



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Expressão heteróloga em *Saccharomyces cerevisiae* da
translocase de membrana mitocondrial externa Tom20 de
*Aspergillus fumigatus***

Dhára Cavalcanti de Oliveira

**Ribeirão Preto
2021**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Expressão heteróloga em *Saccharomyces cerevisiae* da
translocase de membrana mitocondrial externa Tom20 de
*Aspergillus fumigatus***

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia e Biotecnologia da Faculdade
de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão
Preto para obtenção do Título de Mestre
em Ciências

Área de Concentração: Imunologia e
Fisiopatologia

Orientada: Dhára Cavalcanti de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura

Ribeirão Preto

2021

LOMBADA

OLIVEIRA, D.C.	Expressão heteróloga em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> da translocase de membrana mitocondrial externa Tom20 de <i>Aspergillus fumigatus</i>	Espaço de 2,5 cm reservado para etiqueta de localização da biblioteca	MESTRADO FCRPUSP 2021
----------------	--	---	-----------------------------

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Cavalcanti de Oliveira, Dhára

Expressão heteróloga em *Saccharomyces cerevisiae* da translocase de membrana mitocondrial externa Tom20 de *Aspergillus fumigatus*. Ribeirão Preto, 2021.
94p.: il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Imunologia e Fisiopatologia
Orientador: Uyemura, Sérgio Akira.

1. Mitocôndria. 2. *Aspergillus fumigatus*. 3. Tom20. 4. Expressão heteróloga. 5. *Saccharomyces cerevisiae*.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Dhára Cavalcanti de Oliveira

Expressão heteróloga em *Saccharomyces cerevisiae* da translocase de membrana mitocondrial externa Tom20 de *Aspergillus fumigatus*.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Imunologia e Fisiopatologia.

Orientador: Sérgio Akira Uyemura.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Yara C. S. Cavalcanti e João Ramos de Oliveira, por todo amor, companheirismo, apoio e cuidado. Obrigada por embarcarem comigo, com tanto amor, nessa jornada chamada vida. Vocês são meu ponto de paz e meu lar. São vocês que me dão forças todos os dias para continuar. Tudo isso é por vocês. Espero um dia orgulhá-los, assim como me orgulho de vocês, e poder retribuir tudo que fazem por mim. Amo vocês.

Aos meus avós, Maria Luíza da Silva Cavalcanti, Álvaro Mendonça Cavalcanti e Francisca Malaquias de Jesus, por sempre cuidarem de mim, e estarem ao meu lado apesar da distância física. Obrigada por me fazerem sentir amada e abraçada sempre que conversamos, e por me ensinarem tanto sobre a vida. Sou muito grata a Deus por ser sua neta e tenho muito orgulho de vocês. Amo vocês.

À minha madrinha Liliane da Silva Godoy (in memoriam). Obrigada por ter existido em minha vida, por ter cuidado de mim como sua filha do coração e por ter sido minha segunda mãe. Sei que sempre estará ao meu lado e olhando por mim. Nunca te esquecerei. Saudades e amor eterno.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura, por confiar em mim e por ter aceitado me orientar. Agradeço por me receber em seu laboratório, por todos os ensinamentos e conselhos, por toda ajuda e críticas construtivas, pela paciência, empatia, e respeito. Saiba que o senhor contribuiu muito para que eu crescesse pessoalmente e profissionalmente. Vou me esforçar para ser uma profissional cada vez melhor, tendo no senhor um exemplo a ser seguido.

À Profa. Dra. Taisa Magnani Dinamarco pelos ensinamentos, prontidão e colaboração na realização deste trabalho. E também a todos os membros e amigos do Laboratório de Biotecnologia de Proteínas do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, por toda ajuda, apoio, incentivo e bons momentos.

À Profa. Dra. Tathiane M. Malta Pereira por toda colaboração, apoio, preocupação, incentivo, empatia e discussões científicas.

Ao Ms. Emerson S. Santos e a Júlia Roza, por toda ajuda na realização dos experimentos, por todas as discussões científicas, apoio, paciência e companheirismo. Agradeço por terem se tornado amigos tão importantes para mim.

A Ms. Juliana Y. Sakita, por toda ajuda na realização dos experimentos, pelas discussões pertinentes e pela paciência. Agradeço por ser muito mais do que uma colega de trabalho, por ter me apoiado e acolhido tão bem mesmo antes de me conhecer. Sou grata a ela e ao André Ozawa, por serem meus grandes amigos, por fazer de sua casa a minha segunda casa em Ribeirão Preto, e por terem me dado forças nos momentos difíceis.

Ao Dr. Lucas O. Souza e ao João J. Franco, por todo auxílio, discussões pertinentes, paciência, convivência harmoniosa e bons momentos.

Aos meus irmãos Charlie Bernardino Ramos de Oliveira e Khaê Cavalcanti de Oliveira, por todo amor, preocupação, companheirismo, amizade e cuidado durante toda a vida.

Aos amigos Natália J. Insfran, Ana Paula M. Andrade, Lucas D. R. dos Santos e Lucas V. P. de Freitas, por toda amizade e apoio. Agradeço por terem estado sempre ao meu lado, me ajudando a permanecer firme durante a realização deste trabalho.

À toda coordenação, docentes e funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, e do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, pela atenção, persistência, dedicação, ética, e comprometimento com o ensino e com a pesquisa mesmo em momentos tão difíceis como estes.

À Deus, pois sem a permissão Dele eu não seria nada, eu não teria nada, eu não poderia nada. Por estar sempre comigo, proteger, cuidar, amar e amparar a mim e meus entes queridos durante toda a minha vida, não sendo diferente durante a pandemia do Covid-19. A Nossa

Senhora Aparecida, por interceder por mim e pela minha família perante a Deus e a Jesus Cristo.

À todos aqueles familiares, amigos e colegas de trabalho que, apesar de não citados, contribuíram para que eu pudesse realizar este trabalho.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (número do Processo: 2019/02598-7) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

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

*“A luz de Deus me guia. O amor de Deus me envolve.
O poder de Deus me protege. A presença de Deus zela por mim.
Onde eu estou, Deus aí está. Amém!”*

Oração pela Proteção - James Freeman.

RESUMO

OLIVEIRA, D.C. **Expressão heteróloga em *Saccharomyces cerevisiae* da translocase de membrana mitocondrial externa Tom20 de *Aspergillus fumigatus*.** 2021. 94f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

O *Aspergillus fumigatus* é um fungo encontrado em todas as regiões no mundo. Nos últimos anos, o *A. fumigatus* deixou de ser apenas um fungo saprofítico de menor importância, para se tornar um dos principais agentes patogênicos oportunistas em pacientes imunossuprimidos. A atividade mitocondrial está diretamente relacionada com o processo de germinação dos conídios deste fungo. As mitocôndrias apresentam duas membranas: a membrana mitocondrial externa e a interna. A maioria das proteínas mitocondriais são codificadas pelo DNA nuclear, sendo endereçadas para as mitocôndrias após a sua síntese no citosol. Os complexos mitocondriais TOM (translocases de membrana mitocondrial externa) e TIM (translocases de membrana mitocondrial interna) são responsáveis por reconhecer e endereçar estas proteínas para os diferentes compartimentos mitocondriais. Um dos componentes do complexo TOM é a subunidade Tom20, cuja função ainda não foi descrita em *A. fumigatus*. Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar a função do gene *tom20* de *A. fumigatus* através da expressão heteróloga deste em *Saccharomyces cerevisiae tom20^{+/-}*. Para isso, o gene *Aftom20* foi clonado em vetor pYES2/CT pela técnica CPEC. Posteriormente, a levedura *S. cerevisiae tom20^{+/-}* foi transformada com a construção *pYES2/Aftom20*. A seguir, foi realizada a indução da expressão do gene *Aftom20* nesta levedura, sendo tal expressão confirmada por PCR quantitativo em tempo real. A presença da proteína recombinante nas mitocôndrias da levedura transformada com a construção *pYES2/Aftom20* foi confirmada por Western Blotting. A sequência deduzida de aminoácidos desta proteína foi analisada apresentando 211 aminoácidos. Ao comparar a taxa de crescimento da levedura que expressava a proteína recombinante, com a daquela que não a expressava, foi constatado que não há diferença entre os crescimentos destas leveduras em meio fermentável. A medida do potencial de membrana mitocondrial de esferoplastos recombinantes de *S. cerevisiae tom20^{+/-}*, evidenciou que nestes, o NADH induziu a formação de um potencial de membrana mitocondrial maior do que nos esferoplastos que não expressavam a proteína recombinante. Além disso, estes últimos não foram capazes de realizar a fosforilação de ADP. Assim, estes resultados sugerem que a proteína recombinante Tom20 de *A. fumigatus* possui função importante para a atividade mitocondrial, por realizar o reconhecimento de proteínas que compõem a cadeia transportadora de elétrons e a ATP-sintase, possibilitando seu transporte para as mitocôndrias.

Palavras-chave: Mitocôndria. *Aspergillus fumigatus*. Tom20. Expressão heteróloga. *Saccharomyces cerevisiae*.

ABSTRACT

OLIVEIRA, D.C. **Heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* of external mitochondrial membrane translocase TOM20 from *Aspergillus fumigatus***. 2021. 94f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Aspergillus fumigatus is a fungus found in all regions of the world. In recent years, *Aspergillus fumigatus* is no longer just a low importance saprophytic fungus, but has become one of the main opportunistic pathogens in immunocompromised patients. The mitochondrial activity is directly related to with the conidial germination processes of this fungus. Mitochondria have two membranes: the outer and inner mitochondrial membrane. Most mitochondrial proteins are encoded by nuclear DNA, which are addressed to mitochondria after their synthesis in cytosol. The mitochondrial complexes TOM (translocase of the outer mitochondrial membrane) and TIM (translocase of the inner mitochondrial membrane) are responsible for recognize and address these proteins to the different mitochondrial compartments. One of TOM complex components is Tom20 subunit, but its function has not yet been described in *A. fumigatus*. Thus, the objective of this work was to study the function of *A. fumigatus tom20* gene through its heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae tom20^{+/-}*. In this sense, the *Aftom20* gene was cloned into pYES2/CT vector by CPEC technique. Subsequently, the *S. cerevisiae tom20^{+/-}* yeast was transformed with *pYES2/Aftom20* construction. Then, the expression of *Aftom20* gene was induced in this yeast, and this expression was confirmed by quantitative real-time PCR. The presence of recombinant protein in the transformed yeast mitochondria with *pYES2/Aftom20* construction was confirmed by Western Blotting. The deduced amino acid sequence of this protein was analyzed, and it has 211 amino acids. The comparison between the growth rate of the yeast that expressed the recombinant protein with the growth rate of the yeast that did not express it, showed that there is no difference between the growth of these yeasts in fermentable medium. The measuring the mitochondrial membrane potential of *S. cerevisiae tom20^{+/-}* recombinant spheroplasts, evidenced that NADH induced the formation of a higher mitochondrial membrane potential in these spheroplasts than in those that did not express the recombinant protein. Furthermore, this last one was not able to carry out ADP phosphorylation. Therefore, these results suggest that the recombinant Tom20 protein from *A. fumigatus* has an important role in mitochondrial activity, performing the recognition of electron carrier chain proteins and the ATP-synthase, enabling their transport to the mitochondria.

Keywords: Mitochondria. *Aspergillus fumigatus*. Tom20. Heterologous expression. *Saccharomyces cerevisiae*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Organização geral dos complexos TOM e TIM na membrana mitocondrial externa (OM) e membrana interna (IM).....	15
Figura 2 - Eletroforese do RNA total em gel de agarose, sob condições desnaturante.....	36
Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) dos produtos de PCR para padronização dos <i>primers</i> da Tabela 1.....	37
Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) do produto da PCR para amplificação do gene <i>Aftom20</i> a partir do cDNA.....	38
Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) do vetor pET-28a digerido e purificado.....	39
Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) do produto da PCR para amplificação do gene <i>Aftom20</i> clonado em vetor pET-28a.....	40
Figura 7 - Resultado do sequenciamento do gene <i>Aftom20</i> , comparando com a sequência do mRNA presente no banco de dados do NCBI.....	41
Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) dos produtos de PCR para padronização dos <i>primers</i> da Tabela 2.....	42
Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) do produto da PCR para amplificação do gene <i>Aftom20</i>	43
Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) do vetor pYES2/CT digerido e purificado.....	44
Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) do produto da PCR para amplificação do gene <i>Aftom20</i> clonado em vetor pYES2/CT.....	45
Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) do produto da PCR para amplificação do gene <i>Aftom20</i> , para confirmação da transformação da levedura.....	46
Figura 13 - Expressão relativa do gene <i>Aftom20</i>	47

Figura 14 - Expressão relativa do gene <i>tom20</i> de <i>S. cerevisiae</i>	48
Figura 15 - Proteína recombinante Tom20 marcada com o anticorpo Anti - V5	49
Figura 16 - Proteína recombinante Tom20 marcada com o anticorpo Anti-V5, identificada a partir das proteínas mitocondriais.....	50
Figura 17 - Proteína mitocondrial constitutiva VDAC marcada com o anticorpo Anti-VDAC.....	50
Figura 18 - Sequência de aminoácidos deduzidos da proteína recombinante..	51
Figura 19 - Alinhamento das sequências primárias de aminoácidos das proteínas Tom20 de <i>S. cerevisiae</i> e de <i>N. crassa</i> , com a sequência primária de aminoácidos deduzidos da proteína Tom20 de <i>A. fumigatus</i>	52
Figura 20 - Curva de crescimento em meio SC-URA ⁻ líquido [galactose 2% (p/v)] das leveduras de <i>S. cerevisiae tom20^{+/-}</i> transformadas.....	53
Figura 21 - Crescimento em meio SC-URA ⁻ sólido [galactose 2% (p/v)] das leveduras de <i>S. cerevisiae tom20^{+/-}</i> transformadas.....	54
Figura 22 - Titulação do potencial de membrana mitocondrial em esferoplastos de <i>S. cerevisiae tom20^{+/-}</i> transformados com a construção <i>pYES2/Aftom20</i>	55
Figura 23 - Potencial de membrana mitocondrial e fosforilação de ADP em esferoplastos de <i>S. cerevisiae tom20^{+/-}</i> transformados.....	56
Figura 24 - Gráfico de predição de hélices transmembranares de acordo com MEMSAT-SVM.....	92
Figura 25 - Gráfico de predição de peptídeo sinal de acordo com SignalP 5.0.	93
Figura 26 - Mapa do vetor pET-28a(+)......	93
Figura 27 - Mapa do vetor pYES2/CT.....	94
Figura 28 - Análise por densitometria da banda gerada pela proteína recombinante Tom20 através do software ImageJ®, normalizada com relação à intensidade da banda gerada pela proteína VDAC.....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequências dos <i>primers</i> utilizados para a realização da clonagem em vetor pET-28a.....	21
Tabela 2 - Sequências dos <i>primers</i> utilizados para a realização da clonagem em vetor pYES2/CT.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ADP	Adenosina 5'-difosfato
<i>Aftom20</i>	Gene <i>tom20</i> de <i>Aspergillus fumigatus</i>
AOX	Oxidase alternativa
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albumina de soro bovino
CDD	<i>Conserved Domain Database</i>
cDNA	DNA complementar
cm	Centímetro
COVID-19	Doença do Coronavírus 2019
CPEC	<i>Circular Polymerase Extension Cloning</i>
CT	<i>Cycle threshold</i>
DMSO	Dimetilsufóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxiribonucleotídeos
DO	Densidade ótica
DTT	Ditiotreitol
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	Ácido etilenoglicoltetracético
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FAE	Formamida-EDTA

FCCP	Carbonil cianeto p-trifluorometoxifenilhidrazona
H⁺	Próton
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietyl)1-piperazini] etanosulfônico
kb	Kilo bases
kDa	Kilo Daltons
kgf	Quilograma força
LB	Lúria Bertani
LiAc	Acetato de lítio
mA	Miliamper
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
mV	Milivolts
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Nde	NADH desidrogenase alternativa externa
NDH	NADH desidrogenase alternativa
Ndi	NADH desidrogenase alternativa interna
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
OLIGO	Oligomicina
OXA	Translocase de montagem de oxidase
pb	Pares de bases

PBS	Tampão salina fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEG	Poli(etil)enoglicol
PIC	Coquetel Inibidor de Protease
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
p/v	Relação peso por volume
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
SARS-CoV-2	Síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2
SC-URA⁻	Meio de cultura Sc sem uracila
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS
SHAM	Ácido salicilhidroxâmico
TAE	Tris- acetato-EDTA
TB	“Terrific Broth”
TBS-T	Tampão salina Tris com Tween 20
TE	Tris-EDTA
TIM	Translocase de membrana mitocondrial interna
T_m	Temperatura de melting
TMD	Domínio transmembranar
TMPD	N,N,N',N'- tetrametil-p-fenilenediamina
TOM	Translocase de membrana mitocondrial externa
TPR	Tetratricopeptídeo

Tris	Tris-(hidroximetil)aminoetano
UCP	Proteína desacopladora
URA3	Oritidina 5'-descarboxilase
V	Volts
VDAC	Proteína do canal seletivo de ânions dependente de voltagem
v/v	Relação volume por volume
°C	Graus Celsius
Δp	Força próton motora
ΔpH	Gradiente químico
$\Delta\Psi$	Potencial elétrico de membrana mitocondrial
μg	Microgramas
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
μM	Micromolar

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Cálculo da massa do inserto a ser utilizado na CPEC.....	22
Equação 2 - Equação de Nernst.....	34

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	xiv
LISTA DE EQUAÇÕES	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	4
1.1 <i>Aspergillus fumigatus</i>	4
1.2 Características macro e microscópicas	5
1.3 Patogênese	6
1.4 Mitocôndrias	8
1.5 Componentes da cadeia transportadora de elétrons.....	10
1.6 Complexos TOM/TIM.....	12
1.7 Expressão Heteróloga.....	16
2. OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1 Microrganismos	19
3.1.1 Cultivo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
3.1.2 Cultivo do <i>Aspergillus fumigatus</i>	19
3.1.3 Extração de RNA de <i>Aspergillus fumigatus</i>	19
3.1.4 Síntese do cDNA	20
3.2 Clonagem em vetor pET-28a.....	20
3.2.1. Desenho dos <i>primers</i> (oligonucleotídeos iniciadores).....	20
3.2.2 Amplificação do gene <i>Aftom20</i> a partir do cDNA, através de reação em cadeia da polimerase (PCR)	21
3.2.3 Eletroforese em gel de agarose	22
3.2.4 Digestão do vetor pET-28a.....	22
3.2.5 <i>Circular Polymerase Extension Cloning</i> (CPEC) do gene <i>Aftom20</i> no vetor pET-28a..	22
3.2.6 Preparação de <i>E. coli DH10β</i> competente e transformação por choque térmico	23
3.2.7 Amplificação do gene <i>Aftom20</i> para a confirmação da transformação	23
3.2.8 Sequenciamento.....	24
3.3 Clonagem em vetor pYES2/CT e Expressão Heteróloga.....	24
3.3.1 Desenho dos <i>primers</i> (oligonucleotídeos iniciadores).....	24
3.3.2 Digestão do vetor pYES2/CT	25
3.3.3 CPEC do gene <i>Aftom20</i> no vetor pYES2/CT	26

3.3.4 Preparo e transformação de células de <i>S. cerevisiae</i> competentes	26
3.3.5 Extração do DNA de levedura.....	27
3.3.6 PCR para a confirmação da transformação da levedura.....	27
3.3.7 Indução da expressão do gene <i>Aftom20</i> em <i>S. cerevisiae</i>	28
3.3.8 Extração do RNA total das leveduras e quantificação	28
3.3.9 Síntese do cDNA de levedura.....	29
3.3.10 PCR quantitativo em tempo real (qPCR-Real Time)	29
3.3.11 SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida – dodecil sulfato de sódio).....	30
3.3.12 Western Blotting.....	31
3.3.13 Produção de esferoplastos de <i>S. cerevisiae</i> e isolamento de mitocôndrias	31
3.3.14 Avaliação da taxa de crescimento das leveduras transformadas	33
3.3.15 Determinação do potencial de membrana mitocondrial	34
3.3.16 Análise estatística	35
4. RESULTADOS	36
4.1 Clonagem em vetor pET-28a.....	36
4.1.1 Extração, quantificação e análise da integridade do RNA total de <i>A. fumigatus</i>	36
4.1.2 Padronização da amplificação do gene <i>Aftom20</i> a partir do cDNA, através de reações em cadeia da polimerase (PCR)	37
4.1.3 Amplificação do gene <i>Aftom20</i> a partir do cDNA, através de reações em cadeia da polimerase (PCR)	38
4.1.4 Vetor pET-28a digerido e purificado.....	38
4.1.5 PCR para amplificação do gene <i>Aftom20</i> clonado em vetor pET-28a	39
4.1.6 Sequenciamento do gene <i>Aftom20</i> clonado em vetor pET-28a.....	40
4.2 Clonagem em vetor pYES2/CT	41
4.2.1 Padronização da amplificação do gene <i>Aftom20</i> , a partir do fragmento clonado em pET-28a, através de reações em cadeia da polimerase (PCR).....	41
4.2.2 Amplificação do gene <i>Aftom20</i> , através de reações em cadeia da polimerase (PCR)	42
4.2.3 Vetor pYES2/CT digerido e purificado.....	43
4.2.4 PCR para amplificação do gene <i>Aftom20</i> clonado em vetor pYES2/CT	44
4.2.5 Sequenciamento do gene <i>Aftom20</i> clonado em vetor pYES2/CT	45
4.2.6 PCR para confirmação da transformação da levedura com o vetor <i>pYES2/Aftom20</i>	45
4.2.7 Quantificação da expressão gênica.....	47
4.2.8 Análise da proteína recombinante Tom20 por Western Blotting.....	48
4.2.9 Análise da sequência de aminoácidos deduzida da proteína recombinante Tom20.....	50
4.2.10 Avaliação da taxa de crescimento das leveduras transformadas	52
4.2.11 Determinação do potencial de membrana mitocondrial	54
5. DISCUSSÃO	57
6. CONCLUSÕES	65

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	66
8. REFERÊNCIAS	67
9. APÊNDICES	82
9.1.1 YPD	82
9.1.2 YUU	82
9.1.3 LB (Lúria Bertani)	83
9.1.4 SOC	83
9.1.5 TB (Terrific Broth)	84
9.1.6 SC-URA ⁻	84
9.2 Soluções, tampões e reagentes.....	86
9.2.1 Tampão salina fosfato (PBS)	86
9.2.2 Tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE)	86
9.2.3 Tampão Tris-EDTA (TE)	86
9.2.4 Tampão TE/LiAc	87
9.2.5 Tampão de extração de DNA para <i>S. cerevisiae</i>	87
9.2.6 Breaking buffer	87
9.2.7 Tampão de amostra para SDS-PAGE 5x.....	88
9.2.8 Tampão de corrida Tris-Glicina pH 8,3.....	88
9.2.9 Tampão de Transferência	88
9.2.10 Tampão salina Tris com Tween 20 (TBS-T).....	88
9.2.11 Tampão salina Tris (TBS)	89
9.2.12 ECL (Enhanced chemiluminescence).....	89
9.2.13 Tampão de pré-incubação para esferoplastos de <i>S. cerevisiae</i>	89
9.2.14 Tampão de digestão para esferoplastos de <i>S. cerevisiae</i>	89
9.2.15 Tampão de lise para esferoplastos de <i>S. cerevisiae</i>	90
9.2.16 Tampão de ressuspensão para mitocôndrias de <i>S. cerevisiae</i>	90
9.2.17 Solução FAE.....	90
9.2.18 Tampão de ressuspensão para esferoplastos.....	90
9.2.19 Tampão de titulação sem íons potássio	91
10. ANEXOS	92
10.1 Anexo A.....	92
10.2 Anexo B.....	93
10.3 Anexo C.....	93
10.4 Anexo D.....	94
10.5 Anexo E.....	94

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Aspergillus fumigatus*

O *A. fumigatus* é um fungo saprofítico que pode ser encontrado em todas as regiões do mundo. Este fungo está presente na matéria orgânica em decomposição, sendo o solo seu nicho ecológico natural, onde ele participa da reciclagem de carbono e de nitrogênio (DENNING, 1998; BRAKHAGE et al., 2002; TEKAIA; LATGÉ, 2005). Alguns estudos do genoma deste fungo demonstraram que a maioria das enzimas codificadas estão mais associadas a fungos que degradam plantas, em comparação com aqueles que degradam matéria orgânica animal (VAN DE VEERDONK et al., 2017). Há muito tempo, espécies do gênero *Aspergillus* estão sendo estudadas e utilizadas como recurso biotecnológico para produzir ingredientes alimentícios, produtos farmacêuticos e enzimas (MEYER et al., 2011; ARASTEHFAR et al., 2021).

Os micélios de *A. fumigatus* possuem uma vida curta em laboratório. Entretanto, embora este fungo não cresça em temperaturas menores que 12°C, seus conídios resistem por um longo período a tensões causadas pelo congelamento e também a longos períodos de desidratação. Em nitrogênio líquido, por exemplo, os conídios são capazes de sobreviver por até 18 anos. Estes fatos demonstram uma das principais características biológicas do *A. fumigatus*: a capacidade de sobreviver e ser resistente a ambientes hostis (KWON-CHUNG; SUGUI, 2013; HAGIWARA et al., 2017).

Existem algumas propriedades importantes do *A. fumigatus* que permitem que, além de sobreviver a ambientes hostis, ele seja a espécie de *Aspergillus* que mais causa infecções em humanos. Entre estas propriedades está o tamanho microscópico dos conídios, que possibilita sua penetração no sistema do trato respiratório inferior, conseguindo escapar da ação das forças mucociliares (BRAKHAGE; LANGFELDER, 2002; KWON-CHUNG; SUGUI, 2013). Além disso, a presença em abundância de ácido siálico carregado negativamente na superfície dos conídios auxilia na ligação deste fungo às proteínas da lâmina basal nos pulmões do hospedeiro (WASYLNKA et al., 2001; ARASTEHFAR et al., 2021). Outra propriedade importante, é a presença de melanina em sua parede celular, que confere resistência à fagocitose e às espécies reativas de oxigênio (KWON-CHUNG; SUGUI, 2013; ARASTEHFAR et al., 2021).

Por serem microscópicos, os conídios de *A. fumigatus* são facilmente transportados pelo ar e inalados com frequência pelos seres humanos. Estes esporos são rapidamente

eliminados pelo sistema imunológico de indivíduos imunocompetentes. No entanto, isso geralmente não ocorre em indivíduos imunocomprometidos. Nestes últimos, o *A. fumigatus* é considerado um importante patógeno oportunista (SEGAL, 2009; ABAD et al., 2010; VIVEK-ANANTH et al., 2018). Outras doenças como a tuberculose e a malária possuem uma morbidade maior quando comparadas a aspergilose invasiva. Cerca de 12% e 0,2% dos pacientes morrem por tuberculose e malária, respectivamente, enquanto mais de 50% morrem por aspergilose invasiva (LATGÉ; CHAMILOS, 2019).

No contexto atual da pandemia COVID-19 (coronavirus disease 2019), causada pelo vírus SARS-CoV-2 (síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2), o *A. fumigatus* têm sido associado a essa doença. Recentemente, foram publicados relatos de casos relacionando a infecção por esse fungo em pacientes com pneumonia viral grave causada pelo SARS-CoV-2. Do mesmo modo, tem sido investigado se a infecção por este fungo nestes casos está relacionada com o aumento da mortalidade (KOEHLER et al., 2020; BLAIZE et al., 2020; HELLEBERG et al., 2021). Assim, se torna cada vez mais importante aprofundar os estudos a respeito do *A. fumigatus*.

1.2 Características macro e microscópicas

Quando cultivado em ágar glicose-peptona a 37°C, o crescimento das colônias de *A. fumigatus* ocorre de maneira rápida. Macroscopicamente, tais colônias são geralmente granulares, apresentam uma coloração verde-acinzentada, e produzem abundantes conídios. Em relação a sua micromorfologia, essa espécie possui hifas hialinas septadas com paredes paralelas. Os conídios por sua vez, apresentam 2,5-3 µm de diâmetro e são produzidos em cadeias paralelas. As cabeças conidiais possuem aspecto de vesículas em forma de frasco, contendo uma série de fiálides uniseriadas que recobrem dois terços superiores de sua superfície (HAINES, 1995).

O *A. fumigatus* é capaz de se desenvolver em temperaturas superiores a 55°C, sendo considerada uma espécie termo-resistente. Entretanto, ele não é capaz de crescer a 10°C, diferente de outras espécies de *Aspergillus* que não são capazes de crescer a temperatura tão alta, mas são capazes de crescer a 10°C. Além disso, ele também é capaz de se desenvolver em uma ampla faixa de pH. Sendo assim, estas são características que tornam mais fácil a sua diferenciação das outras espécies, e faz com que ele possa ser encontrado globalmente e em diversos ambientes (HAINES, 1995; KWON-CHUNG; SUGUI, 2013; SUGUI et al., 2014).

1.3 Patogênese

Para que o fungo se desenvolva em tecidos hospedeiros, ele deve ser agressivo no momento em que o sistema imune do hospedeiro esteja debilitado. Portanto, o estabelecimento da infecção fúngica tem como principal fator predisponente a imunodeficiência do hospedeiro (LATGÉ; CALDERONE, 2002; DAGENAIS; KELLER, 2009; VAN DE VEERDONK et al., 2017).

O gênero *Aspergillus* causa várias síndromes clínicas. Mesmo sendo comum a inalação de conídios, uma minoria de indivíduos desenvolverá alguma doença pulmonar. Isso ocorre, pois apesar de ter a capacidade de provocar doenças, geralmente o *A. fumigatus* não coloniza o trato respiratório humano (KOSMIDIS; DENNING, 2015; VAN DE VEERDONK et al., 2017). As características clínicas, evolução e prognóstico das infecções por *Aspergillus* dependem do imunocomprometimento do hospedeiro. Além disso, fatores genéticos têm sido considerados para a doença (KOSMIDIS; DENNING, 2015). Portanto, as infecções fúngicas acometem principalmente indivíduos submetidos a terapias imunossupressoras, ou que possuem doenças que comprometem o sistema imunológico (BODEY; VARTIVARIAN, 1989; ITO; LYONS, 2002; HOGABOAM et al., 2005; HOHL; FELDMESSER, 2007; KOSMIDIS; DENNING, 2015).

O gênero *Aspergillus* compreende várias espécies oportunistas que podem causar Aspergilose, termo que é utilizado para denominar uma doença causada por agentes deste gênero. Dentre as espécies oportunistas capazes de causar doenças invasivas, estão *A. nidulans*, *A. terreus*, *A. niger*, *A. flavus*, e o *A. fumigatus*. O *A. fumigatus* é responsável por cerca de 90% dos casos de aspergilose invasiva. As demais espécies que pertencem ao complexo *A. fumigatus* também são capazes de causar aspergilose invasiva, porém com uma menor frequência (LATGÉ, 1999; SHAUKAT et al., 2005; LAMOTH, 2016). A aspergilose invasiva possui uma alta mortalidade, cerca de 30 a 95% dos casos. A inalação dos conídios é a principal forma de infecção por este fungo, acometendo principalmente o trato respiratório (RUF et al., 2018).

Nos pacientes imunocompetentes, as manifestações clínicas mais comuns são as doenças alérgicas como asma, sinusite alérgica e alveolite, que ocorrem por exposição aos conídios ou antígenos do *Aspergillus* sp., sendo ausente a colonização pelo micélio (BODEY; VARTIVARIAN, 1989; TOMEE; VAN DER WERF, 2001). Por outro lado, em pacientes imunossuprimidos, as manifestações clínicas são consideradas mais graves. As três principais formas mais graves são aspergilose alérgica bronco-pulmonar, aspergiloma e aspergilose

invasiva. Essas manifestações por sua vez, envolvem o crescimento e colonização pelo micélio (BODEY; VARTIVARIAN, 1989; TEKAIA; LATGÉ, 2005; AGARWAL et al., 2010; MAYR; LASS-FLORL, 2011; AGARWAL et al., 2012; AGARWAL; CHAKRABARTI, 2013; TRACY et al., 2016; HUANG et al., 2017). Devido ao crescente número de indivíduos imunossuprimidos, o *A. fumigatus* se apresenta como um dos principais agentes etiológicos responsáveis por mortes infecciosas (LAMOTH, 2016).

