

SASÁ FERREIRA JORGE

**Estudo de extensões proteicas mitocôndria-específicas da protuberância
central do mitorribossomo**

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

São Paulo

2021

SASÁ FERREIRA JORGE

Estudo de extensões proteicas mictocôndria-específicas
da protuberância central do mitorribossomo

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

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Dr. Mário Henrique de Barros

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca no ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo

2021

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Ferreira Jorge, Sasá

Estudo de extensões proteicas mictocôndria-
específicas da protuberância central do
mitorribossomo / Sasá Ferreira Jorge; orientador
Mário Henrique de Barros ; coorientador José
Ribamar dos Santos Ferreira Jr . -- São Paulo, 2021.
78 p.

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

1. mitorribossomo . 2. biogênese mitocondrial .
3. mitocôndria . 4. protuberância central . I.
Henrique de Barros , Mário, orientador. II. dos
Santos Ferreira Jr , José Ribamar, coorientador.
III. Título.

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

Candidato(a): Sasá Ferreira Jorge

Título da Dissertação: Estudo de extensões proteicas mitocôndria-específicas da protuberância central do mitocôndrio

Orientador: Mario Henrique de Barros

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a 22/06/2021 considerou o(a) candidato(a):

Aprovado(n) Reprovado(n)

Examinador(a): Assinatura: pl Monohy
Nome: CLEVERSON BUSO
Instituição: UTFPR

Examinador(a): Assinatura: pl Monohy
Nome: KENATA PASQUIN
Instituição: UNIFESP

Examinador(a): Assinatura: pl Monohy
Nome: RODRIGO GALHARDO
Instituição: ICB-USP

Presidente: Assinatura: Monohy
Nome: _____
Instituição: ICB/USP



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências Biomédicas da USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

1 Decl. CEP.11.2020

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado de Isenção CEP nº 1074/2019, aprovado em 11/12/2019, e por solicitação do Prof. Dr. *Mario Henrique de Barros*, *docente* do Departamento de Microbiologia - ICB USP, informamos que o título do projeto do aluno: *Sasá Ferreira Jorge* foi alterado para: “**Estudo de extensões proteicas mitocôndria-específicas da protuberância central do mitorribossomo**”, para melhor adequação do título ao projeto desenvolvido.

2 São Paulo, 15 de dezembro de 2020.

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

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



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

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **1074/2019** referente ao projeto intitulado: "**Estudo de extensões protéicas únicas do mitoribossomo na formação da sua protuberância central**" sob a responsabilidade de **Sabrina Freire Jorge** e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Mário Henrique de Barros**, do Departamento de Microbiologia, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pelo **CEPSH** - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466/2012.

São Paulo, 11 de dezembro de 2019.

Luciane Valéria Sita

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

Camila Squarzoni Dale

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

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido orientador, professor Mário Henrique de Barros, por todo conhecimento compartilhado, pela oportunidade, confiança e paciência durante meus processos.

Ao co-orientador e amigo José Ribamar dos Santos Ferreira Jr, pelas curas proporcionadas, pelos ensinamentos, conversas e acolhimento.

Aos amigos e amigas do laboratório Cláudia Caetano, Bárbara, Jhúlia, Maria Antônia, Jonathan, Carolina, Dino, Marcela e Fernando; e aqueles que vieram por meio da ciência, em especial Lucy Macharia, Marina e Hugo.

Ao amor dos meus pais, irmã e sobrinhas por me apoiarem, serem suporte, acreditarem e vibrarem por mim.

À vida de irmãos e irmãs travestis e transmasculines, para prosperar em todos os lugares que sonhar.

Ao apoio financeiro FAPESP, CAPES e CNPq e ao programa de Pós-Graduação Interunidades de Biotecnologia da USP.

Ao universo, por tudo proporcionado.

RESUMO

Jorge, S. F. - Estudo de extensões proteicas mitocôndria-específicas da protuberância central do mitorribossomo. 2021. 80. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

É considerado que a origem da célula eucariótica ocorreu a partir da endossimbiose entre uma α -proteobactéria e uma archaea, assim, é proposto que organelas como a mitocôndria tenham surgido como consequência dessa associação simbiótica. A mitocôndria contém seu próprio genoma residual, que codifica para cerca de uma dezena de proteínas nos animais e nos fungos. Para a expressão dos seus genes a mitocôndria conta com o seu próprio conjunto de mitorribossomos que essencialmente traduzem proteínas altamente hidrofóbicas que são inseridas na membrana interna mitocondrial no mesmo momento em que são traduzidas. As proteínas traduzidas pelos mitorribossomos fazem parte dos complexos respiratórios envolvidos na fosforilação oxidativa mitocondrial. Quando comparado ao ribossomo bacteriano, o mitorribossomo apresenta diferentes arranjos proteicos e considerável perda de rRNA. A maioria de suas proteínas que são homólogas às bacterianas, possuem novas extensões em seus terminais proporcionando uma nova estruturação para cada uma delas. Estudos do mitorribossomo e da síntese proteica mitocondrial possuem grande relevância para compreensão de processos biotecnológicos, como em doenças causadas pelo envelhecimento, novos biomarcadores de câncer e alvos para ação de antibióticos. Neste trabalho utilizou-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo para o estudo da relevância dessas extensões, consideradas novidades evolutivas na biogênese do mitorribossomo. Foram escolhidas as extensões de proteínas que atuam na formação da protuberância central da sua subunidade maior (54S). Para esse fim foram realizadas análises *in-silico* que visavam a identificação das regiões de identidade com os homólogos bacterianos, bem como avaliação de conservação e possível identificação de comunidades de resíduos com co-evolução. Em seguida foram construídos diversas variantes alélicas contendo diferentes formas de proteínas truncadas para testes fenotípicos de crescimento. Os resultados obtidos indicam que a maioria das sequências mitocôndria-específica estudadas são essenciais para a montagem do mitorribossomo funcional. Esses estudos fazem parte de um mapeamento maior de todas as proteínas da subunidade 54S que apresentam sequências mitocôndria-específica que permitirá uma

melhor compreensão do papel dessas sequências na especialização funcional dos mitorribossomos.

