons, como é o caso de al3 que codifica *I-SceIII*, juntando assim dois éxons flaqueadores (LAZOWSKA et al., 1994).

Proteínas denominadas “maturases” também são necessárias para o splicing do transcrito primário de *COX1*. Esses fatores são codificados por quadros de leituras dentro dos íntrons de *COX1* e *COB* (KENNELL et al., 1993; LAZOWSKA et al., 1989). Pode-se ressaltar que a excisão dos íntrons é dependente ainda de genes nucleares como *SUV3*, *MSS116* e *COX24*. Nas leveduras *S. cerevisiae* e *Neurospora crassa*, Mss116p foi descoberto como um fator para splicing de todos os íntrons presentes no mtDNA (HUANG et al., 2005). Já Suv3p foi implicado para estabilizar o mRNA de *COX1*, havendo associação com os íntrons do grupo I (GOLIK et al., 2004). Cox24p foi uma das últimas proteínas descobertas

que também atua no processamento do transcrito de *COX1*, realizando a remoção dos íntrons al3 do grupo I e al2 do grupo II (BARROS et al., 2006).

Tendo em vista o possível papel de Mrx9p na tradução de *COX1*, foi investigado os fenótipos de super-expressão de *MRX9* em cepas com ausência de íntrons no seu mtDNA (W303-I^o ou MR6-I^o) (Figura 19C). Estudos anteriores relataram que o surgimento de Cox1p truncado, como na Figura 11A deste trabalho, ocorre exclusivamente na presença de íntrons no mRNA de *COX1*, sugerindo um não processamento completo deste transcrito (ZAMBRANO et al., 2007).

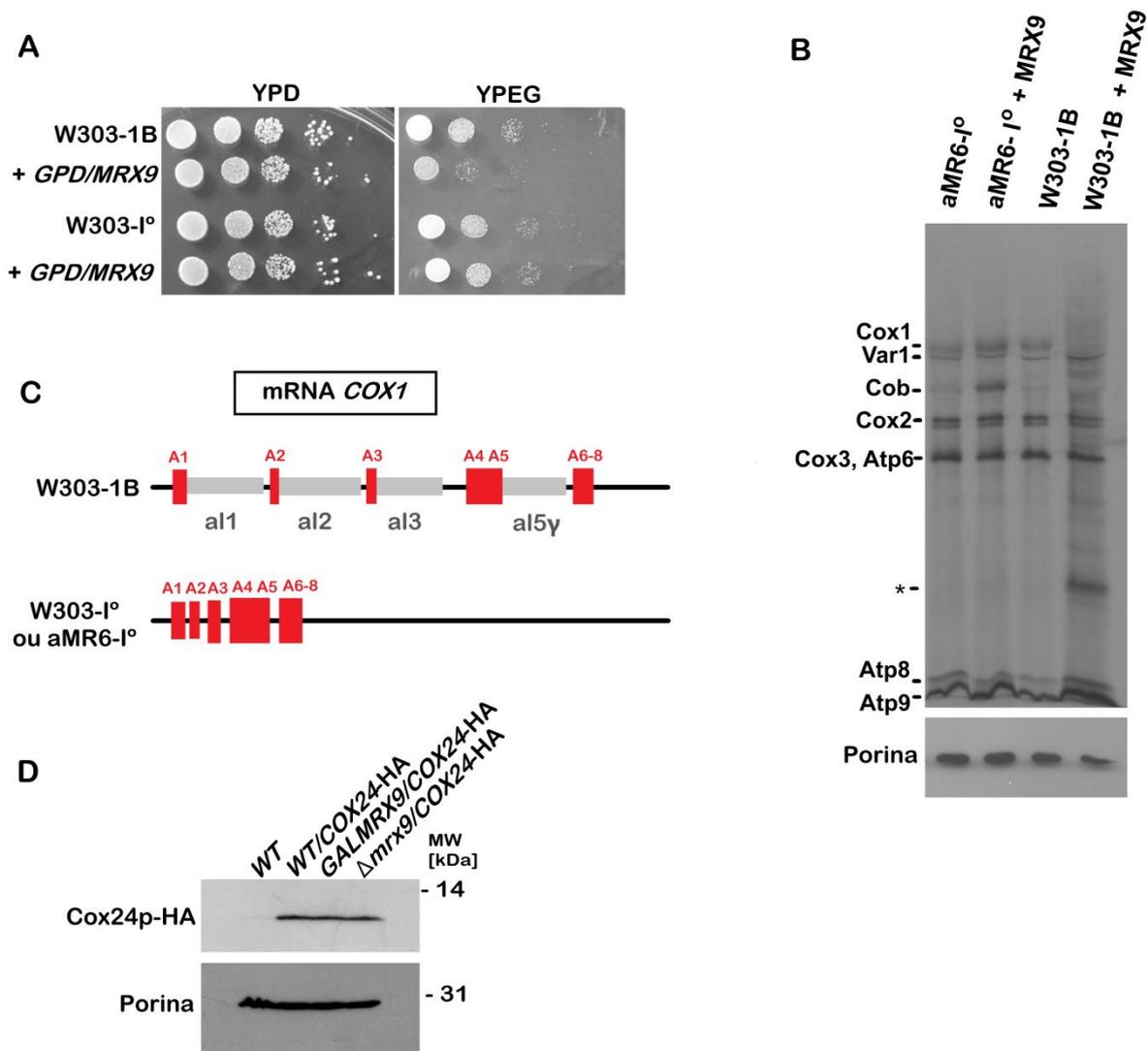


Figura 19. Excesso de Mrx9p em cepas sem íntrons e níveis endógenos de Cox24p. **A)** Avaliação da capacidade de crescimento das linhagens com íntrons (W303-1B e W303-1B + *GPD/MRX9*) e sem íntrons (W303-I^o e W303-I^o + *GPD/MRX9*). As leveduras cresceram em meio rico com glicose (YPD) à 30°C. Em seguida, foram plaqueadas em meio rico YPD e em meio contendo fontes de carbono não fermentáveis (YPEG). A foto representa o crescimento de 24 horas. **B)** Capacidade de tradução de proteínas mitocondriais nas linhagens com íntrons (W303-1B e W303-1B + *GAL/MRX9*) e sem íntrons (aMR6-I^o e aMR6-I^o + *GAL/MRX9*). A posição esperada para o polipeptídeo mitocondrial está indicada à esquerda dos dois filmes. As linhagens foram incubadas a 30°C em meio com galactose. A incorporação de metionina [³⁵S] e cisteína [³⁵S] nas proteínas mitocondriais foi realizada *in vivo* em temperatura ambiente. No painel em cima, fez-se a separação das proteínas em gel de acrilamida 17,5%, e no painel a baixo em acrilamida 12,5%, 6M Ureia. O uso do anticorpo