Nas infecções invasivas, como a aspergilose pulmonar invasiva, os conídios atingem o epitélio respiratório pela inalação. A seguir, secretam metabólitos secundários, como a gliotoxina, que contribuem para a colonização do tecido pulmonar. (DAGENAIS; KELLER, 2009; ABAD et al., 2010; VIVEK-ANANTH et al., 2018). Posteriormente, ocorrerão lesões granulomatosas nos pulmões e invasão do fungo nos vasos sanguíneos que irrigam este órgão, podendo resultar no surgimento de vasos trombosados. Ao atingir a corrente sanguínea, o fungo poderá se disseminar e afetar órgãos como o encéfalo, rins e o trato gastrointestinal. Desse modo, a forma disseminada da doença geralmente é aguda e fatal (TAUBITZ et al., 2007; KRADIN; MARK, 2008; MCCORMICK et al., 2010; KOEHLER et al., 2014; KIZHAKEDATHIL et al., 2017).

A aspergilose invasiva é a manifestação clínica mais grave causada por *A. fumigatus*, sendo quase sempre fatal se não tratada. Apesar disso, a maior parte dos casos de aspergilose podem ser tratados com anfotericina B, ou com antifúngicos azólicos (SEGAL; WALSH, 2006; VERWEIJ et al., 2015). Apesar de haver uma redução das taxas de mortalidade devido ao surgimento de antifúngicos azólicos como o voriconazol, o isavuconazol (que podem ser utilizados como tratamento de primeira linha), e o posaconazol (que pode ser utilizado como profilaxia), os avanços clínicos estão ameaçados devido ao desenvolvimento da resistência a esses azóis em *A. fumigatus* (TISSOT et al., 2017; JEANVOINE et al., 2020; ARASTEHFAR et al., 2021).

Os relatos do surgimento da resistência a antifúngicos azólicos têm aumentado nos últimos 10 anos (CHOWDHARY et al., 2013; ROCCHI et al., 2015; VERWEIJ et al., 2016; GARCIA-RUBIO et al., 2017; JEANVOINE et al., 2020; ARASTEHFAR et al., 2021). Uma das vias pela qual o *A. fumigatus* pode estar desenvolvendo resistência é através da via adquirida pelo paciente, por meio da terapia azólica por longos períodos. Além desta, outra via conhecida para a aquisição de resistência é a via ambiental, através do uso de compostos azólicos no meio ambiente. Alguns compostos como os fungicidas azólicos, por exemplo, têm sido utilizados na agricultura para proteger plantas e colheitas, prevenir deterioração pós-colheita e para preservar materiais. Estes azóis se mantêm no solo por meses, criando um

ambiente propício para o surgimento de cepas resistentes (VERWEIJ et al., 2016; JEANVOINE et al., 2020). Neste sentido, foi observado que a exposição a alguns fungicidas triazólicos não médicos é capaz de conferir ao *A. fumigatus* uma resistência cruzada aos triazóis médicos (ZHANG et al., 2017).

Em relação à anfotericina B, seu uso é indicado em alguns casos como os de aspergilose crônica, aspergilose do sistema nervoso central, e aspergilose pulmonar invasiva resistente a azóis (VERWEIJ et al., 2015; ASHU et al., 2018). No entanto, além do aumento no número de isolados de *A. fumigatus* resistentes a anfotericina B, quando convencionalmente formulado, o uso deste medicamento pode causar muitos efeitos adversos. Entre os efeitos adversos estão náuseas, febres, calafrios, vômitos, nefrotoxicidade e anemia (TONIN et al., 2017; REICHERT-LIMA et al., 2018; ASHU et al., 2018). Novas formulações de anfotericina B estão sendo criadas, a fim de diminuir os efeitos colaterais ao seu uso. Entretanto, tais formulações a base de lipídios possuem um alto custo, limitando o seu uso na rotina clínica (TONIN et al., 2017).

Para que a infecção pelo *A. fumigatus* evolua para aspergilose invasiva deve ocorrer a germinação dos conídios, que é fundamental para o ciclo celular e para o estabelecimento da infecção. A atividade mitocondrial se encontra ativa desde os estágios iniciais deste processo, produzindo energia em forma de ATP. Dessa forma, a atividade mitocondrial está diretamente relacionada com o processo de germinação dos conídios. Portanto, para melhorar a compreensão sobre a virulência oportunista deste fungo, é necessário aprofundar os estudos sobre seu metabolismo (TAUBITZ et al., 2007; LATGÉ; CHAMILOS, 2019).

1.4 Mitocôndrias

As mitocôndrias são organelas compostas por duas membranas, uma interna e outra externa, que envolvem dois compartimentos, sendo eles o espaço intermembrana e a matriz mitocondrial (WESTERMANN, 2012). Margulis e colaboradores (1967) propuseram a teoria endossimbiótica das organelas, onde a mitocôndria teria se originado de uma endossimbiose de uma α -protobactéria, um ancestral das células eucarióticas, ocorrido a cerca de 1,5 bilhão de anos. Essa organela de origem bacteriana foi tolerada pela imunidade e está presente no citoplasma das células dos eucariotos, atuando como reguladora central em inúmeras funções celulares (ARCHIBALD, 2015). Assim, as mitocôndrias participam de vários processos celulares, entre eles metabolismo, interação com outras organelas celulares, vias de

sinalização e síntese de ATP (adenosina 5'-trifosfato) (HATEFI, 1985; RUNKEL et al., 2014).

Grande parte dos eucariotos sintetiza ATP pela respiração aeróbica, pois é o método mais eficiente. A mitocôndria, através da fosforilação oxidativa, sintetiza aproximadamente 95% do ATP necessário à manutenção da estrutura e função das células (HATEFI, 1985; GRAHL et al., 2012). Além de ser a principal fonte de energia celular, a mitocôndria também está relacionada com a produção de espécies reativas de oxigênio (BERTERO; MAACK, 2018), captação de cálcio (VERCESI et al., 2018), apoptose e autofagia (HADJ-MOUSSA et al., 2018; FARMER et al., 2018), regulação de células imunológicas (MEYER et al., 2018), regulação metabólica sistêmica (MORROW et al., 2017), metabolismo da glicose e controle da sensibilidade à insulina em adipócitos (VERNOCHET et al., 2014; LEE et al., 2019), formação de cromatina citoplasmática e inflamação na senescência através da sinalização retrógrada (VIZIOLI et al., 2020), regulação da função de células-tronco neurais, além de apresentarem diferentes funções regulatórias de acordo com o tipo celular (como células pós-mitóticas e células cancerosas) (KHACHO et al., 2019).

A energia redox livre oriunda da oxidação dos aminoácidos, ácidos graxos e açúcares, é convertida em ATP nas mitocôndrias (MITCHELL, 1961). O sistema que realiza a fosforilação oxidativa encontra-se na sua membrana interna. Em mamíferos, este sistema é composto por cinco complexos proteicos, sendo eles complexo I-IV (cadeia transportadora de elétrons) e o complexo V (F_0F_1 -ATP sintase). A cadeia respiratória ou cadeia transportadora de elétrons, localizada nas cristas mitocondriais, é constituída por quatro complexos proteicos, ubiquinona e citocromo c (BOYER et al., 1977; HATEFI, 1985; LEHNINGER et al., 1993; GUO et al., 2017).

Os elétrons removidos dos substratos oxidáveis, NADH e succinato, são inseridos na cadeia transportadora de elétrons através da ação de desidrogenases específicas, sendo elas a NADH desidrogenase mitocondrial (complexo I) e a succinato desidrogenase ligada a FAD (complexo II), respectivamente. Os complexos I e II transferem seus elétrons a ubiquinona (CoQ). Em seguida, os mesmos são transferidos sequencialmente para a ubiquinona:citocromo c oxidoredutase (complexo III), citocromo c, citocromo c-oxidase (complexo IV) e por fim ao oxigênio, formando água. Em relação aos elétrons oriundos da beta oxidação de ácidos graxos, esses são transferidos à cadeia transportadora de elétrons pela ubiquinona (BOYER et al., 1977; HATEFI, 1985; LEHNINGER et al., 1993; ZHAO et al., 2019).

Ao associar a hipótese quimiosmótica de Mitchell à hipótese do acoplamento conformacional de Boyer, entende-se que um gradiente eletroquímico de H^+ é gerado pelo fluxo de elétrons através dos complexos I, III e IV. Isso porque este fluxo é acompanhado do bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana. O gradiente eletroquímico de H^+ é chamado de força próton motora (Δp), que é originada pelo gradiente químico (ΔpH) e pelo gradiente elétrico ($\Delta \Psi$). Assim, a energização das mitocôndrias com substratos respiratórios gera um gradiente eletroquímico de prótons, cujo potencial elétrico de membrana é de 0,1 a 0,2 V (negativo na matriz) e a diferença de pH é de uma unidade (alcalino na matriz) (MITCHELL, 1961; BOYER et al., 1977; LEHNINGER et al., 1993).

Quando os íons H^+ retornam à matriz mitocondrial, uma energia é liberada induzindo a uma alteração na conformação do componente F_1 da F_0F_1 -ATP sintase, liberando o ATP formado em seus sítios catalíticos. Essa energia livre também pode ser consumida por proteínas desacopladoras (UCPs). Em mamíferos, o fluxo de elétrons pelo complexo I é acompanhado pelo bombeamento de quatro prótons, já o fluxo pelo complexo III e IV é acompanhado pelo bombeamento de quatro e dois prótons, respectivamente (MITCHELL, 1961; BOYER et al., 1977; JONCKHEERE et al., 2012; ZHAO et al., 2019).

1.5 Componentes da cadeia transportadora de elétrons

A cadeia transportadora de elétrons possui componentes clássicos, sendo eles o complexo I, complexo II, ubiquinona, complexo III, citocromo c e complexo IV. Entretanto, fungos, plantas e alguns protozoários apresentam, além de alguns componentes clássicos, componentes alternativos, sendo eles NADH desidrogenases alternativas (NDH), proteínas desacopladoras (UCP), e oxidases alternativas (AOX) (ROSENFELD; BEAUVOIT, 2003; MARTINS et al., 2011- a).

Na cadeia transportadora de elétrons, as NDH catalisam a mesma reação redox que o complexo I. Entretanto, essas enzimas não realizam o bombeamento de prótons para o espaço intermembrana, além de serem insensíveis à rotenona (inibidor do complexo I), mas sensíveis às flavonas (KERSCHER, 2000). É possível encontrar NDH na maioria dos protozoários e fungos, como por exemplo, em *Saccharomyces cerevisiae* (SMALL; MCALISTER-HENN, 1998), *Neurospora crassa* (CARNEIRO et al., 2007) e *A. fumigatus* (TUDELLA et al., 2004). A cadeia transportadora de elétrons da *S. cerevisiae*, por exemplo, não possui complexo I, mas contém três NDH insensíveis a rotenona. Dessas três, duas são NADH desidrogenases alternativas externas (Nde1 e Nde2) voltadas para o espaço intermembrana, e uma NADH

desidrogenase alternativa interna (Ndi1) voltada para a matriz mitocondrial (KERSCHER, 2000; MARTINS et al., 2011- a). Assim, a NDH é um possível alvo para novos agentes antifúngicos, uma vez que não está presente em mitocôndrias de mamíferos (LIN et al., 2008).

As AOXs por sua vez são enzimas oxidases alternativas resistentes a cianeto. Elas estão presentes nas mitocôndrias de muitos organismos, incluindo alguns fungos (como o *A. fumigatus* e ausente em *S. cerevisiae*), algas, todas as plantas, e alguns protozoários. A atividade das AOXs pode ser inibida pelo ácido salicilhidroxâmico (SHAM). Essas enzimas oferecem uma via alternativa de transporte de elétrons, transferindo-os da ubiquinona direto para o oxigênio. Dessa forma, não há transferência de elétrons pelos complexos III e IV, nem o bombeamento de prótons, ocorrendo uma diminuição na produção de ATP. O papel fisiológico das AOXs está relacionado com a resposta celular a altas temperaturas, escassez de nutrientes e produção de espécies reativas de oxigênio. Assim, essas enzimas possuem um importante papel na manutenção da homeostase redox intracelular e na prevenção do estresse oxidativo (JOSEPH-HORNE et al., 2001; MAGNANI et al., 2008; MARTINS et al., 2011-b; ROGOV; ZVYAGILSKAYA, 2015; LUÉVANO-MARTÍNEZ et al., 2019). Portanto, AOXs também podem ser um alvo atraente para agentes antifúngicos, devido sua ausência em mamíferos e sua presença em patógenos fúngicos, como o *A. fumigatus*, onde desempenham funções importantes na defesa contra o dano celular (MARTINS et al., 2011- a).

Em relação às UCPs, são proteínas localizadas na membrana mitocondrial interna, e fazem parte da família de transportadores mitocondriais. Estas proteínas realizam o transporte de prótons pela membrana mitocondrial interna, assim, os prótons retornam a matriz sem passar pelo complexo V. Dessa maneira, o gradiente eletroquímico de prótons gerado pela cadeia transportadora de elétrons é dissipado na forma de calor. As UCPs podem ser encontradas em mitocôndrias de plantas, protozoários, fungos, no tecido adiposo marrom e em alguns tecidos não-termogênicos de mamíferos (JARMUSZKIEWICZ et al., 2010; MARTINS et al., 2011- a). Entretanto, apesar dessas proteínas estarem amplamente distribuídas em organismos eucariotos, o que inclui o *A. fumigatus*, elas não estão presentes em *S. cerevisiae* (EL MOUALIJ et al., 1997; JARMUSZKIEWICZ et al., 2010). As UCPs são inibidas por nucleotídeos de purina, e ativadas por ácidos graxos livres (JARMUSZKIEWICZ et al., 2010; MARTINS et al., 2011- a).

1.6 Complexos TOM/TIM

A maioria das proteínas mitocondriais são codificadas pelo DNA nuclear. Após a síntese dessas proteínas no citosol, elas são endereçadas para as mitocôndrias e transportadas por um sistema de importação (ENDO; YAMANO, 2009; WIEDEMANN; PFANNER, 2017). Em *S. cerevisiae*, por exemplo, apenas oito proteínas principais são sintetizadas nas mitocôndrias, sendo elas uma proteína ribossomal da pequena subunidade (Var1), e subunidades dos complexos respiratórios III (Cytb), IV (Cox1, Cox2, Cox3) e V (Atp6, Atp8 e Atp9) (MALINA et al., 2018).

Algumas proteínas mitocondriais sintetizadas no citosol são endereçadas as mitocôndrias por possuírem sequências sinalizadoras internas. Enquanto outras possuem uma pré-sequência (referido também como peptídeo sinal), sendo uma extensão clivável na extremidade N-terminal que sinaliza o seu endereçamento para as mitocôndrias (PALMIERI; PIERRI, 2010; FERRAMOSCA; ZARA, 2013; KULAWIAK et al., 2013). Assim, cerca de 99% destas proteínas são sintetizadas como pré-proteínas (também chamadas de precursores), e dependem de complexos proteicos específicos para serem endereçadas e modificadas para sua forma nativa (ENDO; YAMANO, 2009; ARAISO et al., 2019). Aproximadamente 60% destas pré-proteínas mitocondriais são sintetizadas contendo pré-sequências cliváveis. Quando presente, geralmente a pré-sequência é composta de 15-80 aminoácidos (VÖGTLE et al., 2009; MALINA et al., 2018).

A mitocôndria possui duas membranas biológicas com diferentes composições proteicas e lipídicas: a membrana mitocondrial externa e a membrana mitocondrial interna. A membrana mitocondrial externa é praticamente permeável a todas as moléculas e íons e a membrana mitocondrial interna é praticamente impermeável, sendo que a principal forma de entrada de substratos para a matriz mitocondrial ocorre por transportadores mitocondriais. Dessa forma, cada membrana possui um complexo proteico específico para reconhecimento e endereçamento das proteínas mitocondriais sintetizadas no citosol (BOHNERT et al., 2007).

O complexo denominado TOM (translocase de membrana mitocondrial externa) está inserido na membrana mitocondrial externa e realiza o endereçamento de proteínas do citosol para o espaço intermembranas ou para a membrana mitocondrial externa. Assim, aquelas cujo destino é algum compartimento mitocondrial interno, precisam atravessar a membrana externa através do complexo TOM. Os complexos TIM (translocase de membrana mitocondrial interna) estão inseridos na membrana mitocondrial interna e realizam o endereçamento de proteínas do espaço intermembranas para a matriz mitocondrial ou para a própria membrana

mitocondrial interna (RASSOW et al., 1999; BOHNERT et al., 2007, ELLENRIEDER et al., 2019).

Em leveduras e mamíferos, o complexo TOM é formado por sete proteínas transmembranares. As proteínas Tom40, Tom5, Tom6 e Tom7 correspondem ao núcleo do complexo, onde é formado um poro que realiza o transporte de cadeias polipeptídicas não dobradas pela membrana externa. Tom20, Tom70 e Tom22 são receptores de proteínas que reconhecem precursores proteicos destinados à mitocôndria. A proteína Tom20 geralmente realiza o reconhecimento de pré-proteínas que possuem pré-sequência na extremidade N-terminal, enquanto Tom70 geralmente realiza o reconhecimento de pré-proteínas que contêm informações de direcionamento interno. Entretanto, a proteína Tom22 também colabora com a movimentação de pré-proteínas no poro de translocação. Além disso, o complexo TOM pode interagir com os complexos TIM, permitindo a transferência de pré-proteínas da membrana mitocondrial externa para a membrana mitocondrial interna (KÜNKELE et al., 1998; GEBERT et al., 2012; SHIOTA et al., 2015).

Entretanto, em *S. cerevisiae* e *N. crassa* a proteína Tom20 não reconhece apenas os precursores contendo uma pré-sequência clivável em sua extremidade N-terminal, mas reconhecem também alguns precursores contendo sinais de direcionamento interno. Alguns exemplos disso são o transportador de fosfato e o translocador de ADP/ATP que, embora sejam reconhecidos em sua maioria pela proteína Tom70, quando a proteína Tom20 está ausente, a importação desses precursores é reduzida em cerca de 25%. Além disso, nem todos os precursores com sinal de direcionamento interno utilizam Tom70 como receptor principal, como é o caso da proteína porina de *S. cerevisiae*, que utiliza como receptor principal a proteína Tom20 (MOCZKO et al., 1994; PFANNER, 1998; BRIX et al., 1999; KOEHLER et al., 1999; MUTO et al., 2001; AVENDAÑO-MONSALVE et al., 2020).

O TIM por sua vez possui dois complexos sendo eles TIM22, que transloca os precursores de proteínas de membrana interna que não possuem pré-sequência no N-terminal, e TIM23, que transloca os precursores que contêm uma pré-sequência clivável na extremidade N-terminal (CHACINSKA et al., 2005). O complexo TIM23 possui cinco subunidades TIM17, TIM50, TIM23, TIM21 e Mgr2, que são essenciais para a formação de um canal condutor de proteínas, ativado pelo $\Delta\Psi$. Assim, a translocação das pré-proteínas pelo complexo TIM23 é conduzida pelo $\Delta\Psi$ da membrana mitocondrial interna (MARTIN et al., 1991; MALINA et al., 2018).

Durante a translocação pelo complexo TOM, em *S. cerevisiae*, as pré-proteínas contendo sinal de direcionamento interno (proteínas hidrofóbicas) e aquelas contendo uma

pré-sequência, geralmente percorrem caminhos de translocação diferentes, interagindo com diferentes resíduos. Àqueles precursores sem a pré-sequência deixam o canal interagindo com as subunidades Tom5 e Tom40, e posteriormente com as chaperonas TIM e Mia40 que são recrutadas para que essas proteínas sejam transportadas eficientemente. Entretanto, àquelas contendo pré-sequência interagem com as subunidades Tom22, Tom7 e Tom40 sendo, a seguir, transferidas para a subunidade Tim50 e Tim23 do complexo TIM23. Dessa forma, o complexo TOM realiza uma classificação intramitocondrial das pré-proteínas (ARAISO et al., 2019).

Assim, após as pré-proteínas contendo pré-sequência serem reconhecidas pela subunidade Tom20 do complexo TOM e serem translocadas para o interior das mitocôndrias, as mesmas são direcionadas para o complexo TIM23. Posteriormente, peptidases de processamento mitocondrial clivam a sua pré-sequência, e as proteínas são finalmente direcionadas para o seu local de inserção. Essa via é chamada de via TIM23 ou via da pré-sequência (CALLEGARI et al., 2020).

No complexo TIM23, a proteína Tim23 constitui um receptor de pré-sequência, enquanto Tim17 constitui um canal que conduz as proteínas através da membrana interna. A proteína Tim44 auxilia na saída dessa proteína do canal, recrutando a proteína Hsp70 e a chaperona Mge1p, que realizam a translocação utilizando ATP. Ademais, algumas proteínas da família de transportadores possuem sequência de direcionamento interno e por isso são reconhecidas pelo receptor Tom70. Para inserir esses transportadores na membrana interna, após a translocação pelo complexo TOM, ocorre uma interação dos transportadores com as proteínas Tim9, Tim10 e Tim12. A seguir, as proteínas Tim8 e Tim13 interagem com Tim9 auxiliando na importação dessas pré-proteínas. Tim54 juntamente com Tim22, utilizando o $\Delta\Psi$, realizam a inserção das proteínas transportadoras na membrana interna. A exportação de precursores da matriz para a membrana interna é realizada pelo complexo OXA1 (Figura 1) (BAUER et al., 2000).

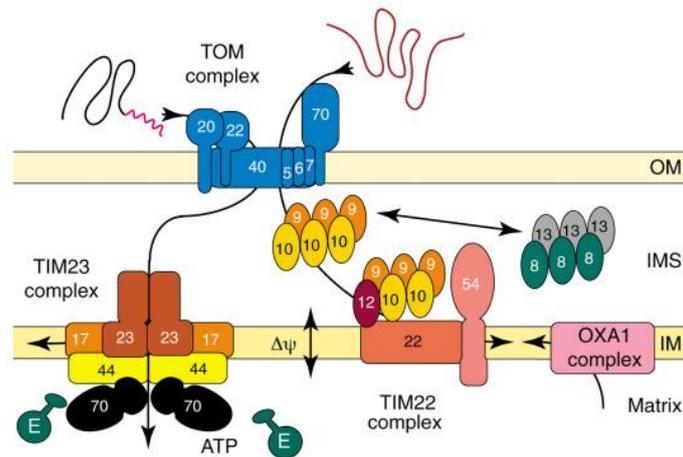


Figura 1: Organização geral dos complexos TOM e TIM na membrana mitocondrial externa (OM) e membrana interna (IM). Abreviaturas: OM, membrana externa; IM, membrana interna; IMS, espaço intermembrana; 70, Hsp70; E, Mge1p. Adaptado de Bauer e colaboradores (2000).

Em *S. cerevisiae* alterações no complexo TOM, como a deleção ou fosforilação de algumas subunidades deste complexo, podem acarretar um fenótipo de redução de crescimento e uma diminuição na importação de proteínas mitocondriais, tais como: translocador de ADP/ATP, F1ATP sintetase subunidade- β , citocromo b2 (HINES et al., 1990; RASSOW et al., 1999; GRAD et al., 1999; RAO et al., 2012).

Após a identificação da translocase de membrana mitocondrial externa Tom20 em *S. cerevisiae* e *N. crassa* foi observado que esta, juntamente com a translocase Tom22, realiza a translocação de pré-proteínas para a matriz e de proteínas destinadas à inserção na membrana externa. Assim, Tom22 auxilia Tom20 a guiar as pré-proteínas até a subunidade Tom40 do complexo (RAMAGE et al., 1993; MAYER et al., 1995; BRIX et al., 1997; BAUSEWEIN et al., 2017). Dessa forma, além de reconhecer o sinal de direcionamento dos precursores, a proteína Tom20 também é responsável por facilitar a ancoragem eficiente desses precursores ao núcleo do complexo TOM, aumentando a eficiência da importação (YAMAMOTO et al., 2011).

A maior parte dos estudos envolvendo a via da pré-sequência foram realizados em leveduras. Porém, apesar da maquinaria principal das mitocôndrias ser conservada entre os eucariotos, conforme são realizados estudos sobre essa via em humanos, fica evidente que existem diferenças funcionais entre elas (ARAISSO et al., 2019; CALLEGARI et al., 2020).

De acordo com Firon e colaboradores (2003) existe homologia entre algumas proteínas de *A. fumigatus* e *S. cerevisiae*, indicando uma provável função semelhante entre elas. Entretanto, diversos genes que codificam componentes mitocondriais essenciais foram identificados em *Aspergillus* e não foram identificados em *S. cerevisiae*. Sendo assim, apesar

da homologia, algumas proteínas podem ter funções celulares diferentes, e alguns genes que não são essenciais em leveduras podem ser essenciais em *A. fumigatus*.

1.7 Expressão Heteróloga

Para expressar proteínas recombinantes, são utilizados sistemas hospedeiros de expressão heteróloga. Os sistemas utilizados são geralmente bactérias, fungos filamentosos e leveduras (BANEYX, 1999; CREGG et al., 2000; MALYS et al., 2011; VISSER, 2011). Essa tecnologia pode ser utilizada para clonagem e posterior expressão do gene de interesse. Assim, de acordo com a finalidade, seleciona-se o sistema hospedeiro mais adequado. (BALAMURUGAN et al., 2006).

Apesar dos procariotos serem capazes de expressar qualquer gene, alguns componentes bacterianos tóxicos podem afetar o produto. Além disso, algumas vezes as proteínas produzidas não possuem a estabilidade biológica ou a atividade esperada. Sendo assim, um sistema alternativo à expressão de proteínas por hospedeiros procariotos são as células eucarióticas. Os eucariotos possuem diversas características genéticas, moleculares e bioquímicas em comum entre si, e isso contribui para que a proteína natural seja semelhante à proteína recombinante obtida em todas as suas propriedades (GOMES et al., 2016).

Entre os sistemas de expressão, os que possuem o maior valor comercial são as leveduras, sendo mais utilizada a *S. cerevisiae*. Esta levedura possui alguns aspectos bem caracterizados como sua biologia celular, bioquímica e genética, sendo considerado um organismo modelo para pesquisar funções celulares (GLICK et al., 2010).

As leveduras associam algumas vantagens do sistema de expressão procariota e do eucariota. As vantagens que elas possuem em comum com os sistemas procariotas envolve o rápido crescimento, alto nível de expressão, meio de cultura barato, fácil expansão, crescimento e manutenção. Entre as vantagens em comum aos sistemas eucariotas, está a de serem capazes de realizar a maior parte das modificações pós-traducionais, como por exemplo, realizar o dobramento e o processamento de proteínas (BALAMURUGAN et al., 2006; DALY; HEARN, 2005; MATTANOVICH et al., 2012). Além disso, este sistema produz e secreta as proteínas intactas no meio e realiza a integração das mesmas no local específico (BALAMURUGAN et al., 2006; MATTANOVICH et al., 2012). Por isso, *S. cerevisiae* é utilizada com frequência para expressar diversas proteínas (GLICK et al., 2010; MATTANOVICH et al., 2012).

A transformação das células hospedeiras é realizada geralmente utilizando vetores híbridos, contendo sequências provenientes de leveduras e bactérias. A região proveniente de leveduras possui sequências que promovem a seleção de leveduras transformadas, como o gene para oritidina 5'-descarboxilase (URA3). A região procariótica, por sua vez, contém uma sequência que promove resistência específica a um antibiótico e uma origem de replicação, garantindo, respectivamente, a seleção e a propagação em uma bactéria hospedeira (HINNEN et al., 1994).

Além da expressão heteróloga, outro método para estudar a função de um gene é a deleção deste e posterior análise dos mutantes que não o possuem (SMITH et al., 1995). Este método foi adotado anteriormente, sendo considerada a nossa primeira estratégia para estudar a função do gene *tom20* (AFUA_6G11380) em mitocôndrias de *A. fumigatus*. Porém, após a construção do cassete de deleção e inúmeras transformações, nenhuma das colônias obtidas o gene em questão havia sido deletado. Este gene possivelmente é essencial para o *A. fumigatus* como ocorre em *S. cerevisiae* (ZHANG; REN, 2015) e, por isso, os isolados viáveis não continham a mutação. Um método alternativo para estudar a função dos genes é através da expressão heteróloga em organismos que apresentam a deleção parcial do gene.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

A função da proteína Tom20 de *A. fumigatus* ainda não foi descrita. A proteína Tom20 de outros organismos apresenta função importante para a atividade mitocondrial, envolvendo o reconhecimento de proteínas da cadeia transportadora de elétrons. Assim, o objetivo deste projeto é estudar a função do gene *tom20* (AFUA_6G11380) de *A. fumigatus* através da expressão heteróloga deste em *Saccharomyces cerevisiae tom20^{+/-}*.

2.2 Objetivos específicos

- Clonar e sequenciar o gene *tom20* de *A. fumigatus* em vetor pET-28a.
- Clonar e sequenciar o gene *tom20* de *A. fumigatus* em vetor pYES2/CT.
- Expressar o gene *tom20* de *A. fumigatus* em *S. cerevisiae tom20^{+/-}*.
- Confirmar a expressão do gene *tom20* de *A. fumigatus* na cepa *S. cerevisiae tom20^{+/-}* transformada com *pYES2/Aftom20*, e sua não expressão naquela transformada com pYES2/CT vazio. Além de avaliar a taxa de expressão do gene *tom20* de *S. cerevisiae* nas cepas *S. cerevisiae tom20^{+/-}* e *S. cerevisiae tom20^{+/+}*.
- Avaliar as taxas de crescimento da levedura *S. cerevisiae tom20^{+/-}* transformada com *pYES2/Aftom20* e da mesma transformada com pYES2/CT vazio.
- Realizar estudo bioenergético através da medida do potencial de membrana mitocondrial, utilizando esferoplastos recombinantes de *S. cerevisiae tom20^{+/-}*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Microrganismos

3.1.1 Cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*

Foram utilizadas cepas BY4743 das linhagens *tom20*^{+/-} e *tom20*^{+/+} (*Sinapse Biotecnologia Ltda*). A cepa da linhagem *tom20*^{+/-} apresenta o seguinte genótipo: MATa/alpha his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0 LYS2/lis2Δ0 MET15/met15Δ0 ura3Δ0/ura3Δ0; TOM20: kanMX/TOM20. Nesta linhagem, o quadro de leitura aberto *tom20* é substituído por um gene de resistência à geneticina, possuindo assim apenas um alelo do gene *tom20*. Enquanto a cepa da linhagem *tom20*^{+/+} apresenta o seguinte genótipo: MATa/alpha his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0 LYS2/lis2Δ0 MET15/met15Δ0 ura3Δ0/ura3Δ0 TOM20/TOM20. As mesmas foram cultivadas em 25 mL de meio YPD sólido contendo geneticina (200 µg/mL) por 48 horas a 30°C.

3.1.2 Cultivo do *Aspergillus fumigatus*

A cepa de *Aspergillus fumigatus* utilizada foi a KU80 (*pyrG*). O *A. fumigatus* foi cultivado em meio sólido (GARRIGUES et al., 1994), com algumas modificações. O cultivo foi realizado em placa de Petri contendo meio YUU sólido e incubado por 24 horas à 37°C. A partir desse crescimento, obteve-se uma suspensão de conídios. Para isso, foram adicionados 40 mL de PBS 1x sobre a placa de Petri que teve sua superfície raspada com uma pipeta de Pasteur. Posteriormente, o PBS contendo os conídios filtrados em lã de vidro foi recolhido em um tubo estéril.

3.1.3 Extração de RNA de *Aspergillus fumigatus*

A fim de realizar a extração do RNA, 50 µL de suspensão de conídios foram inoculados em 50 mL de meio YUU líquido, e incubados a 37°C durante 24 horas, sob agitação de 200 rpm. Assim, com o auxílio de uma bomba de vácuo e papel filtro (Whatman), filtrou-se o micélio crescido em meio YUU. Utilizando um gral contendo nitrogênio líquido, o mesmo foi macerado com pistilo, e 92 mg foram transferidos para um tubo de 1,5 mL. O RNA foi extraído como descrito por Chirgwin e colaboradores (1979) e Vogelstein e Gillespie

(1979), utilizando *PureLink™ RNA mini Kit (Thermo Fisher Scientific)*, seguindo as instruções do fabricante.

A quantificação do RNA foi realizada por espectrofotometria em comprimento de onda de 260 nm, utilizando o aparelho NanoDrop 1000 (*Thermo Fisher Scientific*). Para analisar a integridade do RNA, realizou-se eletroforese em gel de agarose, sob condições desnaturantes. O tratamento do RNA com DNase foi realizado segundo Moore (1981), para isso, utilizou-se o kit *RQ1 RNase-Free DNase (Promega)*, seguindo as instruções do fabricante.

3.1.4 Síntese do cDNA

O cDNA foi sintetizado como descrito por Houts e colaboradores (1979), utilizando *SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen)*, de acordo com as instruções do fabricante.

3.2 Clonagem em vetor pET-28a

3.2.1. Desenho dos *primers* (oligonucleotídeos iniciadores)

Para a amplificação do gene *Aftom20* a partir do cDNA, e adição de regiões de pareamento com as extremidades do vetor pET-28a (vetor de expressão para organismo procarioto), foram utilizados os *primers* que estão contidos na Tabela 1. O desenho dos *primers* foi realizado com o auxílio das bases de dados *Ensembl* e *National Center for Biotechnology Information- NCBI*.

Tabela 1: Sequências dos *primers* utilizados para a realização da clonagem em vetor pET-28a.

Fragmento amplificado	Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores
pET28a_TOM20_F	5' GGACAGCAAATGGGTCGCGGATCCGAATTC CATGAAGACCTCAACTTTGGT 3'
pET28a_TOM20_R	5' GGTGGTGCTCGAGTGC GGCCTTATTTCGACCCGTGATTGT 3'

As regiões em negrito representam regiões de pareamento com as extremidades do vetor pET-28a.

3.2.2 Amplificação do gene *Aftom20* a partir do cDNA, através de reação em cadeia da polimerase (PCR)

As reações de amplificação foram realizadas de acordo com Saiki e colaboradores (1985), utilizando Termociclador Eppendorf (*Mastercycler Gradient*). Para obter o gene *Aftom20* contendo extremidades complementares ao vetor pET-28a, foi necessário realizar a reação em cadeia da polimerase utilizando os *primers* descritos na Tabela 1.

Para isso, padronizaram-se as melhores condições de amplificação deste fragmento. Utilizando *Easy Taq DNA polymerase* 2,5 U/ μ L (AP111-01- *Transgen*), foram testadas diferentes temperaturas de anelamento. O ciclo de temperaturas testadas para as reações foram: 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 30 ciclos de 50°C, 55°C, 60°C ou 65°C por 30 segundos (Gradiente), 30 ciclos de 72°C por 1 minuto e, 1 ciclo de 72°C por 10 minutos.

Após a padronização, para realizar a reação de amplificação do fragmento contendo regiões de pareamento com as extremidades do vetor pET-28a, foi utilizada a enzima *Taq DNA polymerase Phusion High Fidelity* (F530S - *Thermo Fisher Scientific*) 2 U/ μ L, Tampão 5x *Phusion High Fidelity* PCR [TAPS-HCl 25 mM (pH 9,3), KCl 50 mM, β -mercaptoethanol 1 mM e activated salmon milt DNA 0,75 mM], *Primers Forward* e *Reverse* 0,2 μ M, dNTPs 0,2 μ M, MgCl₂ 2,5 mM, 100 ng de *template* (cDNA) e água livre de nuclease para completar o volume final da reação de 75 μ L.

3.2.3 Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese em gel de agarose foi realizada de acordo com Sambrook e colaboradores (1989). Os géis foram preparados dissolvendo agarose em tampão TAE. Os produtos de PCR contidos no gel foram purificadas como descrito por Boom e colaboradores (1990), utilizando o kit *QIAquick® Gel Extraction (Qiagen)*, seguindo as instruções do fabricante.

3.2.4 Digestão do vetor pET-28a

O vetor pET-28a (*Invitrogen*) foi tratado com enzimas de restrição de acordo com Sambrook e colaboradores (1989). Para isso, o vetor foi incubado com as enzimas *EcoRI* (ER0271- *Thermo Fisher Scientific*) e *Not I* (ER0595- *Thermo Fisher Scientific*), durante 3 horas a 37°C. O tampão utilizado foi o recomendado pelo fabricante.

3.2.5 Circular Polymerase Extension Cloning (CPEC) do gene *Aftom20* no vetor pET-28a

Para a realização da clonagem, foi utilizada a técnica *Circular Polymerase Extension Cloning* - CPEC, de acordo com Quan e Tian (2011), com algumas modificações. A CPEC foi realizada com as proporções inserto/vetor 1:1 e 2:1. Determinou-se a massa do inserto utilizado através da multiplicação da massa do vetor pelo resultado da multiplicação do tamanho do inserto pela proporção inserto/vetor, dividido pelo tamanho do vetor. Para a CPEC 1:1 a massa de vetor utilizada foi de 200 ng e a do inserto de 19,25 ng, porém, para CPEC 2:1 a massa do vetor utilizada foi a mesma e a do inserto foi de 38,49 ng.

Para as reações, utilizou-se a enzima *Taq DNA polymerase Phusion High Fidelity* (F530S- *Thermo Fisher Scientific*) 2 U/ μ L, *Tampão 5x Phusion High Fidelity PCR* [TAPS-HCl 25 mM (pH 9,3), KCl 50 mM, β -mercaptoethanol 1 mM e activated salmon milt DNA 0,75 mM], MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 0,4 μ M, vetor 200 ng, inserto 19,25 ng (para a CPEC 1:1), inserto 38,49 ng (para a CPEC 2:1), DMSO 3% (v/v) e água livre de nuclease (volume final 25 μ L).

3.2.6 Preparação de *E. coli DH10β* competente e transformação por choque térmico

A preparação de bactérias competentes foi realizada segundo Hanahan (1983), com modificações. Para isso, inoculou-se uma colônia de *E. coli DH10β* em 10 ml de meio LB líquido e incubou-se durante 12 a 16 horas a 37°C, sob agitação de 200 rpm. Em seguida, 2 mL da cultura de bactérias foram transferidos para 50 mL de meio SOB, e as bactérias incubadas à 37°C, em agitação de 200 rpm até que fosse alcançada a DO_{600nm} de 0,6. Posteriormente, a cultura foi transferida para um tubo Falcon estéril e mantida no gelo por 10 minutos. Após este tempo, centrifugou-se a 2500 x g por 10 minutos, 4°C e o sobrenadante foi retirado. As células foram ressuspensas cuidadosamente em 16 mL de solução TB resfriada. O tubo foi mantido em gelo por 10 minutos e em seguida centrifugado a 2500 x g, por 10 minutos, 4°C. Novamente, as células foram ressuspensas em 4 mL de solução TB resfriada, e foi adicionado a elas 300 µL de DMSO (D2650 - *Sigma-Aldrich*). O tubo foi incubado em gelo durante 10 minutos. Finalmente, após serem feitas alíquotas de 200 µL da suspensão de bactérias, as mesmas foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C.

A transformação das bactérias competentes foi realizada por choque térmico, segundo Sambrook e colaboradores (1989). Para a transformação com os produtos da CPEC 1:1 e 2:1, foi necessário descongelar uma alíquota dessas bactérias para cada transformação, mantendo-as sempre no gelo. Inicialmente, transferiu-se 100 µL de cada suspensão de bactérias para um novo tubo, e a ele foram adicionados 5 µL do produto da CPEC. As suspensões foram homogeneizadas delicadamente e mantidas durante 30 minutos no gelo. Os tubos contendo as bactérias foram incubados por 45 segundos a 42°C e imediatamente, foram transferidos para o gelo, sendo mantidos lá por 3 minutos realizando o choque térmico. Posteriormente, adicionou-se 600 µL de meio SOC em temperatura ambiente e incubou-se as bactérias por 1 hora a 37°C, sob agitação de 200 rpm. As mesmas foram semeadas em meio LB sólido contendo o antibiótico canamicina 50 µM.

3.2.7 Amplificação do gene *Aftom20* para a confirmação da transformação

Para confirmar se a transformação realmente ocorreu, foi necessário realizar a amplificação do gene *Aftom20*. As colônias crescidas em meio LB sólido foram inoculadas em 5 mL de meio LB líquido contendo o antibiótico canamicina 50 µM e, posteriormente, foram incubadas durante 12 a 16 horas a 37°C, sob agitação de 200 rpm. A PCR de colônia

foi realizada utilizando Termociclador Eppendorf (*Mastercycler Gradient*), a enzima *Easy Taq DNA polymerase 2,5 U/μL* (AP111-01- *Transgen*), e *primers* descritos na Tabela 1. Posteriormente, o vetor contendo o gene de interesse foi obtido a partir deste inóculo, segundo Marko e colaboradores (1982), utilizando o *QIAprep Spin Miniprep Kit* (*Qiagen*), de acordo com as instruções do fabricante.

3.2.8 Sequenciamento

A amostra do vetor pET-28a contendo o gene clonado foi preparada para a reação de sequenciamento segundo Sanger e colaboradores (1977), utilizando as instruções do *Kit Big Dye[®] Terminator Cycle Sequencing* (*ABI Prism*). O sequenciamento foi realizado em um sequenciador automático 3500 Genetic Analyzer (*Thermo Fisher Scientific*), no Laboratório de Sequenciamento de Ácidos Nucléicos da FCFRP-USP.

3.3 Clonagem em vetor pYES2/CT e Expressão Heteróloga

3.3.1 Desenho dos *primers* (oligonucleotídeos iniciadores)

Para a amplificação do gene *Aftom20* e adição de regiões de pareamento com as extremidades do vetor pYES2/CT (vetor de expressão para organismo eucarioto), utilizou-se os *primers* que estão contidos na Tabela 2. O desenho dos *primers* foi realizado com o auxílio das bases de dados *Ensembl* e *National Center for Biotechnology Information- NCBI*.

Para que o gene seja expresso de maneira eficiente em vetor de expressão pYES2/CT, um dos *primers* utilizados para a amplificação do gene *Aftom20* continha a sequência consenso KOZAK. Esta sequência modula a tradução do mRNA, o que pode ajudar a tornar mais eficiente a expressão da proteína na levedura (KOZAK, 1986).

Tabela 2: Sequências dos *primers* utilizados para a realização da clonagem em vetor pYES2/CT.

Fragmento amplificado	Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores
pYES2_TOM20_F	5' GAATATTAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCAACACAATGTCTAAGACCTCAACTTTGGT 3'
pYES2_TOM20_R	5' CCACTGTGCTGGATATCTGCAGAATTCTTCGACGCCGTGATTGTC 3'

As regiões em negrito representam regiões de pareamento com as extremidades do vetor pYES2/CT e a região sublinhada corresponde a sequência Kozak

A sequência do gene *Aftom20* clonada anteriormente em vetor pET-28a, serviu como molde para a amplificação deste gene utilizando os *primers* descritos na Tabela 2. Para isso, padronizaram-se as melhores condições de amplificação deste fragmento, utilizando Termociclador Eppendorf (*Mastercycler Gradient*) e a enzima *Easy Taq DNA polymerase 2,5 U/μL* (AP111-01- *Transgen*).

Após a padronização, utilizou-se a enzima *Taq DNA polymerase Phusion High Fidelity* (F530S - *Thermo Fisher Scientific*) 2 U/μL, Tampão 5x *Phusion High Fidelity* PCR [TAPS-HCl 25 mM (pH 9,3), KCl 50 mM, β-mercaptoethanol 1 mM e activated salmon milt DNA 0,75 mM], *primers Forward* e *Reverse* 0,2 μM, dNTPs 0,2 μM, MgCl₂ 2,5 mM, 100 ng de *template* (vetor pET-28a contendo o gene clonado) e água livre de nuclease para completar o volume final da reação de 75 μL.

Após realizar a eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), a região do gel contendo o produto da PCR foi purificada como descrito por Boom e colaboradores (1990), utilizando o kit *QIAquick® Gel Extraction* (*Qiagen*), seguindo as instruções do fabricante.

3.3.2 Digestão do vetor pYES2/CT

O vetor pYES2/CT (*Invitrogen*) foi digerido com enzimas de restrição de acordo com Sambrook e colaboradores (1989). Assim, o vetor foi incubado durante 3 horas a 37°C, com as enzimas de restrição *EcoRI* (R0271- *Thermo Fisher Scientific*) e *BamHI* (ER0051 - *Thermo Fisher Scientific*). O tampão utilizado foi o recomendado pelo fabricante.

3.3.3 CPEC do gene *Aftom20* no vetor pYES2/CT

A clonagem foi realizada como descrito no item 3.2.5. A bactéria *E. coli DH10 β* foi transformada com o produto da CPEC, como descrito no item 3.2.6, para a manutenção e propagação do plasmídeo. A fim de confirmar se a transformação realmente ocorreu, realizou-se uma PCR de colônia para amplificação do gene *Aftom20*. Para isso, as colônias crescidas em meio LB sólido foram inoculadas em 5 mL de meio LB líquido contendo 50 μ M do antibiótico ampicilina. Posteriormente, os inóculos foram incubados durante 12 a 16 horas a 37°C, sob agitação de 200 rpm. A PCR de colônia foi realizada utilizando Termociclador Eppendorf (*Mastercycler Gradient*), a enzima *Easy Taq DNA polymerase 2,5 U/ μ L* (AP111-01- *Transgen*), e *primers* descritos na Tabela 2.

A seguir, o vetor contendo o gene de interesse foi obtido, segundo Marko e colaboradores (1982), utilizando o *QIAprep Spin Miniprep Kit* (*Qiagen*), de acordo com as instruções do fabricante. O gene presente no vetor foi sequenciado como descrito no item 3.2.8.

3.3.4 Preparo e transformação de células de *S. cerevisiae* competentes

As leveduras competentes foram preparadas utilizando o método de Gietz e colaboradores (1992). Para isso, foi inoculada uma colônia isolada da levedura *S. cerevisiae tom20^{+/-}* em 10 mL de meio YPD líquido contendo geneticina 200 μ g/mL por 24 horas a 30°C, 200 rpm. Posteriormente, 1 mL deste inóculo foi inoculado em 50 mL de meio YPD líquido e incubado a 30°C, sob agitação de 200 rpm, até atingir uma DO_{600nm} entre 0,4 - 0,6. As leveduras foram centrifugadas a 1000 x g durante 2 minutos a 25°C e lavadas utilizando 200 mL de tampão TE 1x estéril, pH 7,5. Em seguida, foram sedimentadas como descrito anteriormente e o TE foi descartado. As células foram ressuspensas em 600 μ L de tampão TE/LiAc e incubadas por uma hora a 30°C, sob agitação de 200 rpm.

Assim, realizou-se 3 reações de transformação da levedura (controle negativo, pYES2/CT vazio e *pYES2/Aftom20*). Para isso, utilizou-se 200 μ L das leveduras competentes para cada transformação, 200 μ L (10 mg/mL) de DNA de esperma de salmão previamente desnaturado (15632-011 - *Life Technologies*), e 2 μ g de DNA plasmidial (exceto no controle negativo onde o mesmo não foi adicionado).

As misturas foram incubadas por 30 minutos a 30°C, sob agitação de 200 rpm. A seguir, foi adicionado 1,5 mL de solução contendo LiAc 100 mmol/L (L4158 - *Sigma-*

Aldrich), PEG-3350 40% (p/v) (P3640 - *Sigma-Aldrich*) e tampão TE 10x. Após a homogeneização, incubou-as por 30 minutos a 42°C. Posteriormente, as células foram centrifugadas a 2500 x g durante 1 minuto, lavadas com 1 mL de tampão TE 1x estéril, precipitadas novamente e ressuspensas em 100 µL de tampão TE 1x. Por fim, as leveduras foram semeadas em 25 mL de meio de cultura seletivo SC-URA⁻ sólido [glicose 2% (p/v)] contendo geneticina 200 µg/mL, e incubadas durante 72 horas a 30°C.

3.3.5 Extração do DNA de levedura

A extração do DNA das leveduras foi realizada de acordo com Malavazi e Goldman (2012). Para isso, as colônias crescidas em meio seletivo SC-URA⁻ sólido [glicose 2% (p/v)], foram inoculadas em 10 mL de meio SC-URA⁻ líquido [glicose 2% (p/v)] contendo geneticina 200 µg/mL, e incubadas por 24 horas a 30°C. Após este período, as leveduras foram coletadas por centrifugação a 3200 x g, por 5 minutos a 25°C.

As células foram ressuspensas em 500 µL de tampão de extração, e adicionou-se ao lisado 500 µL de pérolas de vidro de 425 – 600 µm de diâmetro (G9268 - *Sigma-Aldrich*), lavadas previamente com ácido clorídrico (84421 – *Fluka*). A amostra foi vigorosamente agitada durante 10 minutos. O lisado foi transferido para um novo tubo, a ele foi adicionado 500 µL de solução fenol:clorofórmio (v/v) (4557 - *Sigma-Aldrich*; 1.02445.1000 - *Merck*), e o mesmo foi agitado novamente por 10 minutos.

Em seguida, após uma centrifugação de 2000 x g durante 10 minutos a 25°C, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo. Para a precipitação do DNA, foi adicionado 1 mL de isopropanol (109634 – *Merck*), seguido de uma centrifugação a 20800 x g por 5 minutos a 25°C. O sobrenadante foi descartado, o sedimento lavado com 500 µL de etanol 70% gelado (v/v) (100983 - *Merck*) e, posteriormente, centrifugado a 20800 x g por 5 minutos a 4°C. O sedimento foi seco à 25°C, e o DNA ressuspenso em água livre de nuclease.

A determinação da concentração do DNA foi realizada espectrofotometricamente em comprimento de onda de 260 nm, utilizando o aparelho NanoDrop 1000 (*Thermo Fisher Scientific*).

3.3.6 PCR para a confirmação da transformação da levedura

Para confirmar a transformação das leveduras contendo o *pYES2/Aftom20*, amplificou-se o gene *Aftom20* a partir do DNA das mesmas extraído anteriormente. Visto isso, para

realizar a PCR, utilizou-se Termociclador Eppendorf (*Mastercycler Gradient*), a enzima *Easy Taq DNA polymerase 2,5 U/μL* (AP111-01- *Transgen*) e *primers Forward* e *Reverse* descritos na Tabela 2. As condições da PCR foram as mesmas descritas no tópico 3.3.1. Após o término da reação, realizou-se a eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), para confirmar se houve amplificação do gene *Aftom20*.

3.3.7 Indução da expressão do gene *Aftom20* em *S. cerevisiae*

Uma colônia isolada da levedura contendo a construção *pYES2/Aftom20* foi coletada do meio SC-URA⁻ sólido [glicose 2% (p/v)] e inoculada em 45 mL meio SC-URA⁻ líquido [rafinose 2% (p/v)] contendo geneticina 200 μg/mL. O mesmo ocorreu com uma colônia isolada da levedura contendo o vetor *pYES2/CT* vazio, que foi utilizado como controle negativo. Ambos os inóculos foram incubados durante 48 horas a 30°C, sob agitação de 200 rpm.

Para a indução da expressão do gene *Aftom20* pelo promotor GAL1 presente no vetor *pYES2/CT*, é necessário adicionar galactose ao meio. Assim, a DO_{600nm} de ambas as culturas crescidas em meio SC-URA⁻ líquido [rafinose 2% (p/v)] foram diluídas para 0,4 em 150 mL de meio SC-URA⁻ líquido [galactose 2% (p/v)]. A seguir, as culturas foram incubadas por 8 horas a 30°C, sob agitação de 200 rpm.

3.3.8 Extração do RNA total das leveduras e quantificação

Foi realizada a extração do RNA total das leveduras para que posteriormente pudesse ser realizado a análise da expressão do gene *Aftom20*, através da PCR quantitativo em tempo real. Para isso, foram recolhidas alíquotas das culturas das leveduras transformadas com a construção *pYES2/Aftom20* e com o vetor *pYES2/CT* vazio, descritas no item 3.3.7. As alíquotas foram recolhidas nos tempos 4 e 8 horas após a indução da expressão.

A extração do RNA total foi realizada de acordo Shedlovskiy e colaboradores (2017). Para tanto, foi adicionado 80 μL de solução FAE em 1 mL das culturas com DO_{600nm} de 2. A seguir, os tubos foram incubados durante 10 minutos a 70°C. As amostras foram homogeneizadas, centrifugadas a 20.000 x g durante 2 minutos a 25°C, e o sobrenadante coletado. A purificação do RNA total foi realizada segundo Vogelstein e Gillespie (1979) utilizando o *RNeasy Mini Kit* (*Qiagen*), de acordo com as instruções do fabricante. O RNA foi tratado com DNase, como descrito por Moore (1981), utilizando o kit *RNase-Free DNase Set* (*Qiagen*), seguindo as instruções do fabricante.

Foi realizada também a extração do RNA total das cepas *S. cerevisiae tom20^{+/-}* e *S. cerevisiae tom20^{+/+}*, para posterior quantificação relativa da expressão do gene *tom20* de *S. cerevisiae*. Para isso, leveduras das cepas *S. cerevisiae tom20^{+/-}* e *S. cerevisiae tom20^{+/+}* foram cultivadas em 50 mL meio YPD líquido. Posteriormente, a extração do RNA total, bem como sua purificação, e o tratamento com DNase, foram realizados como descrito acima neste mesmo item.

3.3.9 Síntese do cDNA de levedura

A síntese do cDNA das amostras ocorreu segundo Houts e colaboradores (1979) utilizando o kit *SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen)*, de acordo com as instruções do fabricante.

3.3.10 PCR quantitativo em tempo real (qPCR-Real Time)

A análise da expressão do gene *Aftom20* através da PCR quantitativo em tempo real foi realizada conforme Livak e Schmittgen (2001). O intuito desta análise foi confirmar a expressão do gene *Aftom20* na levedura *S. cerevisiae tom20^{+/-}* transformada com *pYES2/Aftom20*, e a não expressão deste mesmo gene na levedura transformada com *pYES2/CT* vazio. Além disso, também foi realizada quantificação relativa da expressão do gene *tom20* de *S. cerevisiae* nas cepas *S. cerevisiae tom20^{+/-}* e *S. cerevisiae tom20^{+/+}*. A finalidade desta análise foi a de demonstrar a menor expressão deste gene na cepa *S. cerevisiae tom20^{+/-}* quando comparada com a cepa *S. cerevisiae tom20^{+/+}*.

Visto isso, a quantificação da expressão do gene *tom20* de *S. cerevisiae* e de *A. fumigatus* foi realizada em um aparelho PCR em tempo real Mastercycler® ep realplex (*Eppendorf*), utilizando o sistema de sondas TaqMan. Os *primers* e sondas utilizados podem ser encontrados no site <https://www.thermofisher.com/br/en/home.html>, com os códigos de acesso Sc04120471_s1 (*β-tubulina* de *S. cerevisiae*), Sc04125487_s1 (*tom20* de *S. cerevisiae*) e APMFZZG (*tom20* de *A. fumigatus*). As sequências dos genes da *β-tubulina* de *S. cerevisiae*, do *tom20* de *S. cerevisiae* e do *tom20* de *A. fumigatus*, estão depositadas no GenBank com os números de acesso YFL037W, YGR082W e AFUA_6G11380, respectivamente.

A fim de corrigir as variações que possam ocorrer na concentração inicial de mRNA, as amostras foram normalizadas utilizando o gene da *β-tubulina* expresso constitutivamente.

As reações foram efetuadas três vezes e todas em triplicata. O cDNA foi adicionado ao reagente Taq-Man® Universal Master Mix II (*Applied Biosystems*) e aos *primers* e sondas (cujos códigos de acesso foram indicados acima). Através do método $2^{-\Delta\Delta CT}$, os valores de CT obtidos foram utilizados para calcular a expressão do mRNA de cada gene alvo em relação ao controle endógeno, e posteriormente, para avaliar a variação da expressão entre os grupos.

3.3.11 SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida – dodecil sulfato de sódio)

A fim de demonstrar a expressão da proteína recombinante Tom20, realizou-se SDS-PAGE e Western blotting. Para tanto, a expressão da proteína recombinante Tom20 foi realizada novamente como descrito no item 3.3.7. Sendo assim, a levedura de *S. cerevisiae tom20^{+/-}* contendo o vetor *pYES2/Aftom20* e aquela contendo o vetor *pYES2/CT* vazio foram inoculadas em 15 mL meio SC-URA⁻ líquido [rafinose 2% (p/v)] acrescido de geneticina 200 µg/mL. Os inóculos foram incubados durante 48 horas a 30°C, sob agitação de 200 rpm. A seguir, a DO_{600nm} de ambas as culturas foram diluídas para 0,4 em 50 mL do meio SC-URA⁻ líquido [galactose 2% (p/v)], e incubadas durante 8 horas a 30°C, sob agitação de 200 rpm. Foram recolhidas alíquotas dessas culturas nos tempos 0, 4 e 8 horas após a indução da expressão, e suas DO_{600nm} determinadas.

Posteriormente, as células foram centrifugadas a 1500 x g durante 5 minutos a 4°C, e ressuspensas em 500 µL de água MilliQ estéril. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 20000 x g durante 5 minutos, a 4°C. Os sedimentos celulares foram coletados, e ressuspensos em 500 µL de *Breaking buffer*. Logo após, as amostras foram centrifugadas a 1500 x g, durante 5 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi descartado. As células foram novamente ressuspensas e diluídas em *Breaking buffer* até atingir uma DO_{600nm} de 0,5-1,0. Foram adicionadas pérolas de vidro de 425 – 600 µm de diâmetro (G9268 - *Sigma-Aldrich*), lavadas previamente com ácido clorídrico (84421 – *Fluka*). A amostra foi homogeneizada vigorosamente durante 30 segundos, seguido de 30 segundos no gelo. Este processo foi realizado 10 vezes durante 10 minutos para lisar as células.

Em seguida, o lisado foi centrifugado a 20000 x g por 10 minutos a 25°C, e o sobrenadante contendo as proteínas foi transferido para um novo tubo. A concentração das proteínas foi determinada como descrito por Smith e colaboradores (1985), por meio do kit *BCATM Protein Assay* (*Thermo Fisher Scientific*), seguindo as recomendações do fabricante, utilizando como padrão a albumina de soro bovino (BSA). Foi adicionado tampão de amostra para SDS-PAGE em 30 µg de proteínas, e as mesmas foram desnaturadas pelo aquecimento

durante 5 minutos a 98°C. O gel de poliacrilamida - SDS foi preparado segundo Laemmli (1970). O tampão de corrida utilizado foi o Tris-Glicina 1x pH 8,3. A corrida eletroforética foi realizada em voltagem constante de 90 V durante 1 hora e 30 minutos.

3.3.12 Western Blotting

Para detectar a expressão da proteína recombinante Tom20 por Western Blotting (TOWBIN et al., 1979), utilizou-se o anticorpo Anti-V5 (R960-25 - *Thermo Fisher Scientific*) na diluição de 1:5000. Sendo assim, após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF. Para a transferência, foi montado um sistema “sanduíche” onde o gel e a membrana foram colocados entre papéis de filtro e esponjas. O sistema foi colocado em uma cuba eletroforética com tampão de transferência, e aplicou-se uma corrente de 350 mA por 90 minutos.

Em seguida, uma etapa de bloqueio foi realizada incubando a membrana com as proteínas em TBS-T contendo *Blotting-Grade Blocker* 5% (p/v) (1706404 - *Bio-Rad*), durante 1 hora a 25°C, sob agitação. Posteriormente, foi realizada a incubação com o anticorpo primário anti-V5 (diluição 1:5000), durante 16 horas a 4°C, sob agitação. Logo após, a membrana foi lavada três vezes com TBS-T, durante 5 minutos a 25°C. Utilizando anticorpo secundário anti-*mouse* marcado com peroxidase (A9044 - *Sigma-Aldrich*), na diluição 1:10000, a mesma foi incubada durante 1 hora a 25°C, sob agitação.

A seguir, a membrana foi novamente lavada três vezes com TBS-T como descrito acima. A revelação ocorreu utilizando ECL e H₂O₂. A incubação da membrana com essa solução ocorreu durante 30 segundos. A marcação dos anticorpos foi visualizada em aparelho ChemiDoc™ MP System (*Bio-Rad*).

3.3.13 Produção de esferoplastos de *S. cerevisiae* e isolamento de mitocôndrias

A fim de demonstrar a presença da proteína expressa nas mitocôndrias das células, as mitocôndrias foram isoladas após 8 horas da indução da expressão e, posteriormente, foram realizados SDS-PAGE e Western Blotting. Visto isso, antes de isolar as mitocôndrias, foi realizada novamente a indução da expressão, de acordo com o item 3.3.7. Para isso, tanto a levedura contendo a construção *pYES2/Aftom20*, como aquela contendo o vetor *pYES2/CT* vazio, foram inoculadas em 225 mL de meio SC-URA⁻ líquido [rafinose 2% (p/v)] contendo geneticina 200 µg/mL. Ambos os inóculos foram incubados durante 48 horas a 30°C, sob

agitação de 200 rpm. A seguir, a DO_{600nm} de ambas as culturas foram diluídas para 0,4 em 750 mL de meio SC-URA líquido [galactose 2% (p/v)]. As culturas foram incubadas durante 8 horas a 30°C, sob agitação de 200 rpm.

Os esferoplastos foram obtidos e as mitocôndrias isoladas de acordo com Glab e colaboradores (1990), com modificações. Para isso, as células das leveduras transformadas com *pYES2/Aftom20* e com *pYES2/CT* vazio foram centrifugadas a 3000 x g por 5 minutos a 25°C, e recolhidas do meio de cultura SC-URA líquido [galactose 2% (p/v)]. Em seguida, o sedimento celular foi lavado duas vezes com 50 mL de água deionizada e centrifugado a 3000 x g por 5 minutos a 25°C. As células foram ressuspensas em tampão de pré-incubação, sendo que, para cada 1 g de células úmidas adicionou-se 4 mL deste tampão. A seguir, as mesmas foram incubadas durante 30 minutos a 33°C, sob agitação de 100 rpm.

Após a incubação, as células foram centrifugadas a 3000 x g por 5 minutos, a 25°C. As mesmas foram lavadas com 50 mL água deionizada e com 25 mL de tampão de digestão, sendo centrifugadas após cada lavagem sob as mesmas condições descritas anteriormente. A seguir, as células foram ressuspensas em tampão de digestão (2 mL de tampão para cada 1 g de células úmidas) e adicionados 2,0 mg de liticase (L4025 - *Sigma-Aldrich*) por grama de células iniciais e DTT 2 mmol/L (43819 - *Sigma-Aldrich*). A solução foi incubada durante 50 minutos, a 33°C, sob agitação de 100 rpm. A digestão da parede celular foi acompanhada realizando a leitura da DO_{600nm} após a diluição das células em água destilada (1:200). Neste caso, a queda da densidade óptica indicou a lise celular em água. Assim, ocorreu a produção dos esferoplastos de *S. cerevisiae*.

Para coletar os esferoplastos, a suspensão foi centrifugada a 9000 x g, durante 5 minutos a 4°C. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes utilizando 25 mL de tampão de digestão gelado e novamente foram centrifugadas sob as mesmas condições. A fim de lisar as células, as mesmas foram ressuspensas em tampão de lise gelado, PMSF 2 mmol/L (P7626 - *Sigma-Aldrich*) e PIC (P8215- *Sigma-Aldrich*). A proporção do tampão utilizada foi de 1,5 mL de tampão para cada 1 g de célula inicial, e a de PIC foi de 1 mL para cada 20 g de células (p/v).