anti-porina (Invitrogen™) serviu como controle do carregamento de proteínas no gel. **C)** Composição de íntrons no mRNA de *COXI* na linhagem selvagem W303-1B, havendo presença de íntrons do grupo I (al3) e II (al1, al2 e al5γ). Disposição dos éxons no mRNA de *COXI* em linhagens sem íntrons (W303-I° ou aMR6-I°). **D)** Avaliação dos níveis endógenos de Cox24p. Mitocôndrias das linhagens indicadas expressando Cox24p-HA foram isoladas de células crescidas em meio rico com galactose (YPGal). 40 µg de proteínas mitocondriais foram aplicadas em gel SDS-PAGE 12.5%, transferidas para uma membrana de nitrocelulose e submetidas ao anticorpo anti-HA (Sigma). O uso do anticorpo anti-porina (Invitrogen™) serviu como controle do carregamento de proteínas no gel.

Curiosamente, a super-expressão de *MRX9* sob o controle do promotor forte *GPD* não causou nenhuma deficiência no crescimento respiratório em mtDNA sem íntrons. No entanto, a cepa que abriga íntrons demonstra um crescimento lento em 24 horas (Figura 19A). O acúmulo de produtos mitocondriais recém-sintetizados não é afetado na cepa sem íntrons mitocondriais. Novamente, a tradução de *COXI* é prejudicada em situações de excesso de Mrx9p na cepa que abriga íntrons, ressaltando, portanto, que a funcionalidade de Mrx9p na expressão de *COXI* é dependente da presença de íntrons no genoma da organela (Figura 19B).

Ainda, foi analisado a relação de Mrx9p com outra proteína já mencionada que faz processamento de íntrons no transcrito de *COXI*: Cox24p. Nesse caso, as linhagens possuíam um *tag* HA na porção C-terminal de Cox24p. Foi observado que os níveis endógenos de Cox24p não possuem alteração em linhagens super-expressando *MRX9* e em mutantes nulo $\Delta mrx9$ (Figura 19D).

5 DISCUSSÃO

A descoberta do complexo MIOREX nas mitocôndrias de *S. cerevisiae* mostrou uma nova forma de organização da expressão gênica mitocondrial. A existência de algumas proteínas com funções desconhecidas, denominadas Mrx, apontam para possíveis fatores regulatórios no processo de síntese proteica através dos mitorribossomos. Este tipo de regulação na tradução caracteriza um controle eficiente de síntese das subunidades proteicas que compõem o sistema de fosforilação oxidativa, no qual há a necessidade de um equilíbrio estequiométrico de subunidades codificadas pelo genoma mitocondrial e nuclear (KEHREIN et al., 2015). Um exemplo robusto desta organização pode ser visto para um componente do complexo IV da cadeia respiratória, Cox1p. As etapas envolvidas no processamento de íntrons, tradução e inserção deste polipeptídeo na membrana interna mitocondrial são dependentes de diversos fatores proteicos regulatórios (MAYS et al., 2019).

A fim de buscar novos fatores regulatórios da tradução mitocondrial realizou-se a super-expressão de genes *MRX*, no qual foi possível identificar uma proteína com possível função na regulação da expressão de *COX1*. O excesso da proteína Mrx9p acarreta em fenótipos de toxicidade para as mitocôndrias de leveduras. Nas condições testadas sob o controle do promotor forte *GAL10*, as linhagens reduziram a atividade do complexo IV da fosforilação oxidativa, no qual a capacidade de tradução afetou a síntese de Cox1p, havendo também o surgimento de um polipeptídeo truncado. Estudos anteriores caracterizaram esta banda adicional e a renomearam de mp15, o qual possui aproximadamente 15 kDa e surge a partir de uma terminação precoce na tradução do mRNA de *COX1*. Normalmente, mp15 está associado com a ausência do ativador de tradução Mss51p, que auxilia no alongamento da tradução do mRNA de *COX1*, além de realizar um *loop* regulatório no processo de pré-montagem do módulo de Cox1p na membrana interna (ZAMBRANO et al., 2007). De fato, os experimentos de super-expressão confirmaram que o excesso de um repressor de tradução ou regulador negativo resultaria em perda de tradução de uma dada proteína específica. Como esperado, a tradução foi diminuída para o transcrito *ATP8/6* em linhagens super-expressando *MRX5 (SMT1)* (RAK et al., 2016).

A ocorrência de uma versão defeituosa de Cox1p em linhagens com excesso de Mrx9p mostrou estar relacionada com a presença de íntrons no mtDNA. Os resultados obtidos em linhagens sem íntrons resultaram na tradução normal de Cox1p nas condições de super-expressão, indicando que Mrx9p possivelmente atua no processamento de íntrons ou interage com proteínas que atuam nestes splicings. Cepas de *S. cerevisiae* sem íntrons mitocondriais

foram isoladas ao longo dos anos (SERAPHIN et al., 1987) e muitos estudos propõem que a remoção dessas regiões tem consequências para a fisiologia e função mitocondrial (RUDAN et al., 2018).

As estratégias para relacionar os efeitos de Mrx9p com fatores de processamento de mRNAs já caracterizados também foram avaliadas. Cox24p ou mS38 foi descoberto como uma proteína importada para as mitocôndrias das leveduras, onde se associa com a subunidade menor do mitorribossomo e realiza splicing de íntrons do grupo I e II no transcrito primário de *COX1*. Mutantes Δcox24 são deficientes respiratórios e não traduzem Cox1p, sendo a respiração mitocondrial levemente recuperada em cepas sem íntrons (BARROS et al., 2006). Com o uso do *tag* HA na porção C-terminal de Cox24p, os níveis endógenos da proteína foram avaliados em condições de excesso de Mrx9p e em mutantes Δmrx9 . Cox24p não teve alteração em sua quantidade nas mitocôndrias de ambas as linhagens. Contudo, este resultado não descarta uma possível relação de interação entre as duas proteínas.

Mrx9p foi visualizado no grande complexo MIOREX juntamente com o mitorribossomo (KEHREIN et al., 2015), exibindo até então funções desconhecidas na expressão gênica em mitocôndrias. Neste trabalho, realizaram-se ensaios de sua localização intramitocondrial exata, demonstrando que Mrx9p está na membrana interna, voltado para matriz. A deleção do gene *MRX9* não propiciou quaisquer deficiências respiratórias para a levedura, assim como na capacidade de traduzir polipeptídeos codificados pelo genoma mitocondrial. Os resultados mostram que o excesso da proteína acarreta em fenótipos mais claros em torno dos processos de tradução mitocondrial do que a disrupção da ORF em questão, o que corrobora a hipótese que a proteína exerce um papel regulatório na tradução mitocondrial.

A super-expressão de *MRX9* foi avaliada mais detalhadamente com o uso de diferentes promotores, havendo um rendimento variável da proteína. Os resultados apontaram que o excesso de Mrx9p nas células cultivadas em condição fermentativa foi tóxico quando as mesmas foram forçadas para a adaptação respiratória em meios contendo fontes de carbonos não fermentáveis. Portanto, a super-expressão de *MRX9* atrasa a remodelação metabólica em leveduras que estão transitando da fermentação para a respiração mitocondrial. Isto pode ser confirmado também na capacidade de traduzir polipeptídeos mitocondriais nos mesmos cenários de transição. Novamente, o mutante Δmrx9 não apresentou qualquer dificuldade fenotípica em exercer mudança de metabolismo.

Nas análises do padrão de sedimentação de Mrx9p com o mitorribossomo prontamente montado e suas subunidades soltas (LSU e SSU), a proteína mostrou uma distribuição

juntamente com o ribossomo da organela nos gradientes de sacarose onde a extração foi realizada com o detergente digitonina, confirmando, portanto, sua associação com o mitorribossomo em estudos anteriores (MÖLLER-HERGT et al., 2018). Curiosamente, o regulador de tradução Mss51p em cepas super-expressando *MRX9* perde sua associação com o mitorribossomo nas frações pesadas do gradiente, e aparenta não estar sequestrado de forma eficiente no complexo de pré-montagem de Cox1p, juntamente com Cox14p e Coa3p (BARRIENTOS et al., 2004). Ainda nestas condições de super-expressão, Mss51p demonstrou ter mais presença em outro complexo menor nas frações leves, sendo esse um complexo de reciclagem com a proteína Ssc1p.

Uma hipótese plausível para o papel de Mrx9p na regulação da tradução de *COX1* seria através da distribuição e disponibilidade de Mss51p para exercer novos ciclos de tradução de *COX1*. Embora não tenha sido observado uma interação direta de Mrx9p com Mss51p em ensaios de *pull down* realizados (dados não mostrados), estudos anteriores indicaram uma proximidade física entre essas duas proteínas (SINGH et al., 2020). No futuro, os estudos do interactoma de Mrx9p podem revelar o papel específico da proteína nos complexos nos quais Mss51p interage.

6 CONCLUSÕES

- Mrx9p é um componente do complexo MIOREX em *S. cerevisiae* que possui localização na membrana interna mitocondrial, voltado para matriz. A ausência do gene em leveduras não provoca qualquer fenótipo de deficiência respiratória ou incapacidade de traduzir polipeptídeos mitocondriais.
- A super-expressão de *MRX9* propicia crescimento lento das células cultivadas em meios que avaliam a atividade de respiração mitocondrial, havendo ainda déficit na tradução da subunidade 1 da citocromo *c* oxidase. O excesso de Mrx9p acarretou numa terminação precoce da tradução do mRNA de *COX1* através dos mitorribossomos. A versão defeituosa deste polipeptídeo recém-sintetizado é estruturalmente menor do que Cox1p selvagem e sua ocorrência está associada com altos níveis de Mrx9p em cepas com íntrons.
- A super-expressão de *MRX9* resultou em baixa atividade do complexo IV, reforçando sua relação com Cox1p. Ainda, a avaliação de transição do metabolismo fermentativo para a respiração mitocondrial propõe que o excesso deste componente do complexo MIOREX atrasa a adaptação das leveduras ao metabolismo respiratório.
- A funcionalidade de Mrx9p está possivelmente associada com o efeito regulatório de Mss51p na tradução de *COX1*, visto que a proteína com altos rendimentos proporciona condições em que Mss51p não interage com o mitorribossomo. Apesar do papel específico de Mrx9p não estar claro na expressão de *COX1* nas mitocôndrias de *S. cerevisiae*, os resultados obtidos neste trabalho elucidaram informações fundamentais para cumprir este objetivo em estudos mitocondriais futuros.

REFERÊNCIAS

- ALLAN, C. M.; AWAD, A. M.; JOHNSON, J. S.; SHIRASAKI, D. I.; WANG, C.; BLABY-HAAS, C. E.; MERCHANT, S. S.; LOO, J. A.; CLARKE, C. F. Identification of Coq11, a new coenzyme Q biosynthetic protein in the CoQ-synthome in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biol Chem**, v. 290, p. 7517-753, 2015.
- ANDREWS, M. T.; MALLORY, A. B.; HESS, C.; NAPOLITANO, M. W.; BJORK, J. A. Seasonal changes in brown adipose tissue mitochondria in a mammalian hibernator: from gene expression to function. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 311, p. 325–336, 2016.
- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Current Protocols in Molecular Biology**, v. 1, 1989.
- BARRIENTOS, A.; BARROS, M. H.; VALNOT, I.; ROTIG, A.; RUSTIN, P.; TZAGOLOFF, A. Cytochrome oxidase in health and disease. **Gene**, v. 286, p. 53–6, 2002.
- BARRIENTOS, A. Mitochondriolus: assembling mitoribosomes. **Oncotarget**, v. 6, n. 19, 2015.
- BARRIENTOS, A. Yeast of models of human mitochondrial diseases. **IUBMB Life**, v. 55, p. 83-95, 2003.
- BARRIENTOS, A. ZAMBRANO, A.; TZAGOLOFF, A. Mss51p and Cox14p jointly regulate mitochondrial Cox1p expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO J.**, v. 23, p. 3472–3482, 2004.
- BARROS, M. H.; MYERS, A. M.; VAN DRIESCHE, S.; TZAGOLOFF, A. *COX24* codes for a mitochondrial protein required for processing of the *COX1* transcript. **J. Biol. Chem.**, v. 281, p. 3743–3751, 2006.
- BARROS, M. H.; TZAGOLOFF A. Aep3p-dependent translation of yeast mitochondrial *ATP8*. **Mol Biol Cell**, v. 28, p. 1426-1434, 2017.
- BARROS, M. H.; TZAGOLOFF A. Regulation of the heme A biosynthetic pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Lett**, v. 516, p. 119-123, 2002.
- BIMBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 7, n. 6, 1979.
- BITTER, G. A.; EGAN, K. W. Expression of heterologous genes in *Saccharomyces cerevisiae* from vectors utilizing the glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase gene promoter. **Gene**, v. 32 p. 263-274, 1984.
- BONITZ, S. G.; BERLANI, R.; CORUZZI, G.; MACINO, G.; NOBREGA, F. G.; NOBREGA, M. P.; THALENFELD, B. E.; TZAGOLOFF, A. Codon recognition rules in yeast mitochondria. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 77, n. 6, p. 3167-3170, 1980.
- BRADLEY, M. C.; YANG, K.; FERNÁNDEZ-DEL-RÍO, L.; SHIRIHAI, O. S.; BARROS, M. H.; CLARKE, C. F. *COQ11* deletion mitigates respiratory deficiency caused by mutations in the gene encoding the coenzyme Q chaperone protein Coq10. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 18, p. 6023-6042, 2020.