A lise das células foi realizada utilizando um homogeneizador de tecido tipo *Dounce* com cerca 10 movimentos de fricção, e posteriormente, as mesmas foram centrifugadas a 2000 x g durante 5 minutos a 4°C. Em seguida, coletou-se o sobrenadante e o centrifugou a 18000 x g, durante 20 minutos, a 4°C. Delicadamente, o precipitado (contendo as mitocôndrias) foi ressuspensado em tampão de ressuspensão para mitocôndrias gelado, sendo utilizado 1 mL de tampão para cada grama de células iniciais. Após uma centrifugação a 2000

x g durante 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi coletado e centrifugado a 12000 x g durante 20 minutos a 4°C. O precipitado foi ressuspense em 50 µL de tampão de ressuspensão para mitocôndrias.

Para extrair as proteínas mitocondriais, foram adicionados à amostra 3 µL de PIC juntamente com 30 µL de CelLytic™ M (C2978 - *Sigma-Aldrich*) e, após homogeneização, a lise foi realizada em sonificador ultrassônico (*Fisher Scientific*). A amostra foi então centrifugada a 18000 x g, por 20 minutos a 4°C, e o sobrenadante transferido para um novo tubo. A concentração das proteínas foi determinada como descrito por Smith e colaboradores (1985), com o kit *BCA™ Protein Assay* (*Thermo Fisher Scientific*), seguindo as recomendações do fabricante. Como padrão utilizou-se a albumina de soro bovino (BSA). Posteriormente, foram realizados SDS-PAGE de acordo com o item 3.3.11, e Western Blotting como descrito no item 3.3.12. Neste último, além do anticorpo Anti-V5 também foi utilizado o anticorpo anti-VDAC (ab110326 - *Abcam*) na diluição 1:1000 para a detecção da proteína mitocondrial constitutiva VDAC.

3.3.14 Avaliação da taxa de crescimento das leveduras transformadas

A avaliação da taxa de crescimento das leveduras transformadas foi realizada de acordo com Balico e colaboradores (2017), com algumas modificações. Esta avaliação foi executada com a finalidade de determinar se há diferença entre a taxa de crescimento da levedura transformada com *pYES2/Aftom20*, e a taxa de crescimento daquela transformada com *pYES2/CT* vazio. Assim, foram realizados ensaios de crescimento em meio SC-URA⁻ [galactose 2% (p/v)] líquido e sólido, a 30°C. Inicialmente as células foram cultivadas em 25 mL de meio SC-URA⁻ líquido [rafinose 2% (p/v)] contendo geneticina (200 µg/mL) durante 48 horas a 30°C, sob agitação de 200 rpm. Posteriormente, a DO_{600nm} das culturas foi diluída para 0,4 em 25 mL de meio SC-URA⁻ líquido [galactose 2% (p/v)].

Para a avaliação do crescimento em meio sólido, foram realizadas 4 diluições seriadas (1:10) a partir das culturas presentes em meio SC-URA⁻ líquido [galactose 2% (p/v)] com DO_{600nm} de 0,4. As diluições foram semeadas em placa de Petri contendo 25 mL de meio SC-URA⁻ sólido [galactose 2% (p/v)], e incubadas durante 72 horas a 30°C.

Para realizar a avaliação do crescimento em meio líquido, tais culturas presentes em meio SC-URA⁻ líquido [galactose 2% (p/v)] foram incubadas durante 24 horas a 30°C, sob agitação de 200 rpm. As curvas de crescimento destas leveduras foram determinadas através da dosagem das DO_{600nm} nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 horas após a incubação.

3.3.15 Determinação do potencial de membrana mitocondrial

O potencial de membrana mitocondrial dos esferoplastos de *S. cerevisiae tom20^{+/-}* transformadas com *pYES2/Aftom20* e com *pYES2/CT* vazio foi determinado pelo monitoramento das alterações na fluorescência da safranina O (S2255 - *Sigma-Aldrich*) em uma concentração final de 10 $\mu\text{mol/L}$, segundo Petrusa e colaboradores (1992). As alterações na fluorescência foram determinadas utilizando um espectrofluorímetro Hitachi F-7000, sendo os comprimentos de onda de 495 nm e de 586 nm utilizados para a excitação e para a emissão, respectivamente. Os esferoplastos foram preparados como descrito no item 3.3.10. A seguir, os mesmos foram ressuspensos e incubados em 2,0 mL de tampão de ressuspensão para esferoplastos a 30°C, acrescido de MgCl_2 5 mmol/L (105833 – *Merck*) e BSA 0,2% (p/v, A6003 – *Sigma-Aldrich*). O $\Delta\Psi$ foi induzido pela adição de NADH 1 mmol/L (N4505 – *Sigma-Aldrich*).

O $\Delta\Psi$ dos esferoplastos foi titulado em 2,0 mL de tampão de titulação sem íons potássio a 30°C, acrescido de MgCl_2 5 mmol/L (105833 – *Merck*), BSA 0,2% (p/v, A6003 – *Sigma-Aldrich*) e ciclosporina A 1 μM (C3662 - *Sigma-Aldrich*). O substrato utilizado foi NADH 1 mmol/L (N8129 - *Sigma-Aldrich*), responsável por gerar o $\Delta\Psi$. Em seguida, foi adicionada a valinomicina 1 $\mu\text{mol/L}$ (V0627 – *Sigma-Aldrich*), um ionóforo de potássio capaz de colapsar o $\Delta\Psi$, pois facilita o influxo eletrogênico deste cátion. Posteriormente, foi realizada a titulação com potássio, através das sucessivas adições de KCl (P4504 – *Sigma-Aldrich*). A adição de FCCP 20 $\mu\text{mol/L}$ (C2920 – *Sigma-Aldrich*) realizada a seguir colapsou completamente o $\Delta\Psi$. Após cada adição de potássio, o $\Delta\Psi$ foi calculado pela equação de Nernst: $60 \log [K^{+in}] / [K^{+ex}]$, onde $[K^{+in}]$ é a concentração de K^+ no interior das mitocôndrias e $[K^{+ex}]$ é a concentração de K^+ externa. A concentração de $[K^{+in}]$ foi considerada 150 mM, e a concentração de $[K^{+ex}]$ variou conforme o KCl foi adicionado ao meio de incubação.

A fluorescência de safranina O varia linearmente de acordo com o potencial de difusão de K^+ para o interior das mitocôndrias, por isso, foi possível estabelecer uma correlação entre os valores da fluorescência e do $\Delta\Psi$. Entretanto, o valor do $\Delta\Psi$ obtido é um valor aproximado, isso porque o valor de $[K^{+in}]$ é estimado e cada variação de 20 mM em sua estimativa acarreta a uma pequena variação de 5 mV no $\Delta\Psi$ (AKERMAN; WIKSTROM, 1976).

3.3.16 Análise estatística

A análise estatística foi realizada no programa estatístico GraphPad Prism 5 (EUA). O teste de Mann Whitney foi aplicado para analisar experimentos com dois grupos diferentes. $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4. RESULTADOS

Para realizar o estudo da função do gene *tom20* (AFUA_6G11380) de *A. fumigatus*, foi proposta a expressão heteróloga deste gene em *S. cerevisiae tom20^{+/-}*. Assim, este gene foi clonado em vetor de expressão em procaríoto (pET-28a) e, posteriormente, em vetor de expressão em eucarioto (pYES2/CT).

4.1 Clonagem em vetor pET-28a

A clonagem no vetor pET-28a foi realizada com três finalidades: (1) comparar a sequência do gene *Aftom20* clonada com a sequência presente no banco de dados; (2) aperfeiçoar a realização da técnica de clonagem por CPEC; e (3) obter o gene clonado em vetor de expressão em bactéria para, caso seja necessário, produzir anticorpos anti-Tom20. Para isso, foi necessário realizar a extração do RNA total e, posteriormente, a síntese de cDNA.

4.1.1 Extração, quantificação e análise da integridade do RNA total de *A. fumigatus*

Após a eletroforese do RNA total em gel de agarose (Figura 2), pode-se observar que o mesmo se encontrava íntegro e sem arrastes. Foi possível a visualização de duas bandas, correspondentes às frações 28s e 18s do RNA ribossômico.

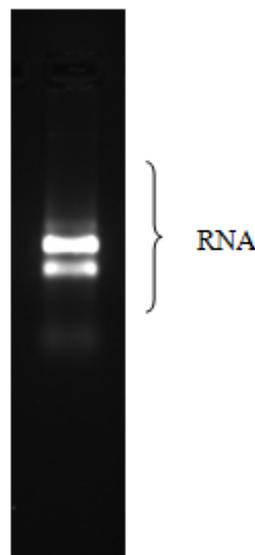


Figura 2 - Eletroforese do RNA total em gel de agarose, sob condições desnaturantes, corado com *GelRed® Nucleic Acid Gel Stain* (*Sigma-Aldrich*).

4.1.2 Padronização da amplificação do gene *Aftom20* a partir do cDNA, através de reações em cadeia da polimerase (PCR)

Para realizar a reação de PCR, utilizou-se como molde o cDNA obtido a partir da extração do RNA total de *A. fumigatus*. Os *primers* utilizados na reação foram os apresentados na Tabela 1. Assim, para determinar a melhor temperatura de anelamento dos *primers*, foram testadas as seguintes temperaturas: 50°C, 55°C, 60°C e 65°C. Após a reação, foi realizada a eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), corado com *GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Sigma-Aldrich)*, sendo esperado um fragmento de 510 pb.

A seguir, foi possível observar que em todas as temperaturas ocorreu a amplificação do gene *Aftom20* (Figura 3). Essas temperaturas foram escolhidas para serem testadas em decorrência de suas proximidades com a temperatura de *melting* (T_m) dos *primers*. Apesar de haver amplificação do fragmento e a presença de apenas uma banda inespecífica nas temperaturas de 55°C, 60°C e 65°C, optou-se pela mais baixa (55°C), por ser a mais afastada da temperatura de extensão da *DNA polymerase Phusion High Fidelity (ThermoFischer Scientific)*.

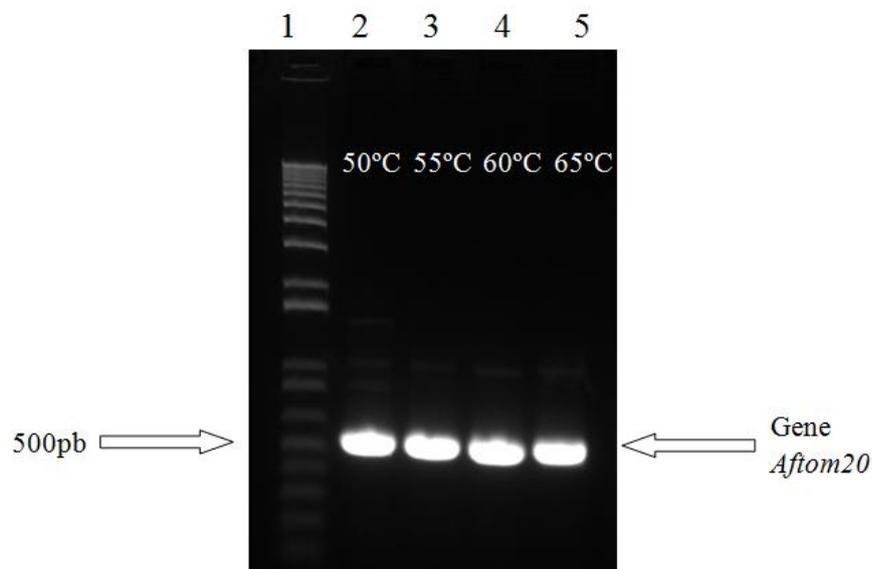


Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) dos produtos de PCR para padronização dos *primers* da Tabela 1, corados com *GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Sigma-Aldrich)*. Coluna 1: Marcador 1 Kb Plus DNA Ladder (10787026 - *ThermoFischer Scientific*); Coluna 2-5: Gene *Aftom20* amplificado utilizando diferentes temperaturas de anelamento dos *primers*.

4.1.3 Amplificação do gene *Aftom20* a partir do cDNA, através de reações em cadeia da polimerase (PCR)

Após a padronização das condições da reação, o cDNA foi submetido à reação de PCR para a amplificação do gene *Aftom20*. O produto da reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v). A banda de amplificação do gene de interesse apresentou-se íntegra e no tamanho esperado (510 pb) (Figura 4). Posteriormente o fragmento foi extraído do gel e purificado.

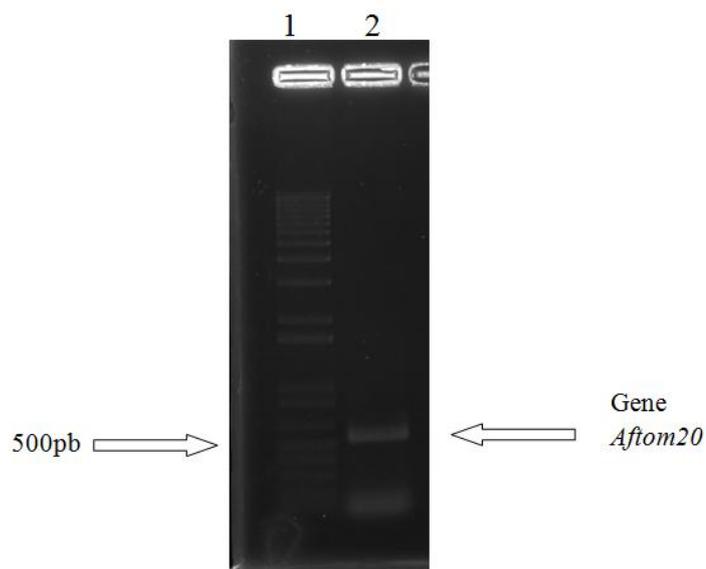


Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) do produto da PCR para amplificação do gene *Aftom20* a partir do cDNA, corado com brometo de etídio (E8751 – *Sigma-Aldrich*). Coluna 1: Marcador 1 Kb Plus DNA Ladder (*ThermoFischer Scientific*); Coluna 2: Gene *Aftom20*.

4.1.4 Vetor pET-28a digerido e purificado

Após a digestão do vetor pET-28a com as enzimas de restrição *EcoRI* e *Not I*, o vetor foi purificado, e o mesmo foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose 1% (p/v). Assim, foi possível observar que a digestão do vetor ocorreu de forma esperada, gerando um produto de aproximadamente 5,3 kb (Figura 5).

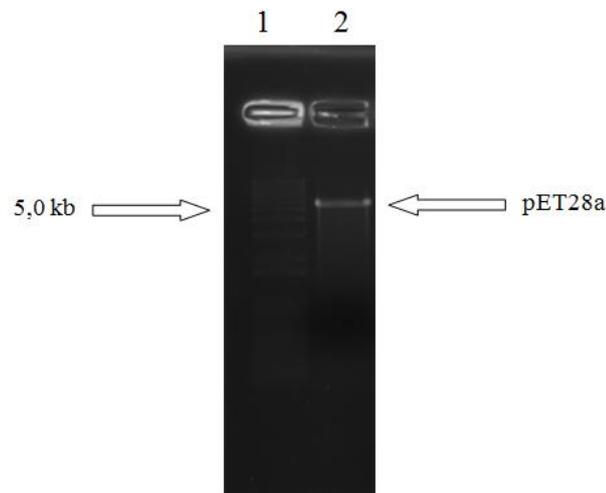


Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) do vetor pET-28a digerido e purificado, corado com brometo de etídio (*Sigma-Aldrich*). Coluna 1: Marcador 1 Kb Plus DNA Ladder (*ThermoFischer Scientific*); Coluna 2: Vetor pET-28a.

4.1.5 PCR para amplificação do gene *Aftom20* clonado em vetor pET-28a

Para confirmar se a transformação das bactérias com os produtos da CPEC havia sido efetiva, foi realizada uma PCR de 10 colônias crescidas em meio LB líquido (5 delas transformadas com o produto da CPEC 1:1 e 5 com o produto da 2:1). Para isso, foram utilizados os *primers* descritos na Tabela 1. Como controle positivo foi utilizado DNA genômico de *A. fumigatus* (KU80, *pyrG*-). Os produtos da reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v). As bandas apresentaram-se íntegras e no tamanho esperado (510 pb) (Figura 6).

O crescimento de colônias nas placas confirmou que elas receberam o vetor pET-28a, pois o mesmo codifica um gene de resistência a canamicina, antibiótico que foi adicionado ao meio de cultura. Porém, foi necessário realizar uma reação de PCR para confirmar a inserção do gene *Aftom20* no vetor (Figura 6). Essa reação utilizando *primers* específicos demonstra que as colônias de bactérias testadas receberam o vetor pET-28a clonado com o gene de interesse.

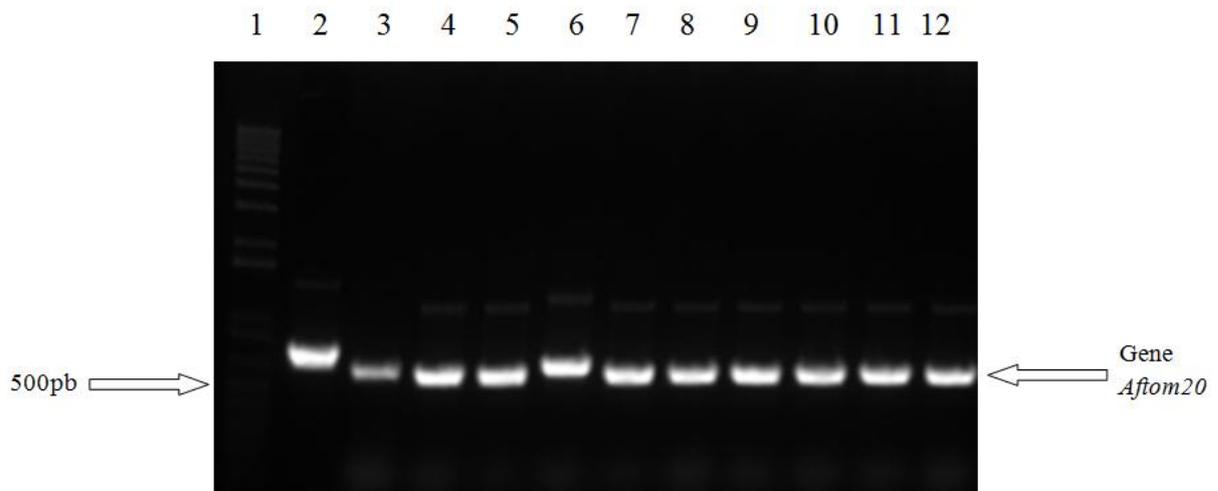


Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) do produto da PCR para amplificação do gene *Aftom20* clonado em vetor pET-28a, corado com *GelRed® Nucleic Acid Gel Stain* (*Sigma-Aldrich*). Coluna 1: Marcador 1 Kb Plus DNA Ladder (*ThermoFischer Scientific*); Coluna 2: Controle positivo; Coluna 3-7: Colônias 1-5 transformadas com o produto da CPEC 1:1; Coluna 8-12: Colônias 6-10 transformadas com o produto da CPEC 2:1

4.1.6 Sequenciamento do gene *Aftom20* clonado em vetor pET-28a

Após a obtenção do vetor contendo o gene *Aftom20* clonado, a partir da colônia 8 utilizando o *QIAprep Spin Miniprep Kit* (*QIAGEN*), foi realizado o sequenciamento deste gene. O resultado do sequenciamento foi comparado com a sequência do mRNA do gene *Aftom20* de *A. fumigatus* AF293 (AFUA_6G11380), presente no banco de dados *National Center for Biotechnology Information* - NCBI.

Assim, ao realizar uma análise comparativa do resultado do sequenciamento do gene clonado com a sequência presente no banco de dados NCBI, observou-se que ambos apresentam 510 nucleotídeos, não havendo divergência entre as sequências, demonstrando que o gene não sofreu qualquer tipo de alteração molecular (Figura 7).

NCBI Sequenciamento	ATGAAGACCTCAACTTTGGTGCCGCTTCTGCCGGCACCATCTTGAAGTGGCCTCTTG6CC ATGAAGACCTCAACTTTGGTGCCGCTTCTGCCGGCACCATCTTGAAGTGGCCTCTTG6CC *****
NCBI Sequenciamento	TACGCCGTACTTTGACCACAAGAGACAGACCGATCCGGAGTCCGCAGAAAGCTTGAAG TACGCCGTACTTTGACCACAAGAGACAGACCGATCCGGAGTCCGCAGAAAGCTTGAAG *****
NCBI Sequenciamento	AGAAACAACCGACGACTTGCCTGTGTGAAGGAGGAAGCAGAAGCCAGGGTGTATG AGAAACAACCGACGACTTGCCTGTGTGAAGGAGGAAGCAGAAGCCAGGGTGTATG *****
NCBI Sequenciamento	CAGCGGGAAGCCATCAAGAAGGCTGTTGACGAGGCCAAGGATGAAGTTTCCCAACAGAC CAGCGGGAAGCCATCAAGAAGGCTGTTGACGAGGCCAAGGATGAAGTTTCCCAACAGAC *****
NCBI Sequenciamento	TTGGAAGAGAAGGAGGCTACTTCATGGGTCAAGTTGCCCGCGGAGAGTCTCTGTGTGCC TTGGAAGAGAAGGAGGCTACTTCATGGGTCAAGTTGCCCGCGGAGAGTCTCTGTGTGCC *****
NCBI Sequenciamento	GAAGGCTCCAACCCAGATTGAAGCTGCTGTGCTTCTACAAGGCTCTCAAGGTCTACCCCT GAAGGCTCCAACCCAGATTGAAGCTGCTGTGCTTCTACAAGGCTCTCAAGGTCTACCCCT *****
NCBI Sequenciamento	CAGCCCAAGGACCTGATCTCGATATATGACAAGACCGTCCCTAAGGATGTGTTGGAGATC CAGCCCAAGGACCTGATCTCGATATATGACAAGACCGTCCCTAAGGATGTGTTGGAGATC *****
NCBI Sequenciamento	TTGGCCGAAATGGTCGCATGGACGCCGGTCTCAAAGTGGGATCTTTACTGGCGAGGGT TTGGCCGAAATGGTCGCATGGACGCCGGTCTCAAAGTGGGATCTTTACTGGCGAGGGT *****
NCBI Sequenciamento	GGCAGTGCTGACAATCACGGCGTCGAATAA GGCAGTGCTGACAATCACGGCGTCGAATAA *****

Figura 7 - Resultado do sequenciamento do gene *Aftom20*, comparando com a sequência do mRNA presente no banco de dados do NCBI.

4.2 Clonagem em vetor pYES2/CT

Foram realizadas a clonagem do gene *Aftom20* em vetor pYES2/CT, a transformação da cepa *S. cerevisiae tom20^{+/-}* com este vetor, e também a indução da expressão da proteína recombinante Tom20. Todos estes resultados serão demonstrados a seguir.

4.2.1 Padronização da amplificação do gene *Aftom20*, a partir do fragmento clonado em pET-28a, através de reações em cadeia da polimerase (PCR)

Para realizar a reação de PCR, utilizou-se como molde o fragmento previamente clonado em vetor pET-28a. Os *primers* utilizados na reação foram os apresentados na Tabela 2. Para determinar a melhor temperatura de anelamento dos *primers*, foram testadas as seguintes temperaturas: 50°C, 55°C, 60°C e 65°C. A seguir, foi realizada eletroforese em gel

de agarose 1% (p/v), e o produto da PCR foi corado com *UniSafe Dye Nucleic Acid Staining* (R01031-*Uniscience*).

As bandas correspondentes à amplificação do gene de interesse apresentaram-se íntegras e no tamanho esperado (510 pb) (Figura 8). Em todas as temperaturas o gene *Aftom20* foi amplificado. Essas temperaturas foram escolhidas para serem testadas devido as suas proximidades com a temperatura de *melting* (T_m) dos *primers*. Apesar de haver amplificação do fragmento em todas elas, optou-se pela mais baixa (50°C), por ser a mais afastada da temperatura de extensão da *DNA polymerase Phusion High Fidelity* (*ThermoFischer Scientific*).

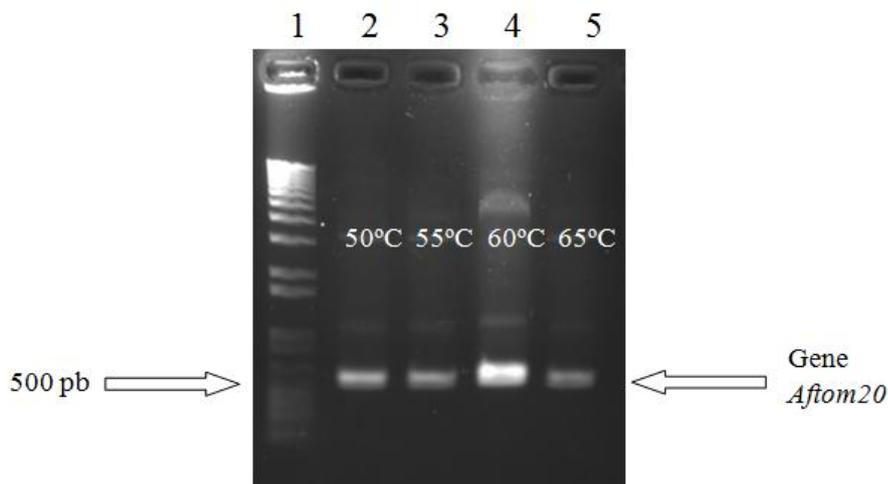


Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) do produto de PCR para padronização dos *primers* da Tabela 2, corado com *UniSafe Dye Nucleic Acid Staining* (*Uniscience*). Coluna 1: Marcador 1 Kb Plus DNA Ladder (*ThermoFischer Scientific*); Coluna 2-5: Gene *Aftom20*.

4.2.2 Amplificação do gene *Aftom20*, através de reações em cadeia da polimerase (PCR)

Após a padronização das condições de amplificação, o vetor pET-28a contendo o gene de interesse foi utilizado novamente como molde na reação de PCR. O produto da reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v). A banda que corresponde à amplificação do gene *Aftom20* apresentou-se íntegra e no tamanho esperado (510 pb) (Figura 9). Posteriormente, o fragmento foi extraído do gel e purificado.

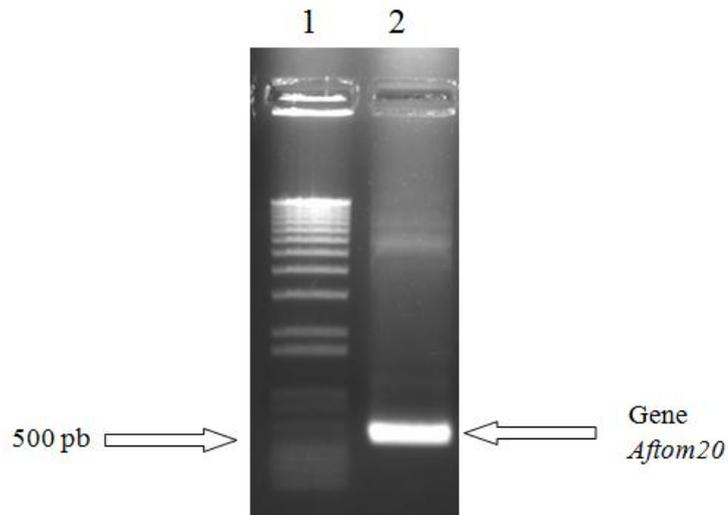


Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) do produto de PCR para amplificação do gene *Aftom20*, corado com *UniSafe Dye Nucleic Acid Staining (Uniscience)*. Coluna 1: Marcador 1 Kb Plus DNA Ladder (*ThermoFischer Scientific*); Coluna 2: Gene *Aftom20*.

4.2.3 Vetor pYES2/CT digerido e purificado

Assim como no vetor pET-28a, a digestão do vetor pYES2/CT foi realizada utilizando duas enzimas de restrição distintas. Dessa forma, após a digestão e purificação deste vetor com as enzimas *EcoRI* e *BamHI* juntas e separadas, o mesmo foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose 1% (p/v).

As digestões realizadas separadamente foram com o intuito de observar se as enzimas utilizadas estavam realmente funcionando e, dessa forma, garantir que não tenha ocorrido uma digestão parcial e sim total do vetor. A banda do vetor digerido com ambas as enzimas apresentou-se íntegra e no tamanho esperado, de aproximadamente 6,0 kb. Dessa forma, ambas as enzimas foram capazes de restringir o vetor pYES2/CT (Figura 10).

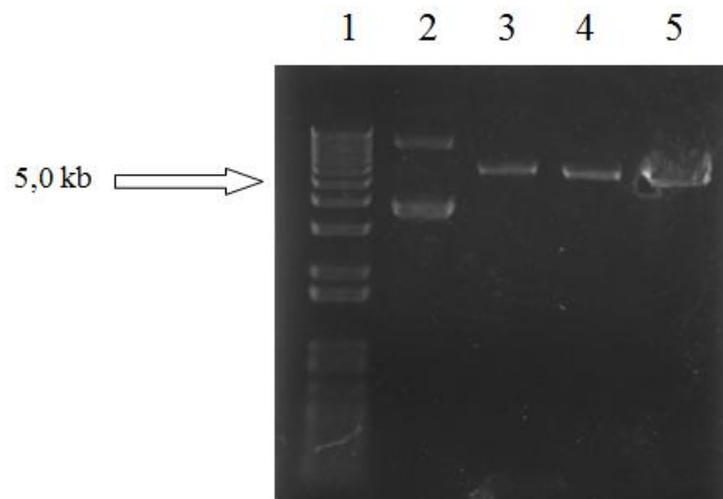


Figura 10 – Eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) do vetor pYES2/CT digerido e purificado, corado com brometo de etídio (*Sigma-Aldrich*). Coluna 1: Marcador 1 Kb Plus DNA Ladder (*ThermoFischer Scientific*); Coluna 2: Vetor pYES2/CT sem digerir; Coluna 3: Vetor pYES2/CT digerido com a enzima *EcoRI*. Coluna 4: Vetor pYES2/CT digerido com a enzima *BamHI*. Coluna 5: Vetor pYES2/CT digerido com as enzimas *EcoRI* e *BamHI*.

4.2.4 PCR para amplificação do gene *Aftom20* clonado em vetor pYES2/CT

Para confirmar se a transformação das bactérias com o produto da CPEC 2:1 havia ocorrido, foi realizado PCR para amplificar o gene *Aftom20* das 6 colônias crescidas em meio LB líquido, utilizando os *primers* descritos na Tabela 2. Os produtos da reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v). As bandas apresentaram-se íntegras e no tamanho esperado (510 pb) (Figura 11).

O crescimento de colônias nas placas indicou que essas receberam o vetor pYES2/CT, pois o mesmo codifica um gene de resistência à ampicilina, antibiótico que foi adicionado ao meio de cultura. O resultado da PCR confirmou a ocorrência da clonagem, pois as colônias testadas receberam o vetor pYES2/CT clonado com o gene de interesse (Figura 11).

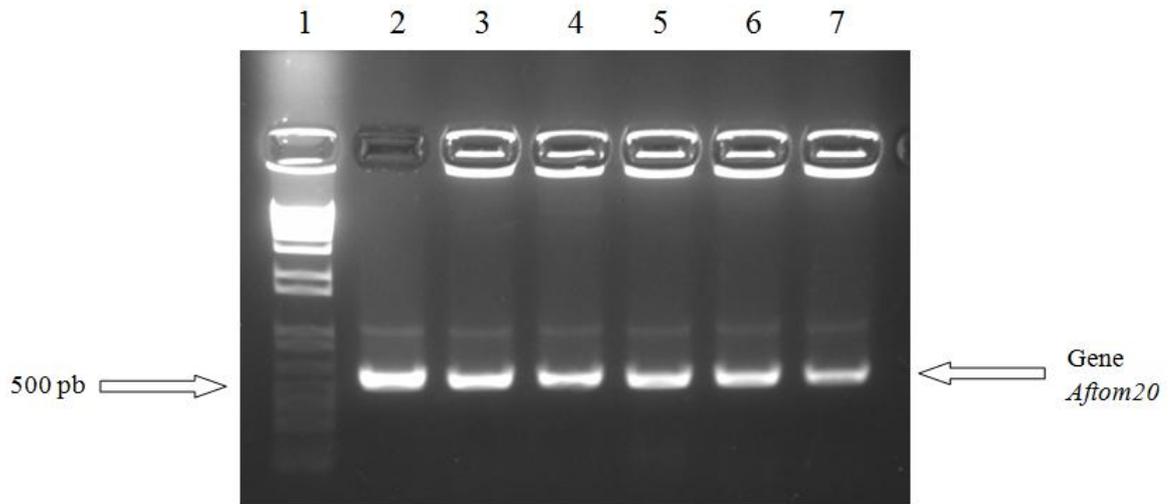


Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) do produto da PCR para amplificação do gene *Aftom20* clonado em vetor pYES2/CT, corado com *UniSafe Dye Nucleic Acid Staining* (*Uniscience*). Coluna 1: Marcador 1 Kb Plus DNA Ladder (*ThermoFischer Scientific*); Coluna 2-7: Colônias 1-6, respectivamente.