BROWN, N. G.; COSTANZO, M. C.; FOX, T. D. Interactions among three proteins that specifically activate translation of the mitochondrial *COX3* mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.** v. 14, p. 1045–1053, 1994.

CABALLERO, A.; UGIDOS, A.; LIU, B.; ÖLING, D.; KVINT, K.; HAO, X.; MIGNAT, C.; NACHIN, L.; MOLIN, M.; NYSTRÖM, T. Absence of mitochondrial translation control proteins extends life span by activating sirtuin-dependent silencing. **Mol. Cell.**, v. 42, p. 390–400, 2011.

CARROLL, C. J.; ISOHANNI, P.; POYHONEN, R.; EURO, L.; RICHTER, U.; BRILHANTE, V.; GOTZ, A.; LAHTINEN, T.; PAETAU, A.; PIHKO, H.; BATTERSBY, B.J.; TYYNISMAA, H.; SUOMALAINEN, A. Whole-exome sequencing identifies a mutation in the mitochondrial ribosome protein MRPL44 to underlie mitochondrial infantile cardiomyopathy. **Journal of Medical Genetics**, v. 50, n. 3, p. 151-159, 2013.

CHEN, W.; DIECKMANN, C. L. Cbp1p is required for message stability following 5'-processing of *COB* mRNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 24, p. 16574-16578, 1994.

CHOI, A.; BARRIENTOS, A. **Sucrose gradiente sedimentation analysis of mitochondrial ribosomes**, 2020.

CHRISTIAN, B. E.; SPREMULLI, L. L. Mechanism of protein biosynthesis in mammalian mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1819, n. 9, p. 1035-1054, 2012.

CLAROS, M.G.; PEREA, J.; SHU, Y.M.; SAMATEY, F.A.; POPOT, J.L.; JACQ, C. Limitations to in vivo import of hydrophobic proteins into yeast mitochondria: the case of a cytoplasmically synthesized apocytochrome b. **European Journal of Biochemistry**, v. 228, p. 762-771, 1995.

COSTANZO, M. C.; FOX, T. D. Control of mitochondrial expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Annu. Rev. Genet.**, v. 24, p. 91–113, 1990.

COSTANZO, M. C.; FOX, T. D. Product of *Saccharomyces cerevisiae* nuclear gene *PET494* activates translation of a specific mitochondrial mRNA. **Mol. Cell. Biol.**, v. 6, p. 3694–3703, 1986.

COSTANZO, M. C.; FOX, T. D. Specific translational activation by nuclear gene products occurs in the 5' untranslated leader of a yeast mitochondrial mRNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 85, p.2677– 2681, 1988.

COUVILLION, M. T.; SOTO, I. C.; SHIPKOVENSKA, G.; CHURCHMAN, L. Synchronized mitochondrial and cytosolic translation programs. **Nature**, v. 533, p. 499–503, 2016.

DAUM, G.; BÖHNI, P. C.; SCHATZ, G. 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. 557, p. 13038-13033, 1982.

- DECOSTER, E.; SIMON, M.; HATAT, D.; FAYE, G. The *MSS51* gene product is required for the translation of the *COX1* mRNA in yeast mitochondria. **Mol Gen Genet.**, v. 224, p. 111-118, 1990.
- DE DEKEN, R. H. The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. **J. Gen. Microbiol.**, v. 44, p. 149–156, 1966.
- DERISI, J. L.; IYER, V. R.; BROWN, P. O. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. **Science.**, v. 24, p. 680-686, 1997.
- DE SILVA, D.; FONTANESI, F.; BARRIENTOS, A. The DEAD box protein Mrh4 functions in the assembly of the mitochondrial large ribosomal subunit. **Cell Metab.**, v. 18, p. 712-725, 2013.
- DE SILVA, D.; POLIQUIN, S.; ZENG, R.; ZAMUDIO-OCHOA, A.; MARRERO, N.; PEREZ-MARTINEZ, X.; FONTANESI, F.; BARRIENTOS, A. The DEAD-box helicase Mss116 plays distinct roles in mitochondrial ribogenesis and mRNA-specific translation. **Nucleic Acids Res.**, v. 45, p. 6628–6643, 2017.
- DUJON, B. Group I introns as mobile genetic elements: Facts and mechanistic speculations — a review. **Gene (Amst.)**, v. 82, p. 91–114, 1989.
- ELLIS, T. P.; HELFENBEIN, K. G.; TZAGOLOFF, A.; DIECKMANN, C. L. Aep3p stabilizes the mitochondrial bicistronic mRNA encoding subunits 6 and 8 of the H⁺-translocating ATP synthase of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 15728–15733, 2004.
- EMDADUL, M.; GRASSO, D.; MILLER, C.; SPREMULLI, L. L.; SAADA, A. The effect of mutated mitochondrial ribosomal proteins S16 and S22 on the assembly of the small and large ribosomal subunits in human mitochondria. **Mitochondrion**, v. 8, n. 3, p. 254-261, 2008.
- FAYE, G.; KUJAWA, C.; FUKUHARA, H. Physical and genetic organization of petite and grande yeast mitochondrial DNA. IV. In vivo transcription products of mitochondrial DNA and localization of 23 S ribosomal RNA in *petite* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. **J Mol Biol**, v. 88, p. 185-203, 1974.
- FELDMAN, H. **Yeast: molecular and cell biology**, 2010.
- FIORI, A.; PEREZ-MARTINEZ, X.; FOX, T. D. Overexpression of the *COX2* translational activator, Pet111p, prevents translation of *COX1* mRNA and cytochrome *c* oxidase assembly in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Microbiol.**, v. 56, p. 1689–1704, 2005.
- FOURY, F.; ROGANTI, T.; LECRENIER, N.; PURNELLE, B. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Lett**, v. 440, p. 325-331, 1998.
- FRANCO, L. V. R.; MODA, B. S.; SOARES, M. A. K.; BARROS, M. H. Msc6p is required for translation initiation in the absence of formylated Met-tRNA^{fmet}. **Febs J**, v. 286, p. 1407-1419, 2019.

FONTANESI, F.; SOTO, I. C.; HORN, D.; BARRIENTOS, A. Mss51 and Ssc1 facilitate translational regulation of cytochrome *c* oxidase biogenesis. **Mol. Cell. Biol.**, v. 30, p. 245–259, 2010.

GERSHON, H.; GERSHON, D. The budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, as a model for aging research: a critical review. **Mechanisms of ageing and development**, v. 120, p. 1-22, 2000.

GLERUM, D. M.; SHTANKO, A.; TZAGOLOFF, A. *SCO1* and *SCO2* Act as High Copy Suppressors of a Mitochondrial Copper Recruitment Defect in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 34, p. 20531-20535, 1996.

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. 546-566, 1996.

GÖKE A.; SCHROTT S.; MIZRAK A.; BELVY V.; OSMAN C.; WALTER P. Mrx6 regulates mitochondrial DNA copy number in *S. cerevisiae* by engaging the evolutionarily conserved Lon protease Pim1. **Mol Biol Cell**, 2019.

GOLIK, P.; SZCZEPANEK, T.; BARTNIK, E.; STEPEIN, P. P.; LAZOWSKA, J. The *SUV3* gene from *Saccharomyces douglasii* is a functional equivalent of its *Saccharomyces cerevisiae* orthologue and is essential for respiratory growth. **FEMS Yeast Res.**, v. 4, p. 477–485, 2004.

GOMES, F.; PALMA, F. R.; BARROS, M. H.; TSUCHIDA, E. T.; TURANO, H. G.; ALEGRIA, T. G. P.; DEMASI, M.; NETTO, L. E.S. Proteolytic cleavage by the inner membrane peptidase (IMP) complex or Oct1 peptidase controls the localization of the yeast peroxiredoxin Prx1 to distinct mitochondrial compartments. **J. Biol. Chem.**, v. 292, n. 41, 2017.

GRENN-WILLMS, N. S.; FOX, T. D.; COSTANZO, M. C. Functional interactions between yeast mitochondrial ribosomes and mRNA 5' untranslated leaders. **Mol. Cell. Biol.**, v. 18, p. 1826–1834, 1998.

GRENN-WILLMS, N. S.; BUTLER, C. A.; DUNSTAN, H. M.; FOX, T. D. Pet111p, an inner membrane-bound translational activator that limits expression of the *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial gene *COX2*. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 6392–6397, 2001.

GRUSCHKE, S.; KEHREIN, K.; RÖMPLER, K.; GRÖNE, K.; ISRAEL, L.; IMHOF, A.; HERRMANN, J. M.; OTT, M.; RÖMPLER, K. Cbp3-Cbp6 interacts with the yeast mitochondrial ribosomal tunnel exit and promotes cytochrome *b* synthesis and assembly. **J. Cell Biol.**, v. 193, p. 1101–1114, 2011.

GRUSCHKE, S.; RÖMPLER, K.; HILDENBEUTEL, M.; KEHREIN, K.; KÜHL, I.; BONNEFOY, N.; OTT, M. The Cbp3-Cbp6 complex coordinates cytochrome *b* synthesis with bc (1) complex assembly in yeast mitochondria. **J. Cell Biol.**, v. 199, p. 137–150, 2012.

GUEDES-MONTEIRO, R. F.; FERREIRA-JUNIOR, J. R.; BLEICHER, L.; NÓBREGA, F. G, BARRIENTOS, A.; BARROS, M. H. Mitochondrial ribosome bL34 mutants present diminished translation of cytochrome *c* oxidase subunits. **Cell Biology International**, v. 42, n. 6, 2018.

- HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, v. 166, n. 4, p. 557-580, 1983.
- HERRMANN, J. M.; STUART, R. A.; CRAIG, E. A.; NEUPERT, W. Mitochondrial heat shock protein 70, a molecular chaperone for proteins encoded by mitochondrial DNA. **J. Cell Biol**, v. 127, p. 893-902, 1994.
- HERRMANN, J. M.; WOELLHAF, M. W.; BONNEFOY, N. Control of protein synthesis in yeast mitochondria: the concept of translational activators. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.1833, p. 286–294, 2013.
- HILL, J. E., MYERS, A. M., KOERNER, T. J., TZAGOLOFF, A. Yeast/*E.coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. **Yeast**, p. 163-167, 1985.
- HITZEMAN, R. A.; HAGIE, F. E.; LEVINE, H. L.; GOEDDEL, D.V.; AMMERER, G.; HALL, B. D. Expression of a human gene for interferon in yeast. **Nature**, v. 293, p. 717-722, 1981.
- HUANG, H. R.; ROWE, C. E., MOHR, S.; JIANG, Y.; LAMBOWITZ, A. M.; PERLMAN, P. S. The splicing of yeast mitochondrial group I and group II introns requires a DEAD-box protein with RNA chaperone function. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 102, p. 163–168, 2005.
- KAGAWA, Y.; RACKER, E. Partial Resolution of the Enzymes Catalyzing Oxidative Phosphorylation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 241, n, 10, p. 2475-2482, 1966.
- KEHREIN, K.; BONNEFOY, N.; OTT, M. Mitochondrial protein synthesis: efficiency and accuracy. **Antioxid. Redox. Signal. Epub ahead of print.**, 2012.
- KEHREIN, K.; SCHILLING, R.; 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**, v. 10, n. 6, p. 843-853, 2015.
- KENNEL, J. C.; MORAN, J. V.; PERLMAN, P. S.; BUTOW, R. A.; LAMBOWITZ, A. M. Reverse transcriptase activity associated with maturase-encoding group II introns in yeast mitochondria. **Cell**, v. 73, p. 133–146, 1993.
- KRAUSE-BUCHHOLZ, U.; SCHÖBEL, K.; LAUFFER, S.; RÖDEL, G. *Saccharomyces cerevisiae* translational activator Cbs1p is associated with translationally active mitochondrial ribosomes. **Biol. Chem.**, v. 386, p. 407–415, 2005.
- KRAUSE-BUCHHOLZ, U.; BARTH, K.; DOMBROWSKI, C.; RÖDEL, G. *Saccharomyces cerevisiae* translational activator Cbs2p is associated with mitochondrial ribosomes. **Curr. Genet.**, v. 46, p. 20–28, 2004.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.
- LAZOWSKA, J.; CLAISSE, M.; GARGOURI, A.; KOTYLAK, Z.; SPYRIDAKIS, A.; SLONIMSKI, P. P. Protein encoded by the third intron of cytochrome *b* gene in *Saccharomyces cerevisiae* is an mRNA maturase: Analysis of mitochondrial mutants, RNA transcripts proteins and evolutionary relationships **J. Mol. Biol.**, v. 205, p. 275–289, 1989.