Em relação a CPEC, foi utilizada uma proporção 2:1. Essa proporção foi utilizada, pois na clonagem em vetor pET-28a foi observado que o número de colônias de bactérias que cresceram após a transformação com o produto da CPEC 2:1 foi maior do que quando transformadas com o produto da 1:1.

4.2.5 Sequenciamento do gene *Aftom20* clonado em vetor pYES2/CT

Após a obtenção do plasmídeo a partir da colônia 1, foi realizado o sequenciamento do gene *Aftom20*. O resultado do sequenciamento foi comparado com a sequência do mRNA do gene *Aftom20* da cepa de *Aspergillus fumigatus* AF293 (AFUA_6G11380), presente no banco de dados NCBI. Não houve alteração de nenhum nucleotídeo quando comparado com a sequência do mRNA do mesmo gene presente no banco de dados (não apresentado).

4.2.6 PCR para confirmação da transformação da levedura com o vetor *pYES2/Aftom20*

Foram realizadas transformações da cepa *S. cerevisiae tom20^{+/-}* com vetor *pYES2/Aftom20* e com pYES2/CT vazio. A fim de confirmar se a transformação com o vetor *pYES2/Aftom20* realmente ocorreu, foi realizada a extração do DNA de 9 colônias crescidas

em meio SC-URA⁻ líquido [glicose 2% (p/v)]. Posteriormente, foi realizada a PCR para amplificação do gene *Aftom20* utilizando este DNA como molde. Como controle negativo, foi utilizado o DNA extraído de leveduras transformadas apenas com o vetor pYES2/CT vazio crescidas em meio SC-URA⁻ líquido [glicose 2% (p/v)]. Como controle positivo, foi utilizado DNA genômico de *A. fumigatus* (KU80, *pyrG*⁻). Em seguida, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) (Figura 12).

Dessa forma, foi possível observar que todas as 9 colônias transformadas com vetor *pYES2/Aftom20* se mostraram positivas para a transformação, havendo a presença de bandas com 510 pb (colunas 3 – 11; Figura 12). Conforme o esperado, não houve amplificação do gene *Aftom20* no DNA das leveduras transformadas com o vetor vazio (colunas 12 – 13; Figura 12). O vetor pYES2/CT contém o marcador auxotrófico URA3, que seleciona as leveduras transformadas em meio deficiente de uracila. Assim, é possível afirmar também que a transformação com o vetor vazio se mostrou positiva, pois houve o crescimento de colônias em meio SC-URA⁻.

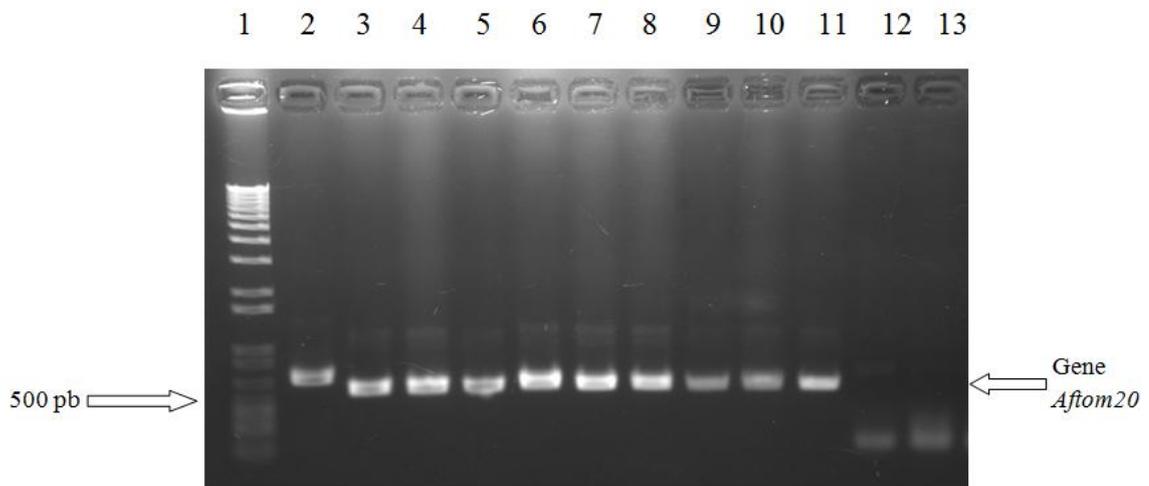


Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) do produto da PCR para amplificação do gene *Aftom20*, para confirmação da transformação da levedura, corado com *UniSafe Dye Nucleic Acid Staining (Uniscience)*. Coluna 1: Marcador 1 Kb Plus DNA Ladder (*ThermoFischer Scientific*); Coluna 2: Controle positivo; Coluna 3-11: Colônias 1-9 transformadas com vetor *pYES2/Aftom20*, respectivamente; Coluna 12 e 13: Colônias 1 e 2 transformadas com o vetor pYES2/CT vazio, respectivamente.

4.2.7 Quantificação da expressão gênica

Foi realizada a quantificação da expressão relativa do gene *Aftom20*, com o intuito de verificar a expressão deste gene na levedura *S. cerevisiae tom20^{+/-}* transformada com *pYES2/Aftom20* e sua não expressão na levedura transformada com *pYES2/CT* vazio. A análise da expressão gênica confirmou a expressão do gene *Aftom20* na levedura transformada com o vetor *pYES2/Aftom20*, após induzir sua expressão durante 4 e 8 horas. Além disso, também foi possível confirmar que não houve a expressão do gene *Aftom20* na levedura transformada com o vetor *pYES2/CT* vazio, após os mesmos tempos de indução da expressão (Figura 13).

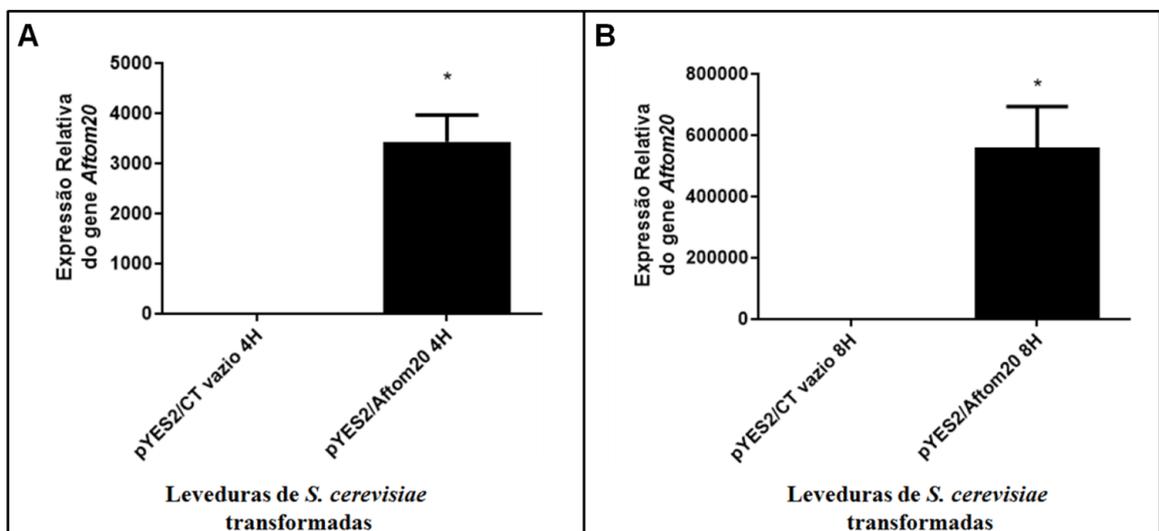


Figura 13 - Expressão relativa do gene *Aftom20*. **a:** Expressão do gene *Aftom20* na levedura contendo o vetor *pYES2/Aftom20* (a direita) e na levedura transformada com o vetor *pYES2/CT* vazio (a esquerda), 4 horas após a indução da expressão. **b:** Expressão do gene *Aftom20* na levedura contendo o vetor *pYES2/Aftom20* (a direita) e na levedura transformada com o vetor *pYES2/CT* vazio (a esquerda), após 8 horas de indução da expressão. A expressão do gene alvo foi normalizada pela expressão do gene da β -tubulina de *S. cerevisiae*. O resultado demonstrado é representativo de três repetições similares e independentes. O teste estatístico utilizado foi o teste t, com pós-teste de Wilcoxon-Mann Whitney. * significa diferença significativa $p < 0,05$.

Além disso, foi realizada também a quantificação da expressão relativa do gene *tom20* de *S. cerevisiae* por PCR quantitativo em tempo real, a fim de demonstrar a menor expressão deste gene na cepa *S. cerevisiae tom20^{+/-}* quando comparada com a cepa *S. cerevisiae tom20^{+/+}*. Ao analisar a expressão do gene *tom20* de *S. cerevisiae* nessas cepas foi possível

observar uma expressão menor ($p < 0,05$) na cepa *S. cerevisiae tom20^{+/-}* em relação à cepa *S. cerevisiae tom20^{+/+}* (Figura 14).

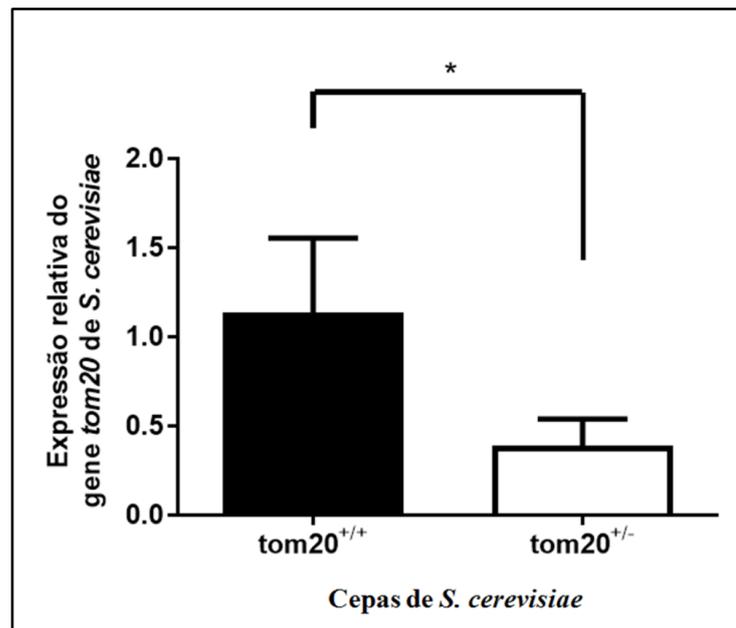


Figura 14 - Expressão relativa do gene *tom20* de *S. cerevisiae*. Expressão do gene *tom20* de *S. cerevisiae* na cepa *S. cerevisiae tom20^{+/-}* (a direita) e na cepa *S. cerevisiae tom20^{+/+}* (a esquerda). A expressão do gene alvo foi normalizada pela expressão do gene da β -tubulina de *S. cerevisiae*. O resultado demonstrado é representativo de três repetições similares e independentes. O teste estatístico utilizado foi o teste t, com pós-teste de Wilcoxon-Mann Whitney. * significa diferença significativa $p < 0,05$.

4.2.8 Análise da proteína recombinante Tom20 por Western Blotting

Foi realizada a indução da expressão da proteína recombinante nas leveduras transformadas com o vetor *pYES2/Aftom20* e *pYES2/CT* vazio, utilizando meio de cultura SC-URA⁻ líquido [galactose 2% (p/v)]. Em seguida, para confirmar a ocorrência da expressão, foi realizado Western Blotting, onde a membrana foi marcada com o anticorpo Anti-V5. O vetor *pYES2/CT* contém o epítipo V5 na extremidade C-terminal, portanto, é possível detectar a proteína recombinante utilizando o anticorpo anti-V5 (Figura 15). Nesta figura, foi possível observar a presença da proteína recombinante (aproximadamente 23,43 kDa) na levedura transformada com o vetor *pYES2/Aftom20*, depois de induzir sua expressão durante 4 e 8 horas (colunas 4 e 6, respectivamente). Como esperado, não foi detectada a presença desta proteína nos tempos 0 de ambas as leveduras (colunas 1 e 2, respectivamente), e nos tempos de indução 4 e 8 horas da levedura transformada com o vetor *pYES2/CT* vazio (colunas 3 e 5, respectivamente).

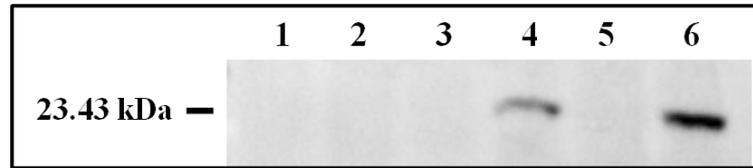


Figura 15 - Proteína recombinante Tom20 marcada com o anticorpo Anti-V5. Coluna 1: Levedura transformada com o vetor pYES2/CT vazio, Tempo 0. Coluna 2: Levedura transformada com a construção *pYES2/Aftom20*, Tempo 0. Coluna 3: Levedura transformada com o vetor pYES2/CT vazio, Tempo 4 h. Coluna 4: Levedura transformada com a construção *pYES2/Aftom20*, Tempo 4 h. Coluna 5: Levedura transformada com o vetor pYES2/CT vazio, Tempo 8 h. Coluna 6: Levedura transformada com a construção *pYES2/Aftom20*, Tempo 8 h.

Para demonstrar a presença da proteína recombinante Tom20 de *A. fumigatus* nas mitocôndrias das células, as mitocôndrias de ambas as leveduras foram isoladas. A seguir, foi realizado novamente Western Blotting após 8 horas da indução da expressão. A membrana foi marcada com o anticorpo Anti-V5 (Figura 16) e, posteriormente, com anticorpo anti-VDAC (Figura 17), para detectar a proteína Tom20 e a proteína mitocondrial constitutiva VDAC (aproximadamente 30 kDa), respectivamente. A detecção da proteína mitocondrial constitutiva VDAC é importante, pois se presente, demonstra que as proteínas presentes na membrana são realmente proteínas mitocondriais. Além disso, foi determinado por densitometria as intensidades das bandas geradas através do software ImageJ®. A intensidade do sinal gerado pela proteína Tom20 foi normalizada dividindo-se seu valor pelo da proteína VDAC correspondente (Anexo E).

Dessa forma, foi possível confirmar a presença da proteína recombinante Tom20 (aproximadamente 23,43 kDa) nas mitocôndrias da levedura transformada com o vetor *pYES2/Aftom20*, depois de induzir sua expressão durante 8 horas (coluna 1; Figura 16). Conforme esperado, não foi detectada a presença desta proteína nas mitocôndrias da levedura transformada com o vetor pYES2/CT vazio, após 8 horas da indução da expressão (coluna 2; Figura 16).

Em seguida, foi possível observar a presença da proteína VDAC em ambas as colunas, demonstrando assim, que as proteínas presentes na membrana eram realmente proteínas provenientes das mitocôndrias (Figura 17). Visto isso, estes resultados evidenciaram tanto a expressão da proteína recombinante Tom20 de *A. fumigatus*, como a sua presença nas mitocôndrias das leveduras transformadas com o vetor *pYES2/Aftom20*.

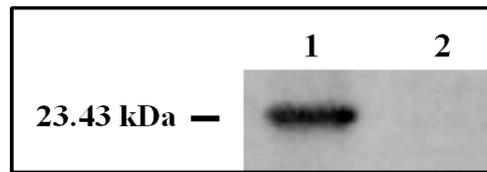


Figura 16 - Proteína recombinante Tom20 marcada com o anticorpo Anti-V5. Coluna 1: Proteínas mitocondriais das leveduras transformadas com *pYES2/Aftom20*. Coluna 2: Proteínas mitocondriais das leveduras transformadas com *pYES2/CT* vazio.

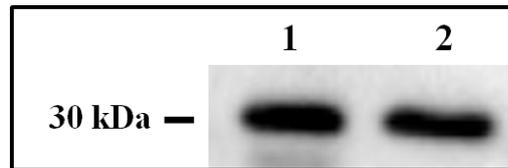


Figura 17 - Proteína mitocondrial constitutiva VDAC marcada com o anticorpo Anti-VDAC. Coluna 1: Proteínas mitocondriais das leveduras transformadas com *pYES2/Aftom20*. Coluna 2: Proteínas mitocondriais das leveduras transformadas com *pYES2/CT* vazio.

4.2.9 Análise da sequência de aminoácidos deduzida da proteína recombinante Tom20

A sequência deduzida de aminoácidos da proteína recombinante Tom20 de *A. fumigatus* apresentou 211 aminoácidos e um peso molecular calculado de 23,43 kDa (Figura 18). A análise da sequência de nucleotídeos da proteína recombinante foi realizada utilizando o programa SignalP 5.0, de acordo com Almagro Armenteros e colaboradores (2019), que prevê a presença de peptídeo sinal e do seu local de clivagem. Além disso, foi utilizado também o programa MEMSAT-SVM, de acordo com Nugent e Jones (2009), que prevê a presença de hélices transmembrana em proteínas.

Proteína recombinante Tom20 de *A. fumigatus*:

MKTSTLVAASAGTILTGLLAYAVYFDHKRQTDPEFRRSLKRNNRRLARAVKEEAE
 AQQAMQREAIKKA^VQQA^KKDEGFPTDLEEKEAYFMGQVARGESLCAEGSNQIEAA
 LCFYKALKVYPQPKDLISYDKTVPKDVLEILAEMVAMDAGLKLGSFTGEGGSAD
 NHGVEEFCRYPAQWRPLESRGPFEGKPIP^NPLLGLDSTR^TGHHHHHH

Nº de aminoácidos: 211

Peso molecular: 23.43 kDa

Figura 18 - Sequência de aminoácidos deduzidos da proteína recombinante. Os aminoácidos sublinhados constituem uma possível hélice transmembrana, predita utilizando MEMSAT-SVM (Anexo A). Em negrito estão indicados os aminoácidos codificados pela sequência de nucleotídeos do vetor pYES2/CT, dentre eles o epítipo V5 e a *tag* de poli-histidina (6xHis).

Ao observar o resultado da análise realizada pelo preditor MEMSAT-SVM, foi identificada a possível presença de apenas uma hélice transmembrana (Anexo A). Assim, é possível que a proteína possua apenas um domínio transmembrana e, por isso, realize apenas uma passagem de sua cadeia polipeptídica através do interior da membrana mitocondrial externa. Em relação à análise realizada pelo programa SignalP 5.0, o mesmo não identificou a presença de um peptídeo sinal (Anexo B). Dessa forma, a proteína recombinante Tom20 de *A. fumigatus* provavelmente é direcionada para a membrana externa das mitocôndrias por um sinal de direcionamento interno.

Foi realizada também uma comparação entre a sequência de aminoácidos da proteína recombinante Tom20 de *A. fumigatus*, com a sequência deduzida da proteína Tom20 de *A. fumigatus* AF293 (XP_751021.1), presente no banco de dados NCBI. Ao compará-las, esta última apresenta 169 aminoácidos, cuja sequência é idêntica a dos 169 primeiros aminoácidos da proteína recombinante Tom20 (não apresentado).

Além disso, utilizando o programa Clustal Omega, foi realizado o alinhamento da sequência de aminoácidos deduzidos da proteína Tom20 de *A. fumigatus* (sem os aminoácidos codificados pelo vetor pYES2/CT), com as sequências de aminoácidos das proteínas Tom20 de *S. cerevisiae* e de *N. crassa* (números de acesso no GenBank CAA97084.1 e EAA32584.1, respectivamente) que revelou os valores de identidade de 27% e 53%, respectivamente. Além disso, utilizando a ferramenta CDD (*Conserved Domain Database*), foram identificados nestas sequências domínios conservados pertencentes ao mesmo cluster, sendo ele o da superfamília MAS20 (conhecido também como Tom20), cujo número de acesso é cl03428. A

comparação entre tais sequências também revelou a possível presença de um motivo TPR (motivo tetratricopeptídeo) na proteína Tom20 de *A. fumigatus*. Esse motivo possui 34 aminoácidos, e uma sequência consenso altamente conservada entre as proteínas Tom20 de *S. cerevisiae* e *N. crassa*, que está presente na proteína Tom20 de *A. fumigatus*, sendo ela A₂₀-F₂₄-A₂₇-P₃₂. As proteínas Tom20 de *S. cerevisiae* e *N. crassa* compartilham também o motivo de sequência F-X-K-A-L-X-V, que foi identificada na proteína Tom20 de *A. fumigatus* (Figura 19).

Tom20 <i>S.cerevisiae</i>	MSQSNPILRGLAITT---	AIAALSATGYAIYFDYQRRNSPQFRKVL	RQRAKEQAKMEEQA	57		
Tom20 <i>A.fumigatus</i>	-----M-KTSTLVAASAGT	ILTGLLAYAVYFDHQRQTDPEFRRS	LKRNNRRLARAVKEE	53		
Tom20 <i>N.crassa</i>	----MPS-QAVTYT	TAAVAAVATGFLAYAVYFDYKRRNDPEFRRL	RRSARRQARQEKEY	55		
	:	:	:	:		
Tom20 <i>S.cerevisiae</i>	KTHAKEVKLQKVTEFLSMELAKDPI	PSDPSE	REATFTTNV	ENGERLSMQQGKELE	AASKF	117
Tom20 <i>A.fumigatus</i>	AEAQGAMQREAIKK-AVQAKDEGFP	TDLEEKEAYFMGQVARGESLCAEGSNQIE	AALCF	112		
Tom20 <i>N.crassa</i>	AELSQQAQRQRIRQ-MVDEAKEEGFP	TTSDKEEAYFLEQVQAGEILGQDPTKAID	ASLAF	114		
	:	:	:	:	:	
Tom20 <i>S.cerevisiae</i>	YKALTVY PPADLLG	IYQRSIPEAIYEYIIL	MIAILPPANVASFVKGVVGSKAESDAVAE	177		
Tom20 <i>A.fumigatus</i>	YKALKVY PPKDLIS	IYDKTVPKDVLLEILAE	MVAMDAGLKLGSFTGEGGSADNH-----	166		
Tom20 <i>N.crassa</i>	YKALKVY PTPGDLIS	IYDKTVAKPILDILAE	MIAIDPSPKIGTNYTGGVDVAELMREMAS	174		
	****	***	*	***	****	.
Tom20 <i>S.cerevisiae</i>	ANDIDD-	183				
Tom20 <i>A.fumigatus</i>	----GVE	169				
Tom20 <i>N.crassa</i>	APGVGLD	181				
	.					

Figura 19 - Alinhamento das sequências primárias de aminoácidos das proteínas Tom20 de *S. cerevisiae* e de *N. crassa*, com a sequência primária de aminoácidos deduzidos da proteína Tom20 de *A. fumigatus*. Os aminoácidos idênticos entre as três sequências estão destacados em amarelo. Os domínios conservados pertencentes à superfamília MAS20 estão enquadrados em preto. Os aminoácidos que compõem o motivo TPR estão destacados em negrito, e sua sequência consenso (A₂₀-F₂₄-A₂₇-P₃₂) em vermelho. O motivo de sequência F-X-K-A-L-X-V por sua vez, encontra-se sublinhado.

4.2.10 Avaliação da taxa de crescimento das leveduras transformadas

A fim de comparar a taxa de crescimento da levedura *S. cerevisiae tom20^{+/-}* transformada com *pYES2/Aftom20*, com a taxa de crescimento da mesma transformada com *pYES2/CT* vazio, foram realizados ensaios de crescimento em meio SC-URA⁻ [galactose 2% (p/v)] líquido e sólido, a 30°C. Assim, foram determinadas as DO_{600nm} das culturas crescidas em meio líquido nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 horas após a indução da expressão. Ao

comparar as duas curvas de crescimento, constatou-se que não houve diferença ($p > 0,05$) entre a taxa de crescimento da levedura transformada com a construção *pYES2/Aftom20* e da transformada com o vetor vazio (Figura 20).

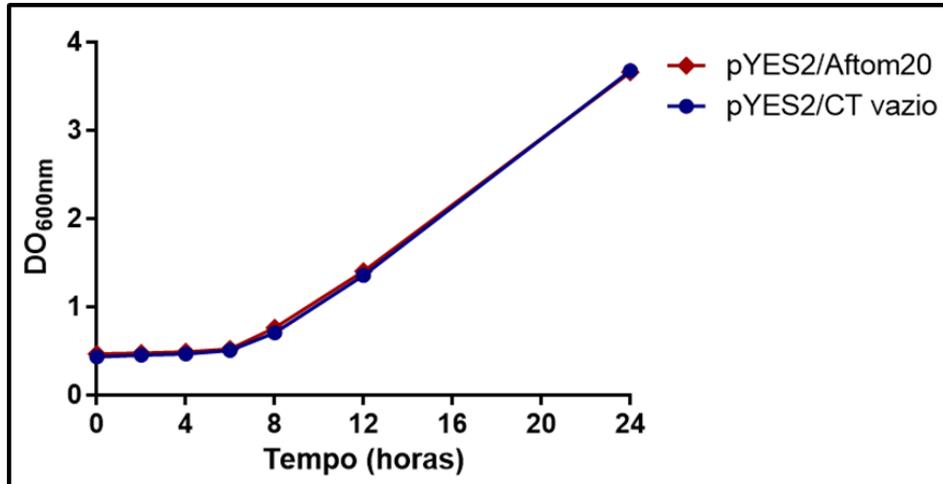


Figura 20 - Curva de crescimento em meio SC-URA⁻ líquido [galactose 2% (p/v)] das leveduras de *S. cerevisiae tom20^{+/-}* transformadas. A levedura transformada com a construção *pYES2/Aftom20* está representada pela linha vermelha; a levedura transformada com o vetor *pYES2/CT vazio* está representada pela linha azul. Os resultados demonstrados são representativos de três repetições similares e independentes.

A seguir, foi realizado o ensaio de crescimentos de ambas as leveduras em meio sólido após 72 horas de incubação, e seus resultados foram comparados (Figura 21). Ao analisar o crescimento das leveduras transformadas em meio sólido, por densitometria utilizando o software ImageJ®, constatou-se que não houve diferença ($p > 0,05$) entre suas taxas de crescimento, em nenhuma das diluições estudadas (Figura 21b).

Assim, sob as condições, diluições e meios testados, a expressão do gene *Aftom20* não acarretou nenhuma alteração na taxa de crescimento da levedura *S. cerevisiae tom20^{+/-}*.

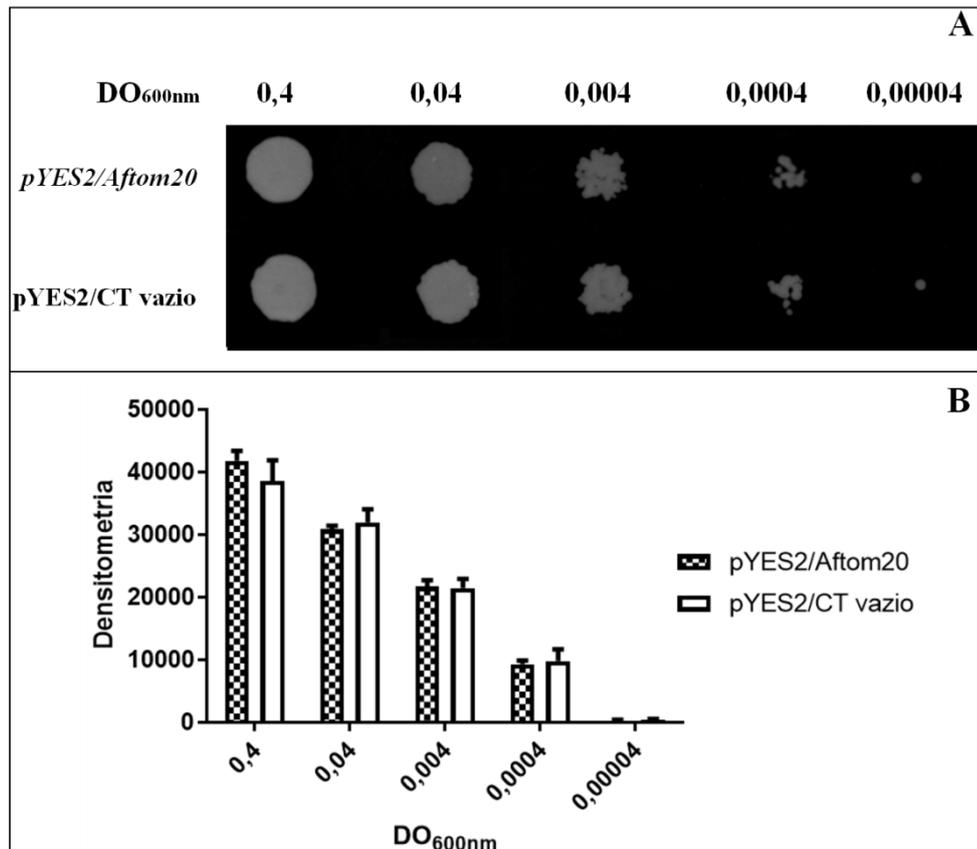


Figura 21 - Crescimento em meio SC-URA⁻ sólido [galactose 2% (p/v)] das leveduras de *S. cerevisiae tom20^{+/-}* transformadas. **a**: Fotografia das culturas das leveduras *S. cerevisiae tom20^{+/-}* transformadas com a construção *pYES2/Aftom20* e com o vetor *pYES2/CT vazio*. **b**: Análise por densitometria do crescimento das leveduras transformadas, utilizando o software ImageJ®. Os resultados demonstrados são representativos de três repetições similares e independentes.

4.2.11 Determinação do potencial de membrana mitocondrial

Para que ocorra a síntese de ATP pela F₀F₁-ATP sintase, a intensidade do potencial de membrana mitocondrial é essencial. Sendo assim, um importante parâmetro para se avaliar o processo de fosforilação oxidativa é através da medida do potencial de membrana mitocondrial. Dessa forma, a medida deste potencial pode indicar o quanto as mitocôndrias estão participando da geração de energia para as células.

A titulação do $\Delta\Psi$, foi realizada utilizando NADH 1 mmol/L, valinomicina 1 μ mol/L e adições sucessivas de KCl, sendo a primeira adição de 0,6 mmol/L atingindo 3 mmol/L na última adição. O potencial de membrana foi totalmente colapsado pela a adição de FCCP 20 μ mol/L. Posteriormente, as somas de potássio adicionado em cada etapa (0,6; 1,2; 1,8; 2,4 e 3,0 mM) foram usadas para calcular o $\Delta\Psi$ de acordo com a equação de Nernst. Para construir

a curva, a fluorescência absoluta foi normalizada em relação à amplitude da resposta de fluorescência. Para isso, foi calculado $\Delta F/F$, onde F é a intensidade da fluorescência após a adição de FCCP, e ΔF é F menos qualquer intensidade de fluorescência obtida. Em seguida, $\Delta F/F$ foi plotado como uma função do $\Delta\Psi$ calculado (Figura 22).