- LAZOWSKA, J.; MEUNIER, B.; MACADRE, C. Homing of a group II intron in yeast mitochondrial DNA is accompanied by unidirectional co-conversion of upstream-located markers. **EMBO J.**, v. 13, p. 4963–4972, 1994.
- LEE, C.; TIBBEYTTTS, A. S.; KRAMER, G.; APPLING, D. R. Yeast Aep3p is an accessory factor in initiation of mitochondrial translation. **J. Biol. Chem.**, v. 284, p. 34116–34125, 2009.
- LILL, R.; MÜHLENHOFF, U. Iron-Sulfur Protein Biogenesis in Eukaryotes: Components and Mechanisms. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 22, p. 457-486, 2006.
- 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. **Mol. Biol. Evol.**, v. 28, p. 2935–2948, 2011.
- LÓPEZ, C.; BLASCO, M. A.; PARTRIDGE, L.; SERRANO, M.; KROEMER, G. The hallmarks of aging. **Cell Press**, v. 153, n. 6, p. 1194-1217, 2013.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDAL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K.S.; BUCKLEY, D.H.; STAHL, D.A. **Microbiologia de brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.
- MANON, S.; GUERIN, M. Modifications of the relative proteolipid composition in the ATP synthase of a respiratory competent mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 985, p. 127–132, 1989.
- MANTHEY, G. M.; MCEWNJE. The product of the nuclear gene *PET309* is required for translation of mature mRNA and stability or production of intron-containing RNAs derived from the mitochondrial *COX1* locus of *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO J.**, v. 14, p. 4031-4043, 1995.
- MANTHEY, G. M.; PRZYBYLA-ZAWISLAK, B. D.; MCEWEN, J. E. The *Saccharomyces cerevisiae* Pet309 protein is embedded in the mitochondrial inner membrane. **FEBS J.**, v. 255, p. 156–161, 1998.
- MARBOIS, B.; GIN, P.; FAULL, K. F.; POON, W. W.; LEE, P. T.; STRAHAN, J.; SHEPHERD, J. N.; CLARKE, C. F. Coq3 and Coq4 Define a Polypeptide Complex in Yeast Mitochondria for the Biosynthesis of Coenzyme Q. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 21, p. 20231-20238, 2005.
- MARTIN, W.; HERRMANN, R.G. Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and why? **Plant Physiology**, v. 118, p. 9-17, 1998.
- MAY, A. I.; PRESCOTT, M.; OHSUMI, Y. Autophagy facilitates adaptation of budding yeast to respiratory growth by recycling serine for one-carbon metabolism. **Nature communications**, v. 11, p. 1-14, 2020.
- MAYS, J. N.; CAMACHO-VILLASANA, Y.; GARCIA-VILLEGAS, R.; PEREZ-MARTINEZ, X.; BARRIENTOS, A.; FONTANESI, F. The mitoribosome-specific protein