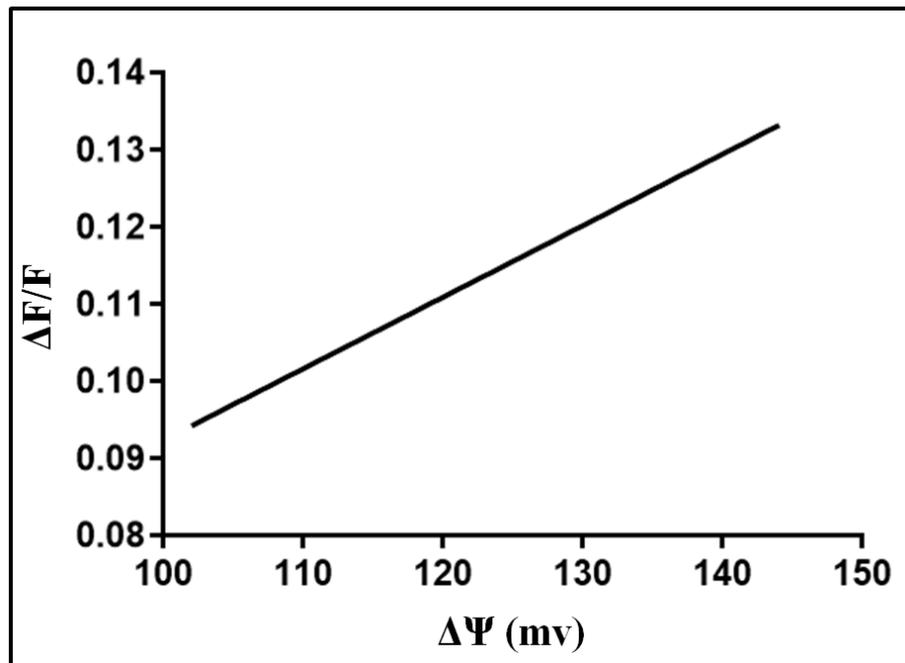


Figura 22 - Titulação do potencial de membrana mitocondrial em esferoplastos de *S. cerevisiae tom20^{+/-}* transformados com a construção *pYES2/Aftom20*. A concentração de proteínas adicionadas foi de 0,05 mg/mL em tampão de titulação sem íons potássio. A titulação foi realizada monitorando as alterações na fluorescência da safranina O, na presença de valinomicina, após sucessivas adições de KCl.

A seguir, foi realizada a determinação do $\Delta\Psi$ dos esferoplastos das leveduras transformadas, através do monitoramento das alterações na fluorescência da safranina O, após a adição sequencial de NADH 1 mmol/L, ADP 400 nmol, oligomicina 2 μ g e FCCP 20 μ mol/L.

Nos esferoplastos que expressavam a proteína recombinante Tom20, a adição de NADH gerou um $\Delta\Psi$ de 151 mV, diferente daqueles que não a expressavam onde foi gerado um $\Delta\Psi$ menor, de 123 mV. Após a estabilização da fluorescência, foi realizada a adição de ADP que acarretou a uma diminuição do $\Delta\Psi$ dos esferoplastos que expressavam a proteína recombinante. Entretanto, essa diminuição quase não foi observada naqueles que não a expressavam. A seguinte adição de oligomicina, por sua vez, foi responsável por restabelecer

o $\Delta\Psi$ dos esferoplastos contendo a proteína recombinante. Por outro lado, o mesmo não aconteceu com aqueles que não expressavam a proteína, pois após a adição de oligomicina quase não houve alteração do $\Delta\Psi$. Por fim, os $\Delta\Psi$ em esferoplastos de ambas as leveduras foram totalmente dissipados pela adição de FCCP (Figura 23).

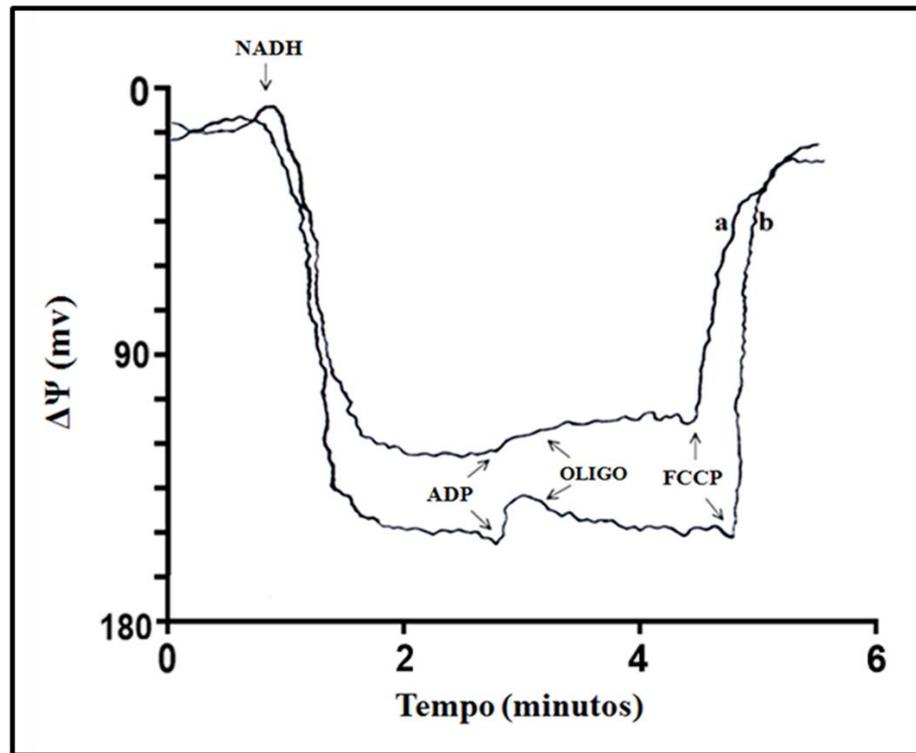


Figura 23 - Potencial de membrana mitocondrial e fosforilação de ADP em esferoplastos de *S. cerevisiae tom20^{+/-}* transformados. **a:** Medida do potencial de membrana mitocondrial da levedura transformada com o vetor pYES2/CT vazio. **b:** Medida do potencial de membrana mitocondrial da levedura transformada com a construção pYES2/Aftom20. A concentração de proteínas adicionada foi de 0,05 mg/mL em tampão de ressuspensão para esferoplastos. As adições indicadas pelas setas foram: NADH 1 mmol/L, ADP 400 nmol, oligomicina 2 μ g, FCCP 20 μ mol/L.

5. DISCUSSÃO

O *A. fumigatus* é a principal espécie responsável pelos casos de aspergilose invasiva. A aspergilose invasiva é a manifestação clínica mais grave causada por este fungo, podendo ser fatal caso não seja tratada. A evolução da infecção por *A. fumigatus* para aspergilose invasiva necessita da germinação dos conídios, sendo a atividade mitocondrial muito importante para esse processo (TAUBITZ et al., 2007; LATGÉ; CHAMILOS, 2019). Sabe-se que a maioria das proteínas mitocondriais são codificadas pelo DNA nuclear, sendo o complexo TOM o principal ponto de entrada dessas pré-proteínas nas mitocôndrias (ENDO; YAMANO, 2009; WIEDEMANN; PFANNER, 2017). Em mamíferos e alguns fungos, a proteína Tom20 deste complexo possui grande importância por reconhecer precursores proteicos que possuem pré-sequência na sua extremidade N-terminal. Entre tais precursores, estão alguns dos que irão compor a cadeia transportadora de elétron (KÜNKELE et al., 1998; GEBERT et al., 2012; SHIOTA et al., 2015). Entretanto, a função da proteína Tom20 de *A. fumigatus* ainda não foi descrita. Visto isso, este estudo visou à compreensão a respeito da função do gene *Aftom20* através da expressão heteróloga deste em *S. cerevisiae tom20^{+/-}*.

Inicialmente, foi realizada a clonagem do gene *Aftom20* em dois vetores distintos, o vetor pET-28a e o vetor pYES2/CT. Para a clonagem deste gene no vetor pET-28a, o gene *Aftom20* foi amplificado a partir do cDNA, utilizando a *Taq DNA polymerase Phusion High Fidelity*. Foi utilizada esta enzima, pois ela apresenta uma alta fidelidade, com taxas de erros muito menores quando comparada a outras enzimas (DOLGOVA; STUKOLOVA, 2017). Além disso, ela possui um elevado rendimento, e não introduz nenhum nucleotídeo extra nas extremidades do produto (QUAN; TIAN, 2011). Após a clonagem do gene *Aftom20* no vetor pET-28a, foi realizado o seu sequenciamento. A análise comparativa do resultado do sequenciamento, com a sequência do mRNA deste gene disponível no banco de dados, é fundamental para a verificação de mutações que poderiam ter sido incluídas na sequência clonada. Essa análise também é importante para a verificação de ocorrência de *splicing* alternativo, que acarreta na produção de diferentes isoformas da proteína, podendo alterar a sua localização, estabilidade e atividade enzimática. Além disso, alterações podem introduzir códons de parada causando uma regulação negativa da expressão deste gene (REDDY, 2007; LICATALOSI; DARNELL, 2010). Entretanto, quando a análise comparativa foi realizada, observou-se que não há divergência entre as sequências, demonstrando que o gene não sofreu qualquer tipo de alteração molecular. Uma das razões pela qual foi utilizado o vetor pET-28a é que, se a expressão desta proteína em *E. coli* fosse necessária, a enzima T7 RNA polimerase

reconheceria uma sequência presente neste vetor. Assim, após a indução da expressão, a atividade e seletividade desta enzima faria com que a maioria dos recursos da célula fossem convertidos para que ocorresse a biossíntese da proteína de interesse, obtendo-a em grande quantidade. Entretanto, esta expressão não foi necessária neste estudo.

Em relação à clonagem deste gene no vetor pYES2/CT, optou-se por este vetor por ele ter sido projetado para realizar a indução da expressão de proteínas recombinantes em *S. cerevisiae*. Para tanto, o vetor contém o promotor GAL1, com este promotor, a indução da expressão é feita em alto nível pela galactose (GINIGER et al., 1985). Além disso, ele possui um peptídeo C-terminal que codifica o epítipo V5 e uma *tag* de poli-histidina (6xHis), que permite detectar as proteínas cuja expressão é induzida (SOUTHERN et al., 1991; LINDNER et al., 1997).

A análise da expressão do gene *Aftom20* por PCR quantitativo em tempo real, confirmou a sua expressão apenas na levedura *S. cerevisiae tom20^{+/-}* contendo a construção *pYES2/Aftom20*. Entretanto, mesmo que a expressão gênica esteja ocorrendo nesta levedura, é necessário investigar se, após a tradução, a proteína produzida está sendo direcionada e integrada nas mitocôndrias. Isso porque, modificações pós-traducionais inesperadas poderiam alterar as características físico-químicas e estruturais da proteína recombinante, fazendo com que a mesma não fosse direcionada corretamente para as mitocôndrias (MANN; JENSEN, 2003). Neste sentido, os resultados do Western Blotting demonstraram que, mesmo com 42 aminoácidos a mais do que a proteína Tom20 de *A. fumigatus* AF293 (prevista pela sequência de nucleotídeos presente no banco de dados), a proteína recombinante está sendo expressa e direcionada para as mitocôndrias. Estes aminoácidos a mais foram codificados pela sequência de nucleotídeos do vetor pYES2/CT, dentre eles estão o epítipo V5 e a *tag* de poli-histidina (6xHis).

Além disso, através de PCR quantitativo em tempo real, também foi demonstrada a menor expressão do gene *tom20* na cepa *S. cerevisiae tom20^{+/-}* (utilizada durante todo este estudo), quando comparada a cepa *S. cerevisiae tom20^{+/+}* (contendo os dois alelos do gene *tom20*). Dessa forma, pode-se afirmar que a deleção de um dos alelos do gene *tom20* de *S. cerevisiae* realmente acarretou a uma diminuição da expressão deste gene e, conseqüentemente, a uma provável diminuição na produção desta proteína. Por isso, essa levedura foi utilizada para estudar, através da expressão heteróloga, a função do gene *Aftom20*.

Em relação à análise da sequência de aminoácidos deduzida do produto primário da tradução da proteína recombinante, o programa SignalP 5.0 não identificou a presença de um

peptídeo sinal. Desta forma, existe uma alta probabilidade dessa sequência não conter um peptídeo sinal, mas sim um sinal de direcionamento interno, que a direciona para a membrana externa das mitocôndrias (CHACINSKA et al., 2009). O programa MEMSAT-SVM por sua vez, identificou a presença de apenas uma possível hélice transmembrana. Além disso, o resultado da análise sugere que a maior parte desta proteína encontra-se projetada para o citoplasma, possuindo apenas uma única hélice transmembrana contida na membrana externa. O mesmo foi constatado por Ramage e colaboradores (1993) que, após analisarem a sequência de aminoácidos da proteína Tom20 de *S. cerevisiae*, concluíram que a maior parte dela também está projetada para o citoplasma, além de possuir apenas uma hélice transmembrana contida na membrana externa.

As hélices transmembrana estão presentes nos domínios transmembranares (TMD). Os TMDs são regiões hidrofóbicas de uma proteína que são inseridos preferencialmente na membrana celular. Estes domínios possuem uma configuração helicoidal que envolve a membrana, sendo a α -hélice transmembrana a mais comum (WAYNE ALBERS, 2012). Existe uma classe importante de proteínas de membrana mitocondrial externa que possuem um único TMD em sua região N-terminal. Além disso, a maioria dos polipeptídeos dessas proteínas encontram-se projetados para o citoplasma, contendo apenas um pequeno segmento N-terminal que atravessa a membrana externa (AHTING et al., 2005; WALTHER; RAPAPORT, 2009). Estas características também foram preditas na proteína Tom20 de *A. fumigatus*. As proteínas pertencentes a essa classe são conhecidas como proteínas sinal-ancoradas, pois, ao invés de possuírem um peptídeo sinal (pré-sequência clivável), seu TMD e suas regiões flanqueadoras funcionam como sinal de direcionamento interno para direcioná-las às mitocôndrias (SHORE et al., 1995; RAPAPORT, 2003). Dessa forma, o TMD é importante tanto para a ancoragem destas proteínas na membrana, como para seu direcionamento à mitocôndria, possuindo uma função sinal-âncora. Enquanto isso, os resíduos da região flanqueadora são responsáveis por auxiliar o TMD aumentando a taxa geral de importação. Alguns exemplos destas proteínas sinal-ancoradas são Tom70, Tom20 e Tom45 de leveduras e mamíferos (MCBRIDE et al., 1992; KANAJI et al., 2000; RAPAPORT, 2003; WAIZENEGGER et al., 2003; AHTING et al., 2005; HABIB et al., 2007; RIMMER et al., 2011; NEUPERT et al., 2015; JUN et al., 2016). Entretanto, tais proteínas não possuem nenhuma semelhança de sequência em seus TMDs. Assim, as informações responsáveis pelo seu direcionamento provavelmente não estão em uma sequência primária específica, mas sim estão codificadas em elementos estruturais (SHORE et al., 1995; RAPAPORT, 2003).

Devido ao caráter variável e não suficientemente caracterizável desses sinais de direcionamento interno, nas buscas efetuadas para realizar o presente estudo, não foram encontrados algoritmos disponíveis para a previsão destes sinais. Outros estudos também apresentaram a mesma dificuldade apesar da existência de diversos algoritmos para prever pré-sequências mitocondriais (HABIB et al., 2007). Portanto, a proteína recombinante Tom20 de *A. fumigatus* provavelmente é direcionada para a membrana externa das mitocôndrias por um sinal de direcionamento interno, que está contido em seu TMD. Entretanto, devido à ausência de algoritmos preditores, para demonstrar com um bom nível de segurança a localização do sinal de direcionamento da proteína Tom20 de *A. fumigatus* seria indicado utilizar abordagens experimentais que analisem sinais de direcionamento mitocondrial (HABIB et al., 2007).

A comparação entre as sequências de aminoácidos das proteínas Tom20 de *S. cerevisiae*, *N. crassa* e *A. fumigatus* demonstrou a presença de domínios conservados pertencentes à mesma superfamília MAS20. Um cluster de superfamília é um conjunto de modelos de domínios conservados que representam domínios evolutivamente relacionados. Os domínios por sua vez, são regiões funcionais que geralmente compõem as proteínas. Assim, quando combinados, os diferentes domínios originam as diferentes proteínas. Dessa forma, identificar os domínios presentes nas proteínas pode ajudar a obter informações a respeito das suas funções. Visto isso, os domínios conservados identificados nessas proteínas, são domínios pertencentes ao mesmo cluster, e geralmente são encontrados em proteínas Tom20, cuja função está associada com o reconhecimento e transporte de proteínas para os compartimentos mitocondriais (LU et al., 2020; UNIPROT CONSORTIUM, 2021).

O alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas Tom20 de *S. cerevisiae*, *N. crassa* e *A. fumigatus*, demonstrou também a presença de um possível motivo TPR (motivo tetratricopeptídeo) na proteína Tom20 de *A. fumigatus*, com os mesmos resíduos consenso contidos nos motivos TPR das proteínas Tom20 de *S. cerevisiae* e *N. crassa*. Um motivo é uma região curta e conservada de uma proteína. O motivo TPR consiste em 3 a 16 repetições em tandem de 34 resíduos de aminoácidos, embora possam ser encontrados motivos TPR individuais espalhados pela proteína. Este motivo é composto por dois domínios (A e B), sendo encontrado em várias proteínas de organismos procariotos e eucariotos. As funções das proteínas contendo TPR estão relacionadas com a regulação de processos biológicos vitais como neurogênese, ciclo celular, síntese de RNA, dobramento de proteínas, resposta ao choque térmico e transporte de proteínas mitocondriais. O TPR facilita interações proteína-proteína intra e intermoleculares, além de auxiliar na montagem de complexos multiproteicos.

A maioria das proteínas contêm vários motivos TPR, entretanto, em proteínas Tom20 de fungos e animais é encontrado apenas um (IWAHASHI et al., 1997; D'ANDREA; REGAN, 2003; RIMMER et al., 2011). Uma possível justificativa para isso se deve ao tamanho dessas proteínas, como é o caso das proteínas Tom20 de *S. cerevisiae* e *N. crassa*, que são muito menores do que a maioria das proteínas onde TPR também foi identificado (MOCZKO et al., 1994). Nestas proteínas, este motivo auxilia nas interações entre Tom20 e Tom70, além de possibilitar a associação entre Tom20 e chaperonas citosólicas (Hsp70 e Hsp90). Tais chaperonas e Tom20 geralmente atuam de maneira sequencial no transporte de precursores (HARKNESS et al., 1994; MOCZKO et al., 1994; HAUCKE et al., 1996; AVENDAÑO-MONSALVE et al., 2020). Os motivos TPR são regiões variáveis. Apesar disso, foram identificados oito resíduos consenso fracamente conservados entre as proteínas, sendo eles W₄-L₇-G₈-Y₁₁-A₂₀-F₂₄-A₂₇-P₃₂. Entretanto, nenhum desses resíduos é invariável e quando há alguma variação, são encontrados geralmente resíduos hidrofóbicos no lugar. Assim, a alta variação de sequência dos TPRs é compatível com a alta variedade de funções das proteínas que os contêm (LAMB et al., 1995; CERVENY et al., 2013). O motivo TPR das proteínas Tom20 de *S. cerevisiae* e *N. crassa*, bem como o possível motivo TPR identificado na proteína Tom20 de *A. fumigatus*, apresentam uma sequência consenso perfeita para apenas 4 destes resíduos (A₂₀-F₂₄-A₂₇-P₃₂). Em adição, essas mesmas proteínas possuem também outro motivo de sequência contido no domínio B do motivo TPR (F-X-K-A-L-X-V) (RAMAGE et al., 1993; IWAHASHI et al., 1997). Em relação aos demais resíduos que são diferentes dos propostos como consenso em outras proteínas (W₄-L₇-G₈-Y₁₁), 3 deles são idênticos entre as proteínas Tom20 de *S. cerevisiae*, *N. crassa* e *A. fumigatus* (V₄-G₇-E₈), apesar de apenas dois deles serem hidrofóbicos (V e G).

A fim de avaliar o papel da proteína recombinante Tom20 no crescimento da levedura em meio fermentável, foram realizados ensaios de crescimento em meio SC-URA⁻ [galactose 2% (p/v)] líquido e sólido, a 30°C. A seguir, realizou-se uma análise das taxas de crescimento das leveduras *S. cerevisiae tom20^{+/-}* transformadas com o vetor pYES2/CT vazio e com a construção pYES2/Aftom20. Ao realizar a comparação entre as taxas de crescimento de ambas as leveduras, observou-se que em nenhum dos meios, tempos ou diluições analisadas a expressão do gene Aftom20 acarretou uma melhora ou piora no crescimento da levedura *S. cerevisiae tom20^{+/-}*. Em contrapartida, Moczko e colaboradores (1994) demonstraram que a deleção total do gene *tom20* de *S. cerevisiae*, acarretou uma alta redução na taxa de crescimento desta levedura, sendo ela reduzida em 50% quando crescida em meio líquido contendo fonte de carbono fermentável (2% de peptona e 2% de glicose), a 30°C. Além disso,

essa cepa se mostrou incapaz de crescer em meio líquido contendo fonte de carbono não fermentável (peptona 2%, glicerol 3%). Por outro lado, Ramage e colaboradores (1993) corroboram com o presente estudo ao demonstrarem que o crescimento da cepa $\Delta tom20$ quase não sofria alteração em meios fermentáveis (líquido e sólido) contendo glicose como principal fonte de carbono (peptona 2% e glicose 2%), apesar de apresentar perda do seu crescimento em ambos os meios não fermentáveis (contendo peptona 2%, glicerol 3% e etanol 3%). Além disso, os autores também afirmaram que em algumas cepas é possível que os efeitos da deleção do gene *tom20* possam ser compensados pelos níveis de expressão normais do gene *tom70*. Dessa forma, é possível que a levedura *S. cerevisiae tom20^{+/-}* não apresente alterações na sua taxa crescimento em meio fermentável mesmo após a deleção parcial do gene *tom20*, e por isso, a expressão ou não do gene *Aftom20* também não acarrete a uma alteração nesta taxa de crescimento.

Visto que as leveduras $\Delta tom20$ são incapazes de crescer em meio não fermentável, uma condição interessante a ser estudada seria uma comparação entre as taxas de crescimento das leveduras de *S. cerevisiae tom20^{+/-}* transformadas neste meio. Assim, seria possível avaliar o papel da proteína recombinante Tom20 no crescimento impulsionado apenas pela respiração. Entretanto, isso não foi possível neste trabalho, uma vez que para avaliar tal taxa de crescimento, o meio de cultura precisaria conter apenas fontes de carbono não fermentáveis, não podendo conter, neste caso, a galactose (necessária para a indução da expressão do gene *Aftom20*). Mesmo realizando o crescimento destas leveduras em meio fermentável contendo galactose antes de realizar a análise do seu crescimento em meio não fermentável, não foi observado diferença no crescimento (dados não apresentados).

Em diversos organismos, assim como em *S. cerevisiae*, a proteína Tom20 auxilia no transporte de proteínas para o interior das mitocôndrias. Entre elas, estão algumas proteínas que compõem os complexos mitocondriais que participam do processo de fosforilação oxidativa (SOLLNER et al., 1989; MOCZKO et al., 1994, BRIX et al., 1997; YAMANO et al., 2008; JORES et al., 2016). Para avaliar esse processo, o $\Delta\Psi$ é um parâmetro importante a ser determinado. Assim, a determinação do $\Delta\Psi$ foi realizada utilizando o corante catiônico safranina O. Por ser lipofílico, este corante se acumula na membrana mitocondrial interna de acordo com o $\Delta\Psi$, mas sem responder ao ΔpH (ZANOTTI; AZZONE, 1980).

O $\Delta\Psi$ das mitocôndrias dos esferoplastos de *S. cerevisiae tom20^{+/-}* transformadas com *pYES2/Aftom20* e com *pYES2/CT* vazio foi monitorado durante a fosforilação do ADP sustentada pela oxidação de NADH. Foi observado que o $\Delta\Psi$ gerado por NADH foi diferente entre os esferoplastos, sendo gerado um $\Delta\Psi$ maior naqueles cuja proteína recombinante

Tom20 estava expressa. Além disso, após a adição de ADP seguida pela adição de oligomicina, observou-se que os esferoplastos que não expressavam a proteína recombinante Tom20 não foram capazes de realizar a fosforilação de ADP. Diferente daqueles que a expressavam, os quais foram capazes de realizar essa fosforilação. Portanto, sem a expressão desta proteína o processo de fosforilação oxidativa apresentou-se prejudicado tanto pela geração de um potencial de membrana menor, quanto pela não fosforilação de ADP. Estes resultados sugerem que a função exercida pelo gene *Aftom20* influencia na atividade do sistema que realiza a fosforilação oxidativa. Dessa forma é possível que, assim como as proteínas Tom20 de outros organismos, a proteína Tom20 de *A. fumigatus* também seja responsável pelo reconhecimento de outras proteínas pertencentes aos complexos deste sistema.

Dentre os precursores mitocondriais que possivelmente são reconhecidos por Tom20 devido à presença de uma pré-sequência de direcionamento clivável em sua extremidade N-terminal, estão os precursores que compõem o complexo II da cadeia respiratória (succinato desidrogenase). Em *S. cerevisiae*, este é o único complexo da cadeia respiratória que possui todas as suas subunidades codificadas pelo DNA nuclear, e por isso, dependem do complexo TOM para serem reconhecidas e transportadas para o interior das mitocôndrias. A perda de função do complexo II na levedura *S. cerevisiae* a torna incapaz de crescer em meio contendo fontes de carbono não fermentáveis (LEMIRE; OYEDOTUN, 2002). Além disso, Hua e colaboradores (2020) relataram que, após o uso de um composto identificado como inibidor da succinato desidrogenase, houve uma diminuição no $\Delta\Psi$ mitocondrial no fungo *Botrytis cinerea*. Desta forma, caso este complexo tenha sua atividade inibida ou reduzida, devido o reconhecimento e transporte dos seus precursores estarem prejudicados, é possível que ocorra uma redução do $\Delta\Psi$, como foi observado nas leveduras *S. cerevisiae tom20^{+/-}*. Assim, uma hipótese é que a proteína recombinante Tom20 de *A. fumigatus* realize o reconhecimento desses e de outros precursores (que também participam da fosforilação oxidativa), fazendo com que seu transporte e atividade sejam recuperados nas leveduras que a expressem. Sendo observado então, a fosforilação de ADP e um aumento do $\Delta\Psi$ nestas leveduras em relação àquelas que não a expressa.

Esta hipótese também é corroborada pelos estudos realizados por Moczko e colaboradores (1994). Após realizarem ensaios de importação de precursores de proteínas mitocondriais em *S. cerevisiae Atom20*, estes autores evidenciaram que a proteína Tom20 desta levedura é responsável pelo reconhecimento de outros precursores contendo pré-sequência clivável, como a subunidade beta de F1-ATPase e citocromo c. Além de reconhecer

também (mesmo que em menor escala) alguns precursores contendo sinal de direcionamento interno, como o translocador ADP/ATP e o transportador de ADP. Neste mesmo sentido, Sollner e colaboradores (1989) evidenciaram em seus estudos que Tom20 de *N. crassa* é responsável por reconhecer e auxiliar no transporte de alguns precursores cliváveis como citocromo c1, proteína Fe/S do complexo III, subunidade 9 da F₀-ATPase e subunidade beta da F₁-ATPase.

Yamano e colaboradores (2008) também investigaram sobre o reconhecimento e transporte de algumas proteínas mitocondriais, como Tim23, translocador ADP/ATP, Tim13, citocromo c, o precursor da Hsp60 e o da F₁-ATPase subunidade β. Além disso, analisaram qual a influência da proteína Tom20 de *S. cerevisiae* na montagem do poro Tom40. Essas análises foram realizadas utilizando a levedura *S. cerevisiae* após a deleção dos domínios dos seus receptores Tom20 e Tom22. Os autores concluíram que os precursores das proteínas Tim13 e citocromo c não dependem do reconhecimento dessas proteínas para serem transportados, apesar delas auxiliarem (mesmo que em pouca proporção) no transporte dos precursores de Tim23 e do translocador ADP/ATP. Além disso, demonstraram que Tom20 e Tom22 são as principais responsáveis pelo transporte dos precursores de Hsp60, F₁-ATPase subunidade β, além de influenciar na montagem do poro Tom40 (YAMANO et al., 2008). Ramage e colaboradores (1993) também constataram em seus estudos que leveduras *S. cerevisiae* $\Delta tom20$ continham níveis menores de citocromo b e citocromo a3, e sugeriram que a perda do crescimento não fermentativo dessas leveduras possa ser devido à respiração defeituosa pela deficiência desses componentes.

Portanto, como descrito acima, dentre as proteínas que em outros organismos dependem majoritariamente ou parcialmente da proteína Tom20 para serem reconhecidas e transportadas para o interior das mitocôndrias estão o citocromo b, citocromo c1 e a proteína Fe/S (pertencentes ao complexo III), citocromo a3 (pertencente ao complexo IV), subunidade β da F₁-ATPase e subunidade 9 da F₀-ATPase (pertencentes ao complexo V) e o citocromo c. Como tais proteínas participam do processo de fosforilação oxidativa e são transportadas para as mitocôndrias com o auxílio da proteína Tom20, é provável que elas estejam presentes em níveis diminuídos nas leveduras *S. cerevisiae tom20^{+/-}* e, por isso, foi observado um $\Delta\Psi$ de amplitude menor nestas leveduras, bem como a não fosforilação de ADP. A incapacidade de realizar a fosforilação de ADP observada pode ser devido ao (1) menor $\Delta\Psi$ gerado que não é suficiente para promover a síntese de ATP, ou a (2) uma alteração na atividade do complexo V (F₀F₁-ATP sintase), devido a uma deficiência no transporte dos precursores que o compõem (F₁-ATPase subunidade β e F₀-ATPase subunidade 9, por exemplo). Como o $\Delta\Psi$ e a

fosforilação de ADP são recuperados quando a proteína recombinante Tom20 de *A. fumigatus* é expressa, é possível que esta proteína reconheça tais precursores, permitindo o seu transporte para o interior das mitocôndrias em níveis maiores, e conseqüentemente, o melhor exercício de suas funções.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho nos permite concluir que:

- A sequência de cDNA do gene *Aftom20* possui 510 nucleotídeos e, quando clonado em vetor pYES2/CT, codifica uma proteína de 211 aminoácidos.
- A expressão da proteína recombinante Tom20 de *A. fumigatus* não influencia no crescimento da levedura *S. cerevisiae tom20^{+/-}* em meio fermentável.
- A proteína recombinante Tom20 de *A. fumigatus* possui função importante para a atividade mitocondrial, podendo ser responsável pelo reconhecimento de proteínas que compõem a cadeia transportadora de elétrons e a ATP-sintase.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir das descobertas realizadas neste trabalho existem alguns estudos que podem ser realizados no futuro, a fim de ampliar a compreensão a respeito da função da proteína Tom20 de *A. fumigatus*. Entre eles, estão outros estudos bioenergéticos para elucidar com maiores detalhes a contribuição desta proteína para o metabolismo celular. Para isso, seria interessante realizar a medida do $\Delta\Psi$ dos esferoplastos de *S. cerevisiae tom20^{+/-}* transformados, após a adição de outros substratos (como succinato e TMPD/ascorbato), e de inibidores dos complexos que compõem a cadeia transportadora de elétrons (como flavona, antimicina A e cianeto). Além disso, seria importante monitorar o consumo de oxigênio destes esferoplastos determinando parâmetros respiratórios, e correlacionar estes resultados com aqueles obtidos a partir da medida do $\Delta\Psi$, para avaliar as atividades dos complexos I, II, III, IV e V.

Além disso, outro estudo interessante envolveria a análise do transporte dos precursores que compõem os cinco complexos que realizam o processo de fosforilação oxidativa, para o interior das mitocôndrias. Assim, seria possível elucidar a participação da proteína Tom20 de *A. fumigatus* no reconhecimento e transporte destes precursores, e possivelmente, compreender melhor o motivo da sua influência no processo de fosforilação oxidativa.

8. REFERÊNCIAS

ABAD, A.; FERNÁNDEZ-MOLINA, J. V.; BIKANDI, J.; RAMÍREZ, A. *et al.* What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. **Rev Iberoam Micol**, 27, n. 4, p. 155-182, 2010 Oct-Dec 2010.

AGARWAL, R.; AGGARWAL, A. N.; GARG, M.; SAIKIA, B. *et al.* Allergic bronchopulmonary aspergillosis with aspergilloma: an immunologically severe disease with poor outcome. **Mycopathologia**, 174, n. 3, p. 193-201, Sep 2012.

AGARWAL, R.; CHAKRABARTI, A. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in asthma: epidemiological, clinical and therapeutic issues. **Future Microbiol**, 8, n. 11, p. 1463-1474, Nov 2013.

AGARWAL, R.; HAZARIKA, B.; GUPTA, D.; AGGARWAL, A. N. *et al.* *Aspergillus* hypersensitivity in patients with chronic obstructive pulmonary disease: COPD as a risk factor for ABPA? **Med Mycol**, 48, n. 7, p. 988-994, Nov 2010.

AHTING, U.; WAIZENEGGER, T.; NEUPERT, W.; RAPAPORT, D. Signal-anchored proteins follow a unique insertion pathway into the outer membrane of mitochondria. **J Biol Chem**, 280, n. 1, p. 48-53, Jan 07 2005.

AKERMAN, K. E.; WIKSTRÖM, M. K. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. **FEBS Lett**, 68, n. 2, p. 191-197, Oct 1976.

ALMAGRO ARMENTEROS, J. J.; TSIRIGOS, K. D.; SØNDERBY, C. K.; PETERSEN, T. N. *et al.* SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. **Nat Biotechnol**, 37, n. 4, p. 420-423, 04 2019.

ARAIKO, Y.; TSUTSUMI, A.; QIU, J.; IMAI, K. *et al.* Structure of the mitochondrial import gate reveals distinct preprotein paths. **Nature**, 575, n. 7782, p. 395-401, 11 2019.

ARASTEHFAR, A.; CARVALHO, A.; HOUBRAKEN, J.; LOMBARDI, L. *et al.* and aspergillosis: From basics to clinics. **Stud Mycol**, 100, p. 100115, Sep 2021.

ARCHIBALD, J. M. Endosymbiosis and Eukaryotic Cell Evolution. **Curr Biol**, 25, n. 19, p. 911-921, Oct 2015.

ASHU, E. E.; KORFANTY, G. A.; SAMARASINGHE, H.; PUM, N. *et al.* Widespread amphotericin B-resistant strains of. **Infect Drug Resist**, 11, p. 1549-1555, 2018.

AVENDAÑO-MONSALVE, M. C.; PONCE-ROJAS, J. C.; FUNES, S. From cytosol to mitochondria: the beginning of a protein journey. **Biol Chem**, 401, n. 6-7, p. 645-661, 05 2020.

BALAMURUGAN, V.; SEN, A.; SARAVANAN, P.; SINGH, R. K. **Biotechnology in the Production of Recombinant Vaccine or Antigen for Animal Health. Journal of Animal and Veterinary Advances**, 5, n. 6, p. 487-495, 2006.

- BALICO, L. L. L.; DE SOUZA SANTOS, E.; SUZUKI-HATANO, S.; SOUSA, L. O. *et al.* Heterologous expression of mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide transporter (Ndt1) from *Aspergillus fumigatus* rescues impaired growth in Δ ndt1 Δ ndt2 *Saccharomyces cerevisiae* strain. **J Bioenerg Biomembr**, 49, n. 6, p. 423-435, Dec 2017.
- BANEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Curr Opin Biotechnol**, 10, n. 5, p. 411-421, Oct 1999.
- BAUER, M. F.; HOFMANN, S.; NEUPERT, W.; BRUNNER, M. Protein translocation into mitochondria: the role of TIM complexes. **Trends Cell Biol**, 10, n. 1, p. 25-31, Jan 2000.
- BAUSEWEIN, T.; MILLS, D. J.; LANGER, J. D.; NITSCHKE, B. *et al.* Cryo-EM Structure of the TOM Core Complex from *Neurospora crassa*. **Cell**, 170, n. 4, p. 693-700.e697, Aug 2017.
- BERTERO, E.; MAACK, C. Calcium Signaling and Reactive Oxygen Species in Mitochondria. **Circ Res**. 122: 1460 - 1478 p. 2018.
- BLAIZE, M.; MAYAUX, J.; NABET, C.; LAMPROS, A. *et al.* Fatal Invasive Aspergillosis and Coronavirus Disease in an Immunocompetent Patient. **Emerg Infect Dis**, 26, n. 7, p. 1636-1637, 07 2020.
- BODEY, G. P.; VARTIVARIAN, S. Aspergillosis. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, 8, n. 5, p. 413 - 437, 1989.
- BOHNERT, M.; PFANNER, N.; VAN DER LAAN, M. A dynamic machinery for import of mitochondrial precursor proteins. **FEBS Lett**, 581, n. 15, p. 2802-2810, Jun 2007.
- BOOM, R.; SOL, C. J.; SALIMANS, M. M.; JANSEN, C. L. *et al.* Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **J Clin Microbiol**, 28, n. 3, p. 495-503, Mar 1990.
- BOYER, P. D.; CHANCE, B.; ERNSTER, L.; MITCHELL, P. *et al.* Oxidative phosphorylation and photophosphorylation. **Annu Rev Biochem**, 46, p. 955-966, 1977.
- BRAKHAGE, A. A.; LANGFELDER, K. Menacing mold: the molecular biology of *Aspergillus fumigatus*. **Annu Rev Microbiol**, 56, p. 433-455, 2002.
- BRIX, J.; DIETMEIER, K.; PFANNER, N. Differential recognition of preproteins by the purified cytosolic domains of the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22, and Tom70. **J Biol Chem**, 272, n. 33, p. 20730-20735, Aug 1997.
- BRIX, J.; RÜDIGER, S.; BUKAU, B.; SCHNEIDER-MERGENER, J. *et al.* Distribution of binding sequences for the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22, and Tom70 in a presequence-carrying preprotein and a non-cleavable preprotein. **J Biol Chem**, 274, n. 23, p. 16522-16530, Jun 1999.
- CALLEGARI, S.; CRUZ-ZARAGOZA, L. D.; REHLING, P. From TOM to the TIM23 complex - handing over of a precursor. **Biol Chem**, 401, n. 6-7, p. 709-721, 05 2020.

- CARNEIRO, P.; DUARTE, M.; VIDEIRA, A. The external alternative NAD(P)H dehydrogenase NDE3 is localized both in the mitochondria and in the cytoplasm of *Neurospora crassa*. **J Mol Biol**, 368, n. 4, p. 1114-1121, May 2007.
- CERVENY, L.; STRASKOVA, A.; DANKOVA, V.; HARTLOVA, A. *et al.* Tetratricopeptide repeat motifs in the world of bacterial pathogens: role in virulence mechanisms. **Infect Immun**, 81, n. 3, p. 629-635, Mar 2013.
- CHACINSKA, A.; KOEHLER, C. M.; MILENKOVIC, D.; LITHGOW, T. *et al.* Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. **Cell**, 138, n. 4, p. 628-644, Aug 21 2009.
- CHACINSKA, A.; LIND, M.; FRAZIER, A. E.; DUDEK, J. *et al.* Mitochondrial presequence translocase: switching between TOM tethering and motor recruitment involves Tim21 and Tim17. **Cell**, 120, n. 6, p. 817-829, Mar 2005.
- CHIRGWIN, J. M.; PRZYBYLA, A. E.; MACDONALD, R. J.; RUTTER, W. J. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. **Biochemistry**, 18, n. 24, p. 5294-5299, Nov 1979.
- CHOWDHARY, A.; KATHURIA, S.; XU, J.; MEIS, J. F. Emergence of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains due to agricultural azole use creates an increasing threat to human health. **PLoS Pathog**, 9, n. 10, p. e1003633, Oct 2013
- CONSORTIUM, U. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. **Nucleic Acids Res**, 49, n. D1, p. D480-D489, 01 2021.
- CREGG, J. M.; CEREGHINO, J. L.; SHI, J.; HIGGINS, D. R. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. **Mol Biotechnol**, 16, n. 1, p. 23-52, Sep 2000.
- D'ANDREA, L. D.; REGAN, L. TPR proteins: the versatile helix. **Trends Biochem Sci**, 28, n. 12, p. 655-662, Dec 2003
- DAGENAIS, T. R.; KELLER, N. P. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. **Clin Microbiol Rev**, 22, n. 3, p. 447-465, Jul 2009.
- DALY, R.; HEARN, M. T. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. **J Mol Recognit**, 18, n. 2, p. 119-138, 2005 Mar-Apr 2005.
- DENNING, D. W. Invasive aspergillosis. **Clin Infect Dis**, 26, n. 4, p. 781-803, Apr 1998.
- DOLGOVA, A. S.; STUKOLOVA, O. A. High-fidelity PCR enzyme with DNA-binding domain facilitates de novo gene synthesis. **3 Biotech**, 7, n. 2, p. 128, Jun 2017.
- ELLENRIEDER, L.; DIETERLE, M. P.; DOAN, K. N.; MÅRTENSSON, C. U. *et al.* Dual Role of Mitochondrial Porin in Metabolite Transport across the Outer Membrane and Protein Transfer to the Inner Membrane. **Mol Cell**, 73, n. 5, p. 1056-1065, Feb 2019.

EL MOUALIJ, B.; DUYCKAERTS, C.; LAMOTTE-BRASSEUR, J.; SLUSE, F. E. Phylogenetic classification of the mitochondrial carrier family of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, 13, n. 6, p. 573-581, May 1997.

ENDO, T.; YAMANO, K. Multiple pathways for mitochondrial protein traffic. **Biol Chem**, 390, n. 8, p. 723-730, Aug 2009.

FARMER, T.; NASLAVSKY, N.; CAPLAN, S. Tying trafficking to fusion and fission at the mighty mitochondria. **Traffic**, 19, n. 8, p. 569-577, Aug 2018.

FERRAMOSCA, A.; ZARA, V. Biogenesis of mitochondrial carrier proteins: molecular mechanisms of import into mitochondria. **Biochim Biophys Acta**, 1833, n. 3, p. 494-502, Mar 2013.

FIRON, A.; VILLALBA, F.; BEFFA, R.; D'ENFERT, C. Identification of essential genes in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus* by transposon mutagenesis. **Eukaryot Cell**, 2, n. 2, p. 247-255, Apr 2003.

GARCIA-RUBIO, R.; CUENCA-ESTRELLA, M.; MELLADO, E. Triazole Resistance in *Aspergillus* Species: An Emerging Problem. **Drugs**, 77, n. 6, p. 599-613, Apr 2017.

GARRIGUES, J. C.; CADET DE FONTENAY, G.; LINAS, M. D.; LAGENTE, M. *et al.* New in vitro assay based on glucose consumption for determining intraconazole and amphotericin B activities against *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrob Agents Chemother**, 38, n. 12, p. 2857-2862, Dec 1994.

GEBERT, M.; SCHREMPP, S. G.; MEHNERT, C. S.; HEIßWOLF, A. K. *et al.* Mgr2 promotes coupling of the mitochondrial presequence translocase to partner complexes. **J Cell Biol**, 197, n. 5, p. 595-604, May 2012.

GIETZ, D.; ST JEAN, A.; WOODS, R. A.; SCHIESTL, R. H. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. **Nucleic Acids Res**, 20, n. 6, p. 1425, Mar 1992.

GINIGER, E.; VARNUM, S. M.; PTASHNE, M. Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. **Cell**, 40, n. 4, p. 767-774, Apr 1985.

GLAB, N.; WISE, R. P.; PRING, D. R.; JACQ, C. *et al.* Expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a gene associated with cytoplasmic male sterility from maize: respiratory dysfunction and uncoupling of yeast mitochondria. **Mol Gen Genet**, 223, n. 1, p. 24-32, Aug 1990.

GLICK, B. R.; PASTERNAK, J. J.; PATTEN, C. L. Molecular biotechnology: principles and applications of recombinant DNA. **American Society for Microbiology**, Washington, 2010.

GOMES, A. R.; BYREGOWDA, S. M.; VEEREGOWDA, B. M.; BALAMURUGAN, V. An Overview of Heterologous Expression Host Systems for the Production of Recombinant Proteins. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, 4, n. 7, p. 346-356, 2016.

- GRAD, L. I.; DESCHENEAU, A. T.; NEUPERT, W.; LILL, R. *et al.* Inactivation of the *Neurospora crassa* mitochondrial outer membrane protein TOM70 by repeat-induced point mutation (RIP) causes defects in mitochondrial protein import and morphology. **Curr Genet**, 36, n. 3, p. 137-146, Sep 1999.
- GRAHL, N.; DINAMARCO, T. M.; WILLGER, S. D.; GOLDMAN, G. H. *et al.* *Aspergillus fumigatus* mitochondrial electron transport chain mediates oxidative stress homeostasis, hypoxia responses and fungal pathogenesis. **Mol Microbiol**, 84, n. 2, p. 383-399, Apr 2012.
- GUO, R.; ZONG, S.; WU, M.; GU, J. *et al.* Architecture of Human Mitochondrial Respiratory Megacomplex I. **Cell**, 170, n. 6, p. 1247-1257, Sep 2017.
- HABIB, S. J.; NEUPERT, W.; RAPAPORT, D. Analysis and prediction of mitochondrial targeting signals. **Methods Cell Biol**, 80, p. 761-781, 2007.
- HADJ-MOUSSA, H.; GREEN, S. R.; STOREY, K. B. The Living Dead: Mitochondria and Metabolic Arrest. **IUBMB Life**, 70, n. 12, p. 1260-1266, Dec 2018.
- HAINES, J. *Aspergillus* in compost: straw man or fatal flaw? **Biocycle**, v.36, n.4, p.32-35, 1995.
- HAGIWARA, D.; SAKAI, K.; SUZUKI, S.; UMEMURA, M. *et al.* Temperature during conidiation affects stress tolerance, pigmentation, and tryptacidin accumulation in the conidia of the airborne pathogen *Aspergillus fumigatus*. **PLoS One**, 12, n. 5, p. 1-20, 2017.
- HANAHAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **J Mol Biol**, 166, n. 4, p. 557-580, Jun 05 1983.
- HARKNESS, T. A.; NARGANG, F. E.; VAN DER KLEI, I.; NEUPERT, W. *et al.* A crucial role of the mitochondrial protein import receptor MOM19 for the biogenesis of mitochondria. **J Cell Biol**, 124, n. 5, p. 637-648, Mar 1994.
- HATEFI, Y. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. **Annu Rev Biochem**, 54, p. 1015-1069, 1985.
- HAUCKE, V.; HORST, M.; SCHATZ, G.; LITHGOW, T. The Mas20p and Mas70p subunits of the protein import receptor of yeast mitochondria interact via the tetratricopeptide repeat motif in Mas20p: evidence for a single hetero-oligomeric receptor. **EMBO J**, 15, n. 6, p. 1231-1237, Mar 15 1996.
- HELLEBERG, M.; STEENSEN, M.; ARENDRUP, M. C. Invasive aspergillosis in patients with severe COVID-19 pneumonia. **Clin Microbiol Infect**, 27, n. 1, p. 147-148, 01 2021.
- HINES, V.; BRANDT, A.; GRIFFITHS, G.; HORSTMANN, H. *et al.* Protein import into yeast mitochondria is accelerated by the outer membrane protein MAS70. **EMBO J**, 9, n. 10, p. 3191-3200, Oct 1990.
- HINNEN, A., BUXTON, F., CHAUDHURI, B., HEIM, J., HOTTIGER, T., MEYHACK, B. AND POHLIG, G. Gene expression in recombinant yeast. In: Smith, A. (Ed.), **Gene**

Expression in Recombinant Microorganisms. Marcel Dekker, New York, NY, p. 121-193, 1994.

HOGABOAM, C. M.; CARPENTER, K. J.; SCHUH, J. M.; BUCKLAND, K. F. *Aspergillus* and asthma--any link? **Med Mycol**, 43 Suppl 1, p. 197-202, May 2005.

HOHL, T. M.; FELDMESSER, M. *Aspergillus fumigatus*: principles of pathogenesis and host defense. **Eukaryot Cell**, 6, n. 11, p. 1953-1963, Nov 2007.

HOUTS, G. E.; MIYAGI, M.; ELLIS, C.; BEARD, D. *et al.* Reverse transcriptase from avian myeloblastosis virus. **J Virol**, 29, n. 2, p. 517-522, Feb 1979.

HUA, X.; LIU, W.; SU, Y.; LIU, X. *et al.* Studies on the novel pyridine sulfide containing SDH based heterocyclic amide fungicide. **Pest Manag Sci**, 76, n. 7, p. 2368-2378, Jul 2020.

HUANG, D.; LI, B.; CHU, H.; ZHANG, Z. *et al.* Endobronchial aspergilloma: A case report and literature review. **Exp Ther Med**, 14, n. 1, p. 547-554, Jul 2017.

ITO, J. I.; LYONS, J. M. Vaccination of corticosteroid immunosuppressed mice against invasive pulmonary aspergillosis. **J Infect Dis**, 186, n. 6, p. 869-871, Sep 2002.

IWAHASHI, J.; YAMAZAKI, S.; KOMIYA, T.; NOMURA, N. *et al.* Analysis of the functional domain of the rat liver mitochondrial import receptor Tom20. **J Biol Chem**, 272, n. 29, p. 18467-18472, Jul 18 1997.

JARMUSZKIEWICZ, W.; WOYDA-PLOSZCZYCA, A.; ANTOS-KRZEMINSKA, N.; SLUSE, F. E. Mitochondrial uncoupling proteins in unicellular eukaryotes. **Biochim Biophys Acta**, 1797, n. 6-7, p. 792-799, 2010 Jun-Jul 2010.

JEANVOINE, A.; ROCCHI, S.; BELLANGER, A. P.; REBOUX, G. *et al.* Azole-resistant *Aspergillus fumigatus*: A global phenomenon originating in the environment? **Med Mal Infect**, 50, n. 5, p. 389-395, Aug 2020.

JONCKHEERE, A. I.; SMEITINK, J. A.; RODENBURG, R. J. Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. **J Inherit Metab Dis**, 35, n. 2, p. 211-225, Mar 2012.

JORES, T.; KLINGER, A.; GROß, L. E.; KAWANO, S. *et al.* Characterization of the targeting signal in mitochondrial β -barrel proteins. **Nat Commun**, 7, p. 12036, 06 2016.

JOSEPH-HORNE, T.; HOLLOMON, D. W.; WOOD, P. M. Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. **Biochim Biophys Acta**, 1504, n. 2-3, p. 179-195, Apr 2001.

JUN, Y. W.; PARK, H.; LEE, Y. K.; KAANG, B. K. *et al.* D-AKAP1a is a signal-anchored protein in the mitochondrial outer membrane. **FEBS Lett**, 590, n. 7, p. 954-961, Apr 2016.

KANAJI, S.; IWAHASHI, J.; KIDA, Y.; SAKAGUCHI, M. *et al.* Characterization of the signal that directs Tom20 to the mitochondrial outer membrane. **J Cell Biol**, 151, n. 2, p. 277-288, Oct 16 2000.

- KERSCHER, S. J. Diversity and origin of alternative NADH:ubiquinone oxidoreductases. **Biochim Biophys Acta**, 1459, n. 2-3, p. 274-283, Aug 2000.
- KHACHO, M.; HARRIS, R.; SLACK, R. S. Mitochondria as central regulators of neural stem cell fate and cognitive function. **Nat Rev Neurosci**, 20, n. 1, p. 34-48, 01 2019.
- KIZHAKEDATHIL, M. P. J., KOPPULA, A. R., SUBATHRA, D. C. A brief review on invasive aspergillosis and the host immune response and the target drugs. **Immunol., Endocr. Metab. Agents Med. Chem.**, 17, n. 1, p. 4-14, 2017
- KOEHLER, C. M.; MERCHANT, S.; SCHATZ, G. How membrane proteins travel across the mitochondrial intermembrane space. **Trends Biochem Sci**, 24, n. 11, p. 428-432, Nov 1999.
- KOEHLER, P.; CORNELLY, O. A.; BÖTTIGER, B. W.; DUSSE, F. *et al.* COVID-19 associated pulmonary aspergillosis. **Mycoses**, 63, n. 6, p. 528-534, Jun 2020.
- KOEHLER, P.; TACKE, D.; CORNELLY, O. A. Aspergillosis of bones and joints - a review from 2002 until today. **Mycoses**, 57, n. 6, p. 323-335, Jun 2014.
- KOSMIDIS, C.; DENNING, D. W. Republished: The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. **Postgrad Med J**, 91, n. 1077, p. 403-410, Jul 2015.
- KOZAK, M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. **Cell**, 44, n. 2, p. 283-292, Jan 1986.
- KRADIN, R. L.; MARK, E. J. The pathology of pulmonary disorders due to *Aspergillus* spp. **Arch Pathol Lab Med**, 132, n. 4, p. 606-614, Apr 2008.
- KULAWIAK, B.; HÖPKER, J.; GEBERT, M.; GUIARD, B. *et al.* The mitochondrial protein import machinery has multiple connections to the respiratory chain. **Biochim Biophys Acta**, 1827, n. 5, p. 612-626, May 2013.
- KÜNKELE, K. P.; HEINS, S.; DEMBOWSKI, M.; NARGANG, F. E. *et al.* The preprotein translocation channel of the outer membrane of mitochondria. **Cell**, 93, n. 6, p. 1009-1019, Jun 1998.
- KWON-CHUNG, K. J.; SUGUI, J. A. *Aspergillus fumigatus*--what makes the species a ubiquitous human fungal pathogen? **PLoS Pathog**, 9, n. 12, p. 1-4, 2013.
- LAMB, J. R.; TUGENDREICH, S.; HIETER, P. Tetratricopeptide repeat interactions: to TPR or not to TPR? **Trends Biochem Sci**, 20, n. 7, p. 257-259, Jul 1995.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227, n. 5259, p. 680-685, Aug 1970.
- LAMOTH, F. *Aspergillus fumigatus*-Related Species in Clinical Practice. **Front Microbiol**, 7, p. 683, 2016.
- LATGÉ, J. P. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. **Clin Microbiol Rev**, 12, n. 2, p. 310-350, Apr 1999.

LATGÉ, J. P.; CALDERONE, R. Host-microbe interactions: fungi invasive human fungal opportunistic infections. **Curr Opin Microbiol**, 5, n. 4, p. 355-358, Aug 2002.

LATGÉ, J. P.; CHAMILOS, G. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis in 2019. **Clin Microbiol Rev**, 33, n. 1, p. 1-75, Dec 2019.

LEE, J. H.; PARK, A.; OH, K. J.; LEE, S. C. *et al.* The Role of Adipose Tissue Mitochondria: Regulation of Mitochondrial Function for the Treatment of Metabolic Diseases. **Int J Mol Sci**, 20, n. 19, Oct 04 2019.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Oxidative phosphorylation and photophosphorylation. In: **Principles of Biochemistry**. New York, Worth Publishers, Inc., p. 542-597, 1993.

LEMIRE, B. D.; OYEDOTUN, K. S. The *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial succinate:ubiquinone oxidoreductase. **Biochim Biophys Acta**, 1553, n. 1-2, p. 102-116, Jan 17 2002.

LICATALOSI, D. D.; DARNELL, R. B. RNA processing and its regulation: global insights into biological networks. **Nat Rev Genet**, 11, n. 1, p. 75-87, Jan 2010.

LIN, S. S.; KERSCHER, S.; SALEH, A.; BRANDT, U. *et al.* The *Toxoplasma gondii* type-II NADH dehydrogenase TgNDH2-I is inhibited by 1-hydroxy-2-alkyl-4(1H)quinolones. **Biochim Biophys Acta**, 1777, n. 11, p. 1455-1462, Nov 2008.

LINDNER, P.; BAUER, K.; KREBBER, A.; NIEBA, L. *et al.* Specific detection of his-tagged proteins with recombinant anti-His tag scFv-phosphatase or scFv-phage fusions. **Biotechniques**, 22, n. 1, p. 140-149, Jan 1997.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, 25, n. 4, p. 402-408, Dec 2001.

LU, S.; WANG, J.; CHITSAZ, F.; DERBYSHIRE, M. K. *et al.* CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020. **Nucleic Acids Res**, 48, n. D1, p. D265-D268, 01 2020.

LUÉVANO-MARTÍNEZ, L. A.; CALDEIRA DA SILVA, C. C.; NICASTRO, G. G.; SCHUMACHER, R. I. *et al.* Mitochondrial alternative oxidase is determinant for growth and sporulation in the early diverging fungus *Blastocladiella emersonii*. **Fungal Biol**, 123, n. 1, p. 59-65, 01 2019.

MAGNANI, T.; SORIANI, F. M.; MARTINS, V. E. P.; POLICARPO, A. C. *et al.* Silencing of mitochondrial alternative oxidase gene of *Aspergillus fumigatus* enhances reactive oxygen species production and killing of the fungus by macrophages. **J Bioenerg Biomembr**, 40, n. 6, p. 631-636, Dec 2008.

MALAVAZI, I. & GOLDMAN, G.H. Gene disruption in *Aspergillus fumigatus* using a PCR-based strategy and in vivo recombination in yeast. **Methods in Molecular Biology**, 845, p. 99-118, 2012.

- MALINA, C.; LARSSON, C.; NIELSEN, J. Yeast mitochondria: an overview of mitochondrial biology and the potential of mitochondrial systems biology. **FEMS Yeast Res**, 18, n. 5, 08 2018.
- MALYS, N.; WISHART, J. A.; OLIVER, S. G.; MCCARTHY, J. E. Protein production in *Saccharomyces cerevisiae* for systems biology studies. **Methods Enzymol**, 500, p. 197-212, 2011.
- MANN, M.; JENSEN, O. N. Proteomic analysis of post-translational modifications. **Nat Biotechnol**, 21, n. 3, p. 255-261, Mar 2003.
- MARGULIS, L. On the Origin of Mitosing Cells. **Journal of Theoretical Biology**, v. 14, p. 225-274, 1967.
- MARKO, M. A.; CHIPPERFIELD, R.; BIRNBOIM, H. C. A procedure for the large-scale isolation of highly purified plasmid DNA using alkaline extraction and binding to glass powder. **Anal Biochem**, 121, n. 2, p. 382-387, Apr 1982.
- MARTIN, J.; MAHLKE, K.; PFANNER, N. Role of an energized inner membrane in mitochondrial protein import. Delta psi drives the movement of presequences. **J Biol Chem**, 266, n. 27, p. 18051-18057, Sep 1991.
- MARTINS, V. E. P.; DINAMARCO, T. M.; CURTI, C.; UYEMURA, S. A. Classical and alternative components of the mitochondrial respiratory chain in pathogenic fungi as potential therapeutic targets. **J Bioenerg Biomembr**, 43, n. 1, p. 81-88, Feb 2011-a.
- MARTINS, V. P.; DINAMARCO, T. M.; SORIANI, F. M.; TUDELLA, V. G. *et al.* Involvement of an alternative oxidase in oxidative stress and mycelium-to-yeast differentiation in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Eukaryot Cell**, 10, n. 2, p. 237-248, Feb 2011-b.
- MATTANOVICH, D.; BRANDUARDI, P.; DATO, L.; GASSER, B. *et al.* Recombinant protein production in yeasts. **Methods Mol Biol**, 824, p. 329-358, 2012.
- MAYER, A.; NARGANG, F. E.; NEUPERT, W.; LILL, R. MOM22 is a receptor for mitochondrial targeting sequences and cooperates with MOM19. **EMBO J**, 14, n. 17, p. 4204-4211, Sep 1995.
- MAYR, A.; LASS-FLÖRL, C. Epidemiology and antifungal resistance in invasive Aspergillosis according to primary disease: review of the literature. **Eur J Med Res**, 16, n. 4, p. 153-157, Apr 2011.
- MCBRIDE, H. M.; MILLAR, D. G.; LI, J. M.; SHORE, G. C. A signal-anchor sequence selective for the mitochondrial outer membrane. **J Cell Biol**, 119, n. 6, p. 1451-1457, Dec 1992.
- MCCORMICK, A.; LOEFFLER, J.; EBEL, F. *Aspergillus fumigatus*: contours of an opportunistic human pathogen. **Cell Microbiol**, 12, n. 11, p. 1535-1543, Nov 2010.

MEYER, A.; LAVERNY, G.; BERNARDI, L.; CHARLES, A. L. *et al.* Mitochondria: An Organelle of Bacterial Origin Controlling Inflammation. **Front Immunol**, 9, p. 536, 2018.

MEYER, V.; WU, B.; RAM, A. F. Aspergillus as a multi-purpose cell factory: current status and perspectives. **Biotechnol Lett**, 33, n. 3, p. 469-476, Mar 2011.

MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. **Nature**, 191, p. 144-148, Jul 1961.

MOCZKO, M.; EHMANN, B.; GÄRTNER, F.; HÖNLINGER, A. *et al.* Deletion of the receptor MOM19 strongly impairs import of cleavable preproteins into *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. **J Biol Chem**, 269, n. 12, p. 9045-9051, Mar 1994.

MOORE, S. Pancreatic DNase, in: The Enzymes. **Academic Press**: Boyer, P., New York, p. 281, 1981.

MORETTI-ALMEIDA, G.; NETTO, L. E.; MONTEIRO, G. The essential gene YMR134W from *Saccharomyces cerevisiae* is important for appropriate mitochondrial iron utilization and the ergosterol biosynthetic pathway. **FEBS Lett**, 587, n. 18, p. 3008-3013, Sep 17 2013.

MORROW, R. M.; PICARD, M.; DERBENEVA, O.; LEIPZIG, J. *et al.* Mitochondrial energy deficiency leads to hyperproliferation of skeletal muscle mitochondria and enhanced insulin sensitivity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 114, n. 10, p. 2705-2710, 03 07 2017.

MUTO, T.; OBITA, T.; ABE, Y.; SHODAI, T. *et al.* NMR identification of the Tom20 binding segment in mitochondrial presequences. **J Mol Biol**, 306, n. 2, p. 137-143, Feb 2001.

NEUPERT, W. A perspective on transport of proteins into mitochondria: a myriad of open questions. **J Mol Biol**, 427, n. 6 Pt A, p. 1135-1158, Mar 27 2015.

NUGENT, T.; JONES, D. T. Transmembrane protein topology prediction using support vector machines. **BMC Bioinformatics**, 10, p. 159, May 26 2009.

PALMIERI, F.; PIERRI, C. L. Structure and function of mitochondrial carriers - role of the transmembrane helix P and G residues in the gating and transport mechanism. **FEBS Lett**, 584, n. 9, p. 1931-1939, May 2010.

PETRUSSA, E.; BRAIDOT, E.; NAGY, G.; VIANELLO, A. *et al.* Electrical potential dissipation induced by free fatty acids in pea stem mitochondria. **FEBS Lett**, 307, n. 3, p. 267-271, Aug 1992.

PFANNER, N. Mitochondrial import: crossing the aqueous intermembrane space. **Curr Biol**, 8, n. 8, p. R262-265, Apr 1998.

QUAN, J.; TIAN, J. Circular polymerase extension cloning for high-throughput cloning of complex and combinatorial DNA libraries. **Nat Protoc**, 6, n. 2, p. 242-251, Feb 2011.

RAMAGE, L.; JUNNE, T.; HAHNE, K.; LITHGOW, T. *et al.* Functional cooperation of mitochondrial protein import receptors in yeast. **EMBO J**, 12, n. 11, p. 4115-4123, Nov 1993.