- mS38 is preferentially required for synthesis of cytochrome *c* oxidase subunits. **Nucleic Acids Res.**, v. 47, n. 11, p. 5746-5760, 2019.
- MCMULLIN, T. W.; FOX, T. D. *COX3* mRNA-specific translational activator proteins are associated with the inner mitochondrial membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 11737–11741, 1993.
- MCMULLIN, T. W.; HAFFTER, P.; FOX, T. D. A novel small-subunit ribosomal protein of yeast mitochondria that interacts functionally with an mRNA-specific translational activator. **Mol. Cell. Biol.**, v. 10, p. 4590–4595, 1990.
- MICHAELIS, U.; KÖRTE, A.; RÖDEL, G. Association of cytochrome *b* translational activator proteins with the mitochondrial membrane: implications for cytochrome *b* expression in yeast. **Mol. Gen. Genet.**, v. 230, p. 177–185, 1991.
- MICK, D. U.; VUKOTIC, M.; PIECHURA, H.; MEYER, H. E.; WARSCHEID, B.; DECKERS, M.; REHLING, P. Coa3 and Cox14 are essential for negative feedback regulation of *COX1* translation in mitochondria. **Journal of Cell Biology**, v. 191, p. 142-154, 2010.
- MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. **Nature**, v. 191, p. 144–148, 1961.
- MITTELMEIER, T. M.; DIECKMANN, C. L. In vivo analysis of sequences necessary for *CBP1*-dependent accumulation of cytochrome *b* transcripts in yeast mitochondria. **Mol. Cell. Biol.**, v. 715, p. 4203–4213, 1993.
- MÖLLER-HERGT, B. V.; CARLSTRÖMA, A.; STEPHANA, K.; IMHOFB, A.; OTT, M. The ribosome receptors Mrx15 and Mba1 jointly organize cotranslational insertion and protein biogenesis in mitochondria. **Molecular Biology of the Cell**, v. 29, p. 2386-2396, 2018.
- MÖLLER-HERGT, B. V. **The interactome of the yeast mitochondrial ribosome**, 2018.
- MOOTHA, V. K.; LEPAGE, P.; MILLER, K.; BUNKENBORG, J.; REICH, M.; HJERROLD, M.; DELMONTE, T.; VILLENEUVE, A.; SLADEK, R.; XU, F.; MITCHELL, G. A.; MORIN, C.; MANN, M.; HUDSON, T. J.; ROBINSON, B.; RIOUX, J. D.; LANDER, E. S. Identification of a gene causing human cytochrome *c* oxidase deficiency by integrative genomics. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 100, p. 605–610, 2003.
- MULERO, J. J.; FOX, T. D. *PET111* acts in the 5'-leader of the *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial *COX2* mRNA to promote its translation, **Genetics.**, v. 133, p. 509–516, 1993.
- MUMBERG, D.; MAILER, R.; FUNK, M. Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. **Gene**, v. 156, p. 119-122, 1995.
- MUSTI, A.M.; ZEHNER, Z.; BOSTIAN, A.K.; PATERSON, B.M; KRAMER, R.A. Transcriptional mapping of two genes coding for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isolated by sequence homology with the chicken gene. **Gene**, v. 25, p. 133-143, 1983.
- MYASNIKOV, A. G.; SIMONETTI, A.; MARZI, S.; KLAHOLZ, B. P. Structure-function insights into prokaryotic and eukaryotic translation initiation. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 19, p. 300–309, 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*. **Mol. Biol. Cell.**, v. 14, p. 324–333, 2003.
- OTT, M.; AMUNTS, A.; BROWN, A. Organization and Regulation of Mitochondrial Protein Synthesis. **Annual review of biochemistry**, v. 85, p. 77-101, 2016.
- OTT, M.; PRESTELE, M.; BAUERSCHMITT, H.; FUNES, S.; BONNEFOY, N.; HERRMANN, J. M. Mba1, a membrane-associated ribosome receptor in mitochondria. **EMBO J.**, v. 25, p. 1603–1610, 2006.
- PAYNE, M. J.; SCHWEIZER, E.; LUKINS, H. B. Properties of two nuclear pet mutants affecting expression of the mitochondrial *oli1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. **Curr. Genet.**, v. 19, p. 343–351, 1991.
- PEARCE, S. F.; REBELO-GUIOMAR, P.; D’SOUZA, A. R.; POWELL, C. A.; VAN HAUTE, L.; MINCZUK, M. Regulation of mammalian mitochondrial gene expression: recent advances. **Trends Biochem Sci.**, v. 42, p. 625– 639. 2017.
- PEREZ-MARTINEZ, X.; BROADLEY, S. A.; FOX, T. D. Mss51p promotes mitochondrial Cox1p synthesis and interacts with newly synthesized Cox1p. **The Embo Journal**, v. 22, n. 21, p. 5951-5961, 2003.
- POUTRE, C. G. FOX, T. D. *PET111*, a *Saccharomyces cerevisiae* nuclear gene required for translation of the mitochondrial mRNA encoding cytochrome *c* oxidase subunit II. **Genetics**, v. 115, p. 637–647, 1987.
- RAK, M.; SU, C. H.; XU, J. T.; AZPIROZ, R.; SINGH, A.; TZAGOLOFF, A. Regulation of mitochondrial translation of the *ATP8-ATP6* mRNA by Smt1p. **Mol. Biol. Cell.**, n. 27, p. 919-929, 2016.
- RAK, M.; TZAGOLOFF, A. F1-dependent translation of mitochondrially encoded Atp6p and Atp8p subunits of yeast ATP synthase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 106, p. 18509–18514, 2009.
- REPETTO, B.; TZAGOLOFF, A. Structure and regulation of *KGD2*, the structural gene for yeast dihydrolipoyl transsuccinylase. **Am. Soc. Microbiol.**, v. 10, n. 8, p. 4221-4232, 1990.
- RÖDEL, G. KÖRTE, A.; KAUDEWITZ, F. Mitochondrial suppression of a yeast nuclear mutation which affects the translation of the mitochondrial apocytochrome b transcript. **Curr. Genet.**, v. 9, p. 641–648, 1985.
- RÖDEL, G. Two yeast nuclear genes *CBS1* and *CBS2* are required for translation of mitochondrial transcripts bearing the 5'-untranslated *COB* leader. **Curr. Genet.**, v. 11, p. 41–46, 1986.
- ROLOFF, G. A.; HENRY, M. F. Mam33 promotes cytochrome *c* oxidase subunit I translation in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. **Mol. Biol. Cell.**, v. 26, p. 2885–2894, 2015.
- ROMAN, H. Studies of gene mutation in *Saccharomyces*. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v. 21, p.175-185, 1956.

- RUDAN, M.; BOU, DIB, P.; MUSA, M.; KANUNNIKAU, M.; SOBOCANEC, S.; RUEDA, D.; WARNECKE, T.; KRISKO, A. Normal mitochondrial function in *Saccharomyces cerevisiae* has become dependent on inefficient splicing. **Elife.**, v. 7, p. 1-17, 2018.
- RUZZENENTE, B.; METODIEV, M. D.; WREDENBERG, A.; BRATIC, A.; PARK, C. B.; CÁMARA, Y.; MILENKOVIC, D.; ZICKCEERMANN, V.; WIBOM, R.; HULTEENBY, K.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; TEMPST, P.; BRANDT, U.; STEWART, J. B.; GUSTAFSSON, C. M.; LARSSON, N. G. LRPPRC is necessary for polyadenylation and coordination of translation of mitochondrial mRNAs. **EMBO J.**, v. 31, p. 443–456, 2012.
- SAGAN, L. On the origin of mitosing cells. **Journal of Theoretical Biology**, v. 14, n. 3, p. 255-274, 1967.
- SALVATORI, R.; KEHREIN, K.; SINGH, A. P.; AFTAB, W.; MÖLLER-HERGT, B. V.; FORNE, I.; IMHOF, A.; OTT, M. Molecular Wiring of a Mitochondrial Translational Feedback Loop. **Mol Cell.**, v. 20, p. 887-900, 2020.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1989.
- SARRASTE, M. Oxidative phosphorylation at the *fin de siècle*. **Science**, v. 283, p. 1488-1492, 1999.
- SASARMAN, F.; BRUNEL-GUITTON, C.; ANTONICKA, H.; WAI, T.; SHOUBRIDGE, E. A. LRPPRC and SLIRP interact in a ribonucleoprotein complex that regulates posttranscriptional gene expression in mitochondria. **Mol. Biol. Cell.**, v. 21, p. 1315–1323, 2010.
- SAZANOV, L. A. A giant molecular proton pump: structure and mechanism of respiratory complex I. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 16, p. 375–388, 2015.
- SCHAFFER, S. W.; SULEIMAN, M. S. Mitochondria: The dynamic organelle. **New York: Springer**, 2010.
- SÉRAPHIN, B.; BOULET, A.; SIMON, M.; FAYE, G. Construction of a yeast strain devoid of mitochondrial introns and its use to screen nuclear genes involved in mitochondrial splicing. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 84, p. 6810-6814, 1987.
- SHARMA, M. R.; KOC, E. C.; DATTA, P. P.; BOOTH, T. M.; SPREMULLI, L. L.; AGRAWAL, R. K. Structure of the mammalian mitochondrial ribosome reveals an expanded functional role for its component proteins. **Cell**, v. 115, n. 1, p. 97-108, 2003.
- SICKMANN, A.; REINDERS, J.; WAGNER, Y.; JOPPICH, C.; ZAHEDI, R.; MEYER, H.; SCHONFISCH, B.; PERSCHIL, I.; CHACINSKA, A.; GUIARD, B.; REHLING, P.; PFANNER, N.; MEISINGER, C. The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. **PNAS**, v. 100, n. 23, p. 13207-13212, 2003.
- SINGH, A. P.; SALVATORI, R.; AFTAB, W.; AUFSCHNAITER, A.; CARLSTRÖM, A.; FORNE, I.; IMHOF, A.; OTT, M. Molecular Connectivity of Mitochondrial Gene Expression and OXPHOS Biogenesis. **Mol Cell.**, v. 79, n. 6, p. 1051-1061, 2020.
- STEELE, D. F.; BUTLER, C. A.; FOX, T. D. Expression of a recoded nuclear gene inserted into yeast mitochondrial DNA is limited by mRNA-specific translational activation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 93, p. 5253–5257, 1996.

TAIT, S. W.; GREEN, D. R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 11, n. 632, p. 621-632, 2010.

TAVARES-CARREÓN, F.; CAMACHO-VILLASANA, Y.; ZAMUDIO-OCHOA, A.; SHINGÚ-VÁZQUEZ, M.; TOREES-LARIOS, A.; PEREZ-MARTINEZ, X. The pentatricopeptide repeats present in Pet309 are necessary for translation but not for stability of the mitochondrial *COX1* mRNA in yeast. **J. Biol. Chem.**, v. 283, p. 1472–1479, 2008.

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**, v. 76, n. 9, p. 4350- 4354, 1979.

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. 826-831, 1975.

TZAGOLOFF, A.; DIECKMANN, C. L. PET genes of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol Rev**, v.54, p. 211–225, 1990.

VERMA, Y.; MEHRA, U.; PANDEY, D.; KAR, J.; PÉREZ-MARTIZ, X.; JANA, S.; DATTA, K. *MRX8*, the conserved mitochondrial YihA GTPase family member, is required for de novo Cox1 synthesis at suboptimal temperatures in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Biology of the Cell**, v. 32, n. 21, p. 1-14, 2021.

WERAARPACHAI, W.; ANTONICKA, H.; SASARMAN, F.; SEEGER, J.; SCHRANK, B.; KOLESAR, J. E.; LOCHMÜLLER, H.; CHEVRETTE, M.; KAUFMAN, B.; HORVATH, R.; SHOUBRIDGE, E. Mutation in TACO1, encoding a translational activator of COX I, results in cytochrome *c* oxidase deficiency and late-onset Leigh syndrome. **Nat. Genet.**, v. 41, 2009.

WEST, R. W.; CHEN, S. M.; PUTZ, H.; BUTLER, G.; BANERJEE, M. *GALI-GAL10* divergent promoter region of *Saccharomyces cerevisiae* contains negative control elements in addition to functionally separate and possibly overlapping upstream activating sequences. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, v. 1, p. 1118-1131, 1987.

WIESENBERGER, G.; COSTANZO, M. C.; FOX, T. D.; Analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial *COX3* mRNA 5' untranslated leader: translational activation and mRNA processing. **Mol. Cell. Biol.**, v. 15, p. 3291–3300, 1995.

WINDE, J. H.; GRIVELL, L. A. Global regulation of mitochondrial biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**, v. 46, p. 51-91, 1993.

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

ZAMUDIO-OCHOA, A.; CAMACHO-VILLASANA, Y.; GARCÍA-GUERRERO, A. E.; PEREZ-MARTINEZ, X. The Pet309 pentatricopeptide repeat motifs mediate efficient binding to the mitochondrial *COX1* transcript in yeast, **RNA Biol**, v. 11, p. 953–967, 2014.

ZENG, X.; HOURSET, A.; TZAGOLOFF, A. The *Saccharomyces cerevisiae* *ATP22* gene codes for the mitochondrial ATPase subunit 6-specific translation factor. **Genetics.**, v. 175, p. 55–63, 2007.

ZENG, R.; SMITH, E.; BARRIENTOS, A. Yeast Mitoribosome Large Subunit Assembly Proceeds by Hierarchical Incorporation of Protein Clusters and Modules on the Inner Membrane. **Cell Metab**, v.27, p. 645-656, 2018.

ZIAJA, K.; MICHAELIS, G.; LISOWSKY, T. Nuclear control of the messenger RNA expression for mitochondrial ATPase subunit 9 in a new yeast mutant. **J. Mol. Biol.**, v. 229, p. 909–916, 1993.

ZIMORSKI, V.; KU, C.; MARTIN, W. F.; GOULD, S. B. Endosymbiotic theory for organelle origins. **Current opinion in microbiology**, v. 22, p. 38-48, 2014.

ANEXOS – Certificados de cursos obrigatórios

Declaração de participação do curso
Biossegurança e Boas Práticas de Laboratório do ICB



Declaramos para os devidos fins que

Jhulia Almeida Clarck Chagas

participou do Curso "Biossegurança e Boas Práticas de Laboratório do ICB", realizado pela Comissão Interna de Biossegurança do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com carga horária total de 6 horas.

São Paulo, 30 de outubro de 2020
 Comissão Interna de Biossegurança
 ICB USP

Instituto de Ciências Biomédicas | USP
 Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 • Cidade Universitária "Armando Salles Oliveira" • Butantã – São Paulo – SP • CEP 05508-900



Declaro, para os devidos fins, que

Jhulia Almeida Clarck Chagas

concluiu o Curso "Armazenamento, Manuseio e Descarte de Produtos Químicos", realizado no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

São Paulo, 18 de dezembro de 2020
 (Declaração válida por 5 anos)

Prof. Dra. Katiucia Batista da Silva Paiva
 Presidente da Comissão de Segurança Química

Prof. Dr. Luis Carlos de Souza Ferreira
 Diretor do ICB

Instituto de Ciências Biomédicas | USP
 Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 • Cidade Universitária "Armando Salles Oliveira" • Butantã – São Paulo – SP • CEP 05508-900