- RAO, S.; SCHMIDT, O.; HARBAUER, A. B.; SCHÖNFISCH, B. *et al.* Biogenesis of the preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane: protein kinase A phosphorylates the precursor of Tom40 and impairs its import. **Mol Biol Cell**, 23, n. 9, p. 1618-1627, May 2012.
- RAPAPORT, D. Finding the right organelle. Targeting signals in mitochondrial outer-membrane proteins. **EMBO Rep**, 4, n. 10, p. 948-952, Oct 2003.
- RASSOW, J.; DEKKER, P. J.; VAN WILPE, S.; MEIJER, M. *et al.* The preprotein translocase of the mitochondrial inner membrane: function and evolution. **J Mol Biol**, 286, n. 1, p. 105-120, Feb 1999.
- REDDY, A. S. Alternative splicing of pre-messenger RNAs in plants in the genomic era. **Annu Rev Plant Biol**, 58, p. 267-294, 2007.
- REICHERT-LIMA, F.; LYRA, L.; PONTES, L.; MORETTI, M. L. *et al.* Surveillance for azoles resistance in *Aspergillus* spp. highlights a high number of amphotericin B-resistant isolates. **Mycoses**, 61, n. 6, p. 360-365, Jun 2018.
- RIMMER, K. A.; FOO, J. H.; NG, A.; PETRIE, E. J. *et al.* Recognition of mitochondrial targeting sequences by the import receptors Tom20 and Tom22. **J Mol Biol**, 405, n. 3, p. 804-818, Jan 21 2011.
- ROCCHI, S.; REBOUX, G.; MILLON, L. [Azole resistance with environmental origin: What alternatives for the future?]. **J Mycol Med**, 25, n. 4, p. 249-256, Dec 2015.
- ROGOV, A. G.; ZVYAGILSKAYA, R. A. Physiological role of alternative oxidase (from yeasts to plants). **Biochemistry (Mosc)**, 80, n. 4, p. 400-407, Apr 2015.
- ROSENFELD, E.; BEAUVOIT, B. Role of the non-respiratory pathways in the utilization of molecular oxygen by *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, 20, n. 13, p. 1115-1144, Oct 2003.
- RUF, D.; BRANTL, V.; WAGENER, J. Mitochondrial Fragmentation in. **Front Cell Infect Microbiol**, 8, p. 128, 2018.
- RUNKEL, E. D.; BAUMEISTER, R.; SCHULZE, E. Mitochondrial stress: balancing friend and foe. **Exp Gerontol**, 56, p. 194-201, Aug 2014.
- SAIKI, R.K. *et al.* Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v.230, p.1350-1354, 1985.
- SAMBROOK, J. *et al.* Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd Edition. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York, 1989.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chains-terminating inhibitors. **Proceedings National Academic Sciences USA**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.
- SEGAL, B. H. Aspergillosis. **N Engl J Med**, 360, n. 18, p. 1870-1884, Apr 2009.

SEGAL, B. H.; WALSH, T. J. Current approaches to diagnosis and treatment of invasive aspergillosis. **Am J Respir Crit Care Med**, 173, n. 7, p. 707-717, Apr 2006.

SHAUKAT, A.; BAKRI, F.; YOUNG, P.; HAHN, T. *et al.* Invasive filamentous fungal infections in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients after recovery from neutropenia: clinical, radiologic, and pathologic characteristics. **Mycopathologia**, 159, n. 2, p. 181-188, Feb 2005.

SHEDLOVSKIY, D.; SHCHERBIK, N.; PESTOV, D. G. One-step hot formamide extraction of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. **RNA Biol**, 14, n. 12, p. 1722-1726, 12 02 2017.

SHIOTA, T.; IMAI, K.; QIU, J.; HEWITT, V. L. *et al.* Molecular architecture of the active mitochondrial protein gate. **Science**, 349, n. 6255, p. 1544-1548, Sep 2015.

SHORE, G. C.; MCBRIDE, H. M.; MILLAR, D. G.; STEENAART, N. A. *et al.* Import and insertion of proteins into the mitochondrial outer membrane. **Eur J Biochem**, 227, n. 1-2, p. 9-18, Jan 15 1995.

SMALL, W. C.; MCALISTER-HENN, L. Identification of a cytosolically directed NADH dehydrogenase in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. **J Bacteriol**, 180, n. 16, p. 4051-4055, Aug 1998.

SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Anal Biochem**, 150, n. 1, p. 76-85, Oct 1985.

SMITH, V.; BOTSTEIN, D.; BROWN, P. O. Genetic footprinting: a genomic strategy for determining a gene's function given its sequence. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 92, n. 14, p. 6479-6483, Jul 1995.

SOUTHERN, J. A.; YOUNG, D. F.; HEANEY, F.; BAUMGÄRTNER, W. K. *et al.* Identification of an epitope on the P and V proteins of simian virus 5 that distinguishes between two isolates with different biological characteristics. **J Gen Virol**, 72 (Pt 7), p. 1551-1557, Jul 1991.

SÖLLNER, T.; GRIFFITHS, G.; PFALLER, R.; PFANNER, N. *et al.* MOM19, an import receptor for mitochondrial precursor proteins. **Cell**, 59, n. 6, p. 1061-1070, Dec 1989.

SUGUI, J. A.; KWON-CHUNG, K. J.; JUVVADI, P. R.; LATGÉ, J. P. *et al.* *Aspergillus fumigatus* and related species. **Cold Spring Harb Perspect Med**, 5, n. 2, p. 1-17, Nov 2014.

TAUBITZ, A.; BAUER, B.; HEESEMANN, J.; EBEL, F. Role of respiration in the germination process of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. **Curr Microbiol**, 54, n. 5, p. 354-360, May 2007.

TEKAIA, F.; LATGÉ, J. P. *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen? **Curr Opin Microbiol**, 8, n. 4, p. 385-392, Aug 2005.

TISSOT, F.; AGRAWAL, S.; PAGANO, L.; PETRIKKOS, G. *et al.* ECIL-6 guidelines for the treatment of invasive candidiasis, aspergillosis and mucormycosis in leukemia and hematopoietic stem cell transplant patients. **Haematologica**, 102, n. 3, p. 433-444, 03 2017.

TOMEI, J. F.; VAN DER WERF, T. S. Pulmonary aspergillosis. **Neth J Med**, 59, n. 5, p. 244-258, Nov 2001

TONIN, F. S.; STEIMBACH, L. M.; BORBA, H. H.; SANCHES, A. C. *et al.* Efficacy and safety of amphotericin B formulations: a network meta-analysis and a multicriteria decision analysis. **J Pharm Pharmacol**, 69, n. 12, p. 1672-1683, Dec 2017.

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 76, n. 9, p. 4350-4354, Sep 1979.

TRACY, M. C.; OKORIE, C. U. A.; FOLEY, E. A.; MOSS, R. B. Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis. **J Fungi (Basel)**, 2, n. 2, Jun 2016.

TUDELLA, V. G.; CURTI, C.; SORIANI, F. M.; SANTOS, A. C. *et al.* In situ evidence of an alternative oxidase and an uncoupling protein in the respiratory chain of *Aspergillus fumigatus*. **Int J Biochem Cell Biol**, 36, n. 1, p. 162-172, Jan 2004.

VAN DE VEERDONK, F. L.; GRESNIGT, M. S.; ROMANI, L.; NETEA, M. G. *et al.* *Aspergillus fumigatus* morphology and dynamic host interactions. **Nat Rev Microbiol**, 15, n. 11, p. 661-674, Nov 2017.

VERCESI, A. E.; CASTILHO, R. F.; KOWALTOWSKI, A. J.; DE OLIVEIRA, H. C. F. *et al.* Mitochondrial calcium transport and the redox nature of the calcium-induced membrane permeability transition. **Free Radic Biol Med**, 129, p. 1-24, Dec 2018.

VERNOCHET, C.; DAMILANO, F.; MOURIER, A.; BEZY, O. *et al.* Adipose tissue mitochondrial dysfunction triggers a lipodystrophic syndrome with insulin resistance, hepatosteatosis, and cardiovascular complications. **FASEB J**, 28, n. 10, p. 4408-4419, Oct 2014.

VERWEIJ, P. E.; ANANDA-RAJAH, M.; ANDES, D.; ARENDRUP, M. C. *et al.* International expert opinion on the management of infection caused by azole-resistant *Aspergillus fumigatus*. **Drug Resist Updat**, 21-22, p. 30-40, 2015 Jul-Aug 2015.

VERWEIJ, P. E.; CHOWDHARY, A.; MELCHERS, W. J.; MEIS, J. F. Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*: Can We Retain the Clinical Use of Mold-Active Antifungal Azoles? **Clin Infect Dis**, 62, n. 3, p. 362-368, Feb 2016

VISSER, H.; JOOSTEN, V.; PUNT, P.J.; GUSAKOV, A.V. *et al.* Development of a mature fungal technology and production platform for industrial enzymes based on a *Myceliophthora thermophila* isolate, previously known as *Chrysosporium lucknowense* C1. **Indust. Biotechnol**, 7, p. 214-223, Jul 2011.

VIVEK-ANANTH, R. P.; MOHANRAJ, K.; VANDANASHREE, M.; JHINGRAN, A. *et al.* Comparative systems analysis of the secretome of the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species. **Sci Rep**, 8, n. 1, p. 6617, 04 2018.

VIZIOLI, M. G.; LIU, T.; MILLER, K. N.; ROBERTSON, N. A. *et al.* Mitochondria-to-nucleus retrograde signaling drives formation of cytoplasmic chromatin and inflammation in senescence. **Genes Dev**, 34, n. 5-6, p. 428-445, 03 01 2020.

VOGELSTEIN, B.; GILLESPIE, D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 76, n. 2, p. 615-619, Feb 1979.

VÖGTLE, F. N.; WORTELKAMP, S.; ZAHEDI, R. P.; BECKER, D. *et al.* Global analysis of the mitochondrial N-proteome identifies a processing peptidase critical for protein stability. **Cell**, 139, n. 2, p. 428-439, Oct 2009.

WAIZENEGGER, T.; STAN, T.; NEUPERT, W.; RAPAPORT, D. Signal-anchor domains of proteins of the outer membrane of mitochondria: structural and functional characteristics. **J Biol Chem**, 278, n. 43, p. 42064-42071, Oct 24 2003.

WALTHER, D. M.; RAPAPORT, D. Biogenesis of mitochondrial outer membrane proteins. **Biochim Biophys Acta**, 1793, n. 1, p. 42-51, Jan 2009.

WASYLNKA, J. A.; SIMMER, M. I.; MOORE, M. M. Differences in sialic acid density in pathogenic and non-pathogenic *Aspergillus* species. **Microbiology (Reading)**, 147, n. Pt 4, p. 869-877, Apr 2001.

WAYNE ALBERS, R. **Cell Membrane Structures and Functions. In: BRADY, S. (Ed.). Basic Neurochemistry: Principles of Molecular, Cellular, and Medical Neurobiology**. 8 ed. Academic Press, 2012. cap. 2, p. 26-39.

WESTERMANN, B. Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission. **Biochim Biophys Acta**, 1817, n. 10, p. 1833-1838, Oct 2012.

WIEDEMANN, N.; PFANNER, N. Mitochondrial Machineries for Protein Import and Assembly. **Annu Rev Biochem**, 86, p. 685-714, Jun 2017.

YAMAMOTO, H.; ITOH, N.; KAWANO, S.; YATSUKAWA, Y. *et al.* Dual role of the receptor Tom20 in specificity and efficiency of protein import into mitochondria. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 108, n. 1, p. 91-96, Jan 2011.

YAMANO, K.; YATSUKAWA, Y.; ESAKI, M.; HOBBS, A. E. *et al.* Tom20 and Tom22 share the common signal recognition pathway in mitochondrial protein import. **J Biol Chem**, 283, n. 7, p. 3799-3807, Feb 2008.

ZANOTTI, A.; AZZONE, G. F. Safranin as membrane potential probe in rat liver mitochondria. **Arch Biochem Biophys**, 201, n. 1, p. 255-265, Apr 1980.

ZHANG, J.; VAN DEN HEUVEL, J.; DEBETS, A. J. M.; VERWEIJ, P. E. *et al.* Evolution of cross-resistance to medical triazoles in. **Proc Biol Sci**, 284, n. 1863, Sep 2017.

ZHANG, Z.; REN, Q. Why are essential genes essential? - The essentiality of. **Microb Cell**, 2, n. 8, p. 280-287, Jul 25 2015.

ZHAO, R. Z.; JIANG, S.; ZHANG, L.; YU, Z. B. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). **Int J Mol Med**, 44, n. 1, p. 3-15, Jul 2019.

9. APÊNDICES

9.1 Meios de Cultivo

9.1.1 YPD

Peptona (LP37 – <i>Oxoid</i>)	2,0% (p/v)
Extrato de levedura (212750 – <i>BD</i>)	1,0% (p/v)
Glicose (G8270 - <i>Sigma-Aldrich</i>)	2,0% (v/v)

As substâncias que compõem o meio, exceto a glicose, foram dissolvidas em água destilada. O meio foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 kgf/cm² por 20 minutos. Para o meio sólido (YPD) foi acrescentado Ágar 2,0% (p/v) antes da autoclavagem. Para o uso, foi adicionado uma solução estoque de glicose 20% (p/v) previamente esterilizada.

9.1.2 YUU

Glicose (G8270 - <i>Sigma-Aldrich</i>)	2,0% (p/v)
Extrato de levedura (212750 – <i>BD</i>)	0,5% (p/v)
Solução de elementos traços	0,1% (p/v)
Uracila (94220 – <i>Fluka</i>)	1,2 g/L
Uridina (U3750 - <i>Sigma-Aldrich</i>)	1,2 g/L

As substâncias que compõem o meio, foram dissolvidas em água destilada. O meio foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 kgf/cm² por 20 minutos. Para o meio sólido (YUU) foi acrescentado Ágar 1,8% (p/v) antes da autoclavagem.

9.1.3 LB (Lúria Bertani)

Triptona (LP0042 – <i>Oxoid</i>)	1,0% (p/v)
Extrato de levedura (212750 – <i>BD</i>)	0,5% (p/v)
NaCl (31434 - <i>Sigma-Aldrich</i>)	1,0% (p/v)

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

9.1.4 SOC

Triptona (LP0042 – <i>Oxoid</i>)	2,0% (p/v)
Extrato de levedura (212750 – <i>BD</i>)	0,5 % (p/v)
NaCl (31434 - <i>Sigma-Aldrich</i>)	10,0 mmol/L
KCl (P4504- <i>Sigma-Aldrich</i>)	2,0 mmol/L
MgCl ₂ (105833 – <i>Merck</i>)	10,0 mmol/L
Glicose (G8270 - <i>Sigma-Aldrich</i>)	20,0 mmol/L

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

9.1.5 TB (Terrific Broth)

Extrato de levedura (212750 – <i>BD</i>)	2,4% (p/v)
Triptona (LP0042 – <i>Oxoid</i>)	1,2% (p/v)
Glicerol (G7893 - <i>Sigma-Aldrich</i>)	0,4% (p/v)
KH_2PO_4 (P0662 - <i>Sigma-Aldrich</i>)	17,0 mmol/L
K_2HPO_4 (P3786 - <i>Sigma-Aldrich</i>)	72,0 mmol/L

As substâncias que compõem o meio foram dissolvidas em água destilada. O meio foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 kgf/cm² por 20 minutos. Após o resfriamento, foi adicionado ao meio uma solução estéril de KH_2PO_4 0,17M/ K_2HPO_4 0,72M previamente esterilizada.

9.1.6 SC-URA

Base de Nitrogênio para levedura (291940 – <i>BD</i>)	0,67% (p/v)
Fonte de carbono: Rafinose; Galactose ou Glicose (R0250; G0625; G8270 - <i>Sigma-Aldrich</i> , respectivamente)	2,0% (p/v)
Arginina (A5006 - <i>Sigma-Aldrich</i>)	0,01% (p/v)
Adenina (A8626 - <i>Sigma-Aldrich</i>)	0,01% (p/v)
Cisteína (W326305- <i>Sigma-Aldrich</i>)	0,01% (p/v)
Leucina (L8000 - <i>Sigma-Aldrich</i>)	0,01% (p/v)
Lisina (L5626 - <i>Sigma-Aldrich</i>)	0,01% (p/v)
Treonina (T8625 - <i>Sigma-Aldrich</i>)	0,01% (p/v)

Triptofano (T0254 - <i>Sigma-Aldrich</i>)	0,01% (p/v)
Ácido aspártico (A9256 - <i>Sigma-Aldrich</i>)	0,005% (p/v)
Histidina (H8000 - <i>Sigma-Aldrich</i>)	0,005% (p/v)
Isoleucina (I2752 - <i>Sigma-Aldrich</i>)	0,005% (p/v)
Metionina (M9625 - <i>Sigma-Aldrich</i>)	0,005% (p/v)
Prolina (P0380 - <i>Sigma-Aldrich</i>)	0,005% (p/v)
Fenilalanina (P2126 - <i>Sigma-Aldrich</i>)	0,005% (p/v)
Serina (S-4500 - <i>Sigma-Aldrich</i>)	0,005% (p/v)
Tirosina (8934353 - <i>Merck</i>)	0,005% (p/v)
Valina (V0500 - <i>Sigma-Aldrich</i>)	0,005% (p/v)

O meio SC é definido como um meio de cultura mínimo para leveduras. As substâncias que compõem o meio foram dissolvidas em água deionizada. O meio foi esterilizado por calor úmido em a 120°C e 1 kgf/cm² por 20 minutos. Após resfriado, foi adicionada a fonte de carbono desejada a partir de uma solução estoque estéril. O meio SC-URA⁻ tem a base nitrogenada uracila omitida. Para o meio sólido (SC) foi acrescentado Ágar 2,0% (p/v) antes da autoclavagem.

9.2 Soluções, tampões e reagentes

9.2.1 Tampão salina fosfato (PBS)

NaCl (31434 - <i>Sigma-Aldrich</i>)	0,14 mol/L
KCl (P4504- <i>Sigma-Aldrich</i>)	2,7 mmol/L
Na ₂ HPO ₄ (S0876 - <i>Sigma-Aldrich</i>)	8,1 mmol/L
KH ₂ PO ₄ (P0662 - <i>Sigma-Aldrich</i>)	1,5 mmol/L

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

9.2.2 Tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE)

EDTA (E5134 - <i>Sigma-Aldrich</i>)	10,0 mmol/L
Tris-acetato pH 8,0	40,0 mmol/L

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

9.2.3 Tampão Tris-EDTA (TE)

Tris (T6066 - <i>Merck</i>)	10,0 mmol/L
EDTA (E5134 - <i>Sigma-Aldrich</i>)	1,0 mmol/L

As substâncias que compõem o tampão foram dissolvidas em água deionizada e o pH foi ajustado para 8,5. Em seguida o tampão foi esterilizado por calor úmido em autoclave a 120°C e 1 kgf/cm² por 20 minutos.

9.2.4 Tampão TE/LiAc

Tris (T6066 – Merck)	10,0 mmol/L
EDTA (E5134 - Sigma-Aldrich)	1,0 mmol/L
Acetato de Litio (L4158 - Sigma-Aldrich)	100,0 mmol/L

As substâncias que compõem o tampão foram dissolvidas em água deionizada e o pH foi ajustado para 8,5.

9.2.5 Tampão de extração de DNA para *S. cerevisiae*

Tris-HCl (T6066 - Merck) pH 8,5	200,0 mmol/L
NaCl(31434 - Sigma-Aldrich)	250,0 mmol/L
EDTA (E5134 - Sigma-Aldrich)	25,0 mmol/L
SDS (L4509 - Sigma-Aldrich)	0,5% (p/v)

As substâncias que compõem o tampão foram dissolvidas em água deionizada.

9.2.6 Breaking buffer

Fosfato de sódio (106578- Merck) pH 7,4	50,0 mmol/L
EDTA (E5134 - Sigma-Aldrich)	1,0 mmol/L
Glicerol (G7893 - Sigma-Aldrich)	5% (v/v)
PMSF (P7626 - Sigma-Aldrich)	1,0 mmol/L

9.2.7 Tampão de amostra para SDS-PAGE 5x

Tris-HCl (T6066 - Merck) pH 6,8	0,3 mol/L
Glicerol (G7893 - Sigma-Aldrich)	50,0% (v/v)
SDS (L4509 - Sigma-Aldrich)	10,0% (p/v)
Azul de bromofenol (B5525 - Sigma-Aldrich)	0,05% (p/v)
β -mercaptoetanol (M3148 - Sigma-Aldrich)	25,0% (v/v)

9.2.8 Tampão de corrida Tris-Glicina pH 8,3

Tris-HCl (T6066 - Merck) pH 8,3	25,0 mmol/L
Glicina (G8898 - Sigma-Aldrich)	250,0 mmol/L
SDS (L4509 - Sigma-Aldrich)	0,05% (p/v)

9.2.9 Tampão de Transferência

Bicarbonato de Sódio (S6014 - Sigma-Aldrich)	0,840g
Carbonato de Sódio (07047 - Grupo Química)	0,318g
H ₂ O	1000 mL

9.2.10 Tampão salina Tris com Tween 20 (TBS-T)

Tris-HCl (T6066 - Merck) pH 7,6	0,02 mol/L
NaCl (31434 - Sigma-Aldrich)	140,0 mmol/L
Tween 20 (P1379- Sigma-Aldrich)	0,1% (v/v)

9.2.11 Tampão salina Tris (TBS)

Tris-HCl (T6066 – Merck) pH 7,6	0,02 mol/L
NaCl (31434 - Sigma-Aldrich)	140,0 mmol/L

9.2.12 ECL (Enhanced chemiluminescence)

Tris-glicina pH 8,5	0,10 mol/L
Ácido p-cumárico (C9008 - Sigma-Aldrich)	0,22 mmol/L
Luminol (A4685 - Sigma-Aldrich)	1,25 mmol/L

As substâncias que compõem o ECL foram diluídas em água MilliQ.

9.2.13 Tampão de pré-incubação para esferoplastos de *S. cerevisiae*

2-βmercaptoetanol (M3148 - Sigma-Aldrich)	100,0 mmol/L
Tris-HCl (T6066 – Merck) pH 8,5	10,0 mmol/L

As substâncias que compõem o tampão foram dissolvidas em água deionizada e o pH foi ajustado para 8,5.

9.2.14 Tampão de digestão para esferoplastos de *S. cerevisiae*

Sorbitol (S1876 - Sigma-Aldrich)	1,3 mol/L
EDTA (E5134 - Sigma-Aldrich)	0,5 mmol/L
BSA (A6003 – Sigma-Aldrich)	0,2% (p/v)
Imidazol (I0125 - Sigma-Aldrich)	10,0 mmol/L

As substâncias que compõem o tampão foram dissolvidas em água deionizada e o pH foi ajustado para 6,4.

9.2.15 Tampão de lise para esferoplastos de *S. cerevisiae*

Sorbitol (S1876 - <i>Sigma-Aldrich</i>)	0,3 mol/L
EGTA (4378 - <i>Sigma-Aldrich</i>)	0,5 mmol/L
BSA (A6003 - <i>Sigma-Aldrich</i>)	0,2% (p/v)
HEPES (H3375 - <i>Sigma-Aldrich</i>)	10,0 mmol/L

As substâncias que compõem o tampão foram dissolvidas em água deionizada e o pH foi ajustado para 7,2.

9.2.16 Tampão de ressuspensão para mitocôndrias de *S. cerevisiae*

Sacarose (S0389 - <i>Sigma-Aldrich</i>)	125,0 mmol/L
HEPES (H3375 - <i>Sigma-Aldrich</i>)	10,0 mmol/L
KCl (P4504- <i>Sigma-Aldrich</i>)	5,0 mmol/L

As substâncias que compõem o tampão foram dissolvidas em água deionizada e o pH foi ajustado para 7,2.

9.2.17 Solução FAE

EDTA (E5134 - <i>Sigma-Aldrich</i>)	10,0 mmol/L
Formamida (15615 - <i>Life Technologies</i>)	98%(v/v)

9.2.18 Tampão de ressuspensão para esferoplastos

Sacarose (S0389 - <i>Sigma-Aldrich</i>)	125,0 mmol/L
KCl (P4504- <i>Sigma-Aldrich</i>)	75,0 mmol/L
EGTA (4378 - <i>Sigma-Aldrich</i>)	0,5 mmol/L
KH ₂ PO ₄ (P0662 - <i>Sigma-Aldrich</i>)	5,0 mmol/L
HEPES (H3375 - <i>Sigma-Aldrich</i>)	10,0 mmol/L

As substâncias que compõem o tampão foram dissolvidas em água deionizada e o pH foi

ajustado para 7,2.

9.2.19 Tampão de titulação sem íons potássio

Sacarose (S0389 - <i>Sigma-Aldrich</i>)	700,0 mmol/L
EGTA (4378 - <i>Sigma-Aldrich</i>)	0,5 mmol/L
NaH ₂ PO ₄ (S0751 - <i>Sigma-Aldrich</i>)	5,0 mmol/L
HEPES (H3375 - <i>Sigma-Aldrich</i>)	10,0 mmol/L

As substâncias que compõem o tampão foram dissolvidas em água deionizada e o pH foi ajustado para 7,2.

10. ANEXOS

10.1 Anexo A

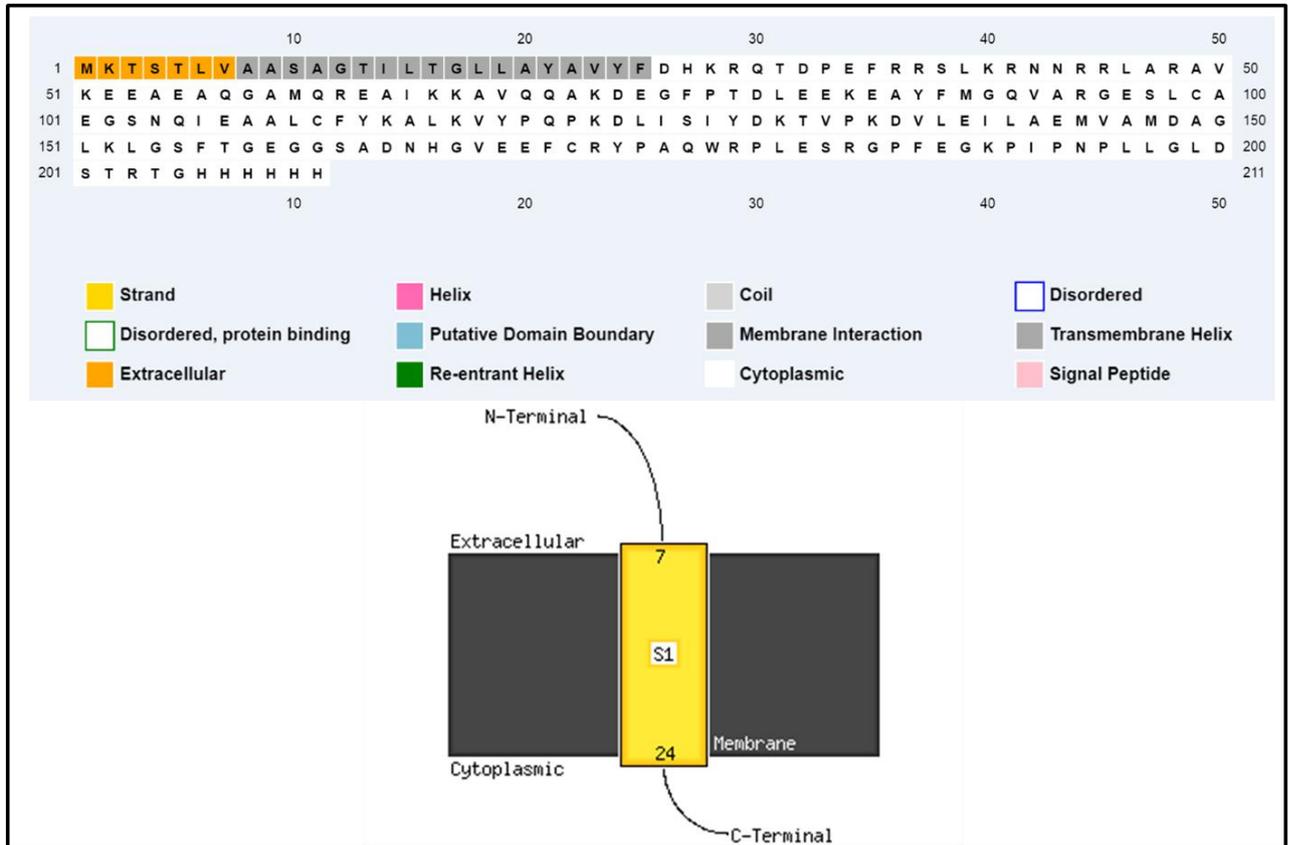


Figura 24 - Gráfico de predição de hélices transmembranares de acordo com MEMSAT-SVM.

10.4 Anexo D

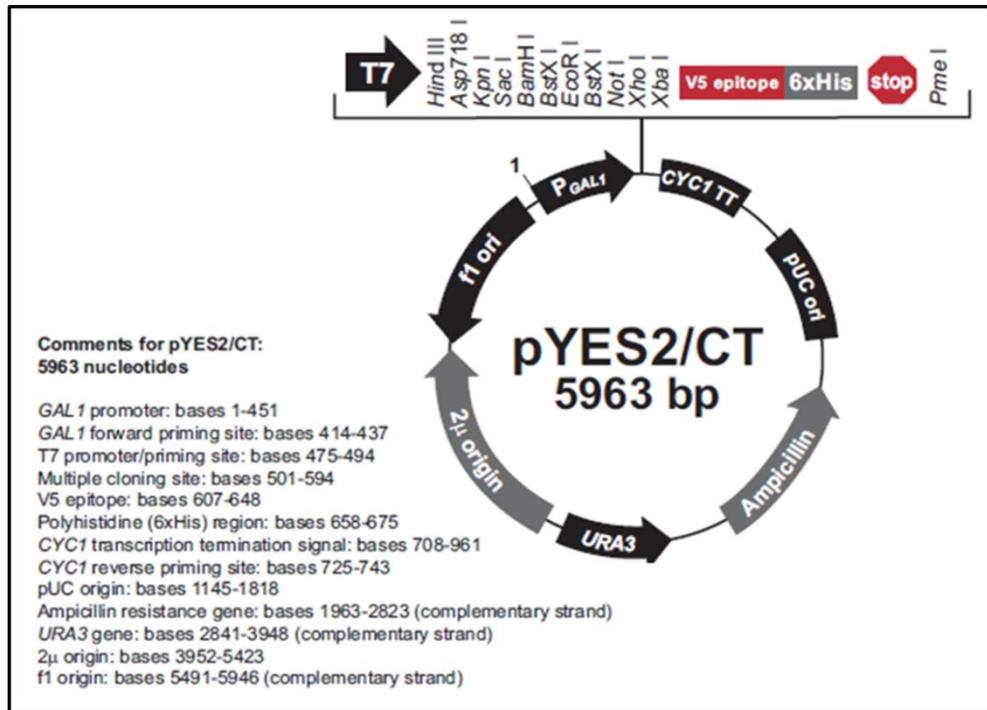


Figura 27 - Mapa do vetor pYES2/CT.

10.5 Anexo E

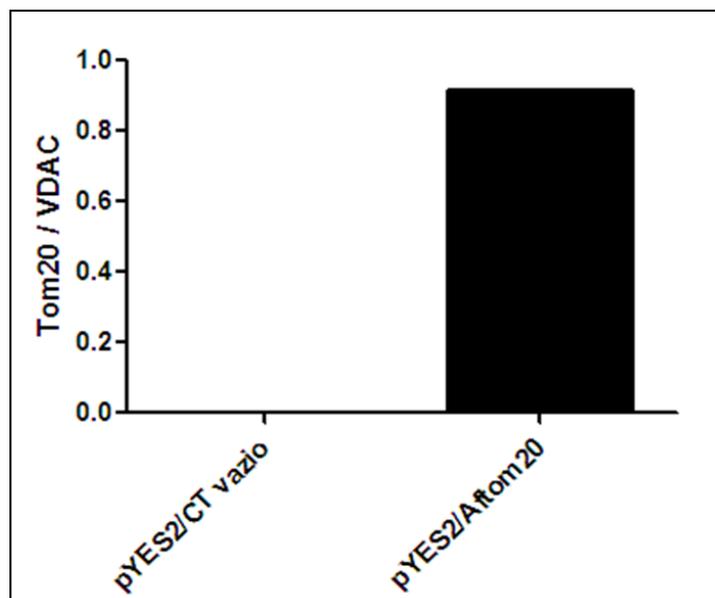


Figura 28 - Análise por densitometria da banda gerada pela proteína recombinante Tom20 através do software ImageJ®, normalizada com relação à intensidade da banda gerada pela proteína VDAC.