Palavras chave: mitorribossomo, mitocôndria, protuberância central, ribossomo mitocondrial.

ABSTRACT

Jorge, Sasá Ferreira - Study of unique protein extensions of the mitoribosome central protuberance. 2021. 80. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

A great number of evidences indicated that mitochondria have evolved from a bacterial ancestor that initially became established in a host cell as an endosymbiont. The endosymbiont-to-organelle transition involved a massive reduction of the endosymbiont genome through loss of genes or their transfer to the nucleus. Mitochondria have maintained a separate genetic system that express and translate a handful of largely hydrophobic protein subunits of the respiratory chain and ATP synthase complexes that are synthesized on mitoribosomes. Mitoribosomes are highly organized structures present in mitochondria of most eukaryotes organisms. *Saccharomyces cerevisiae* mitoribosomes are composed of a 54S large subunit (mtLSU) and a 37S small subunit (mtSSU). The two subunits contain altogether 73 mitoribosome proteins (MRPs) and two ribosomal RNAs (rRNAs). Mitoribosomes preserve some similarities with their bacterial counterparts, for example, the sensitivity to antibiotics aminoglycosides, chloramphenicol, and erythromycin, however, one billion years after the endosymbiotic origin of the mitochondria, they have diverged greatly by acquiring new proteins, protein extensions and new RNA segments. In this study, we investigated the functional relevance of mitochondria-specific protein extensions of 4 proteins of the mtLSU central protuberance that are not present in the bacterial homologs. Most of the variants generated in this study failed to complement the respective null mutant, indicating their relevance for proper mitoribosome function. The present study is part of a large comprehensive evaluation of mitochondria-specific segments in the functional specialization of the mitoribosome activity.

Key words: mitoribosome, mitochondria, central protuberance, mitochondrial ribosome.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Complexos híbridos mitocondriais	16
Figura 2 – Estrutura do mitorribossomo com destaque aos constituintes da protuberância central	22
Figura 3 – Posicionamento dos iniciadores desenhados para cada gene ..	29
Figura 4 – Representação dos vetores YIP349 e YCNcATP9	31
Figura 5 – Método de perturbação estatística para medir interações entre resíduos proteicos.....	33
Figura 6 – Proteína uL5 da protuberância central do mitorribossomo	36
Figura 7 – Proteína uL16 da protuberância central do mitorribossomo ...	38
Figura 8 – Proteína bL27 da protuberância central do mitorribossomo ...	40
Figura 9 – Proteína bL31 da protuberância central do mitorribossomo ...	42
Figura 10 – Gráficos da interpretação do <i>software</i> CONAN	45
Figura 11 – Propriedades de crescimento de mutantes uL5	49
Figura 12 – Estrutura 3D do mitorribossomo e ilustração das interações eletrostáticas próximas ao resíduo Q164 de uL5.....	50
Figura 13 – Propriedades de crescimento de mutantes uL16.....	51
Figura 14 – Propriedades de crescimento de mutantes bL27	52
Figura 15 – Propriedades de crescimento de mutantes bL31	53
Figura 16 – Análise da capacidade de síntese traducional dos mutantes mitorribossomo gerados neste estudo	55
Figura 17 – Rede de interações das extensões mitocondria-específica das proteínas uL5, uL16, bL27 e bL31	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estruturas dos ribossomos de bactéria 70S, mitorribossomo de levedura 74S e mitorribossomo de mamífero 55S	19
Tabela 2 – Linhagens utilizadas	26
Tabela 3 – Meios de cultura	27
Tabela 4 – Descrição das variantes alélicas	30
Tabela 5 – Plasmídeos recombinantes expressando variantes alélicas de uL5, uL16, bL27 e bL31	47

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 – Sequência de iniciadores utilizados para construir as variantes alélicas deste trabalho.....	68
Anexo 2 – Plasmídeos criados e utilizados para construir as linhagens mutantes de uL5.....	69
Anexo 3 – Plasmídeos criados e utilizados para construir as linhagens mutantes de uL16.....	70
Anexo 4 – Plasmídeos criados e utilizados para construir as linhagens mutantes de bL27.....	71
Anexo 5 – Plasmídeos criados e utilizados para construir as linhagens mutantes de bL31.....	72
Anexo 6 – Matriz de autocorrelação criada pelo <i>software</i> PFstats da proteína uL5	73
Anexo 7 – Códigos uniprot das proteínas agrupadas nas classes de organismos analisados na figura 10A	74

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. <i>A importância da mitocôndria</i>	14
1.2. <i>S. cerevisiae como modelo de estudo da biogênese mitocondrial</i>	17
1.3. <i>A mitocôndria e a saúde humana</i>	17
1.4. <i>O ribossomo mitocondrial</i>	18
1.5. <i>Proteínas conservadas da protuberância central do mitorribossomo</i>	23
2. OBJETIVOS	25
2.1. <i>Objetivo Geral</i>	25
2.2. <i>Objetivos Específicos</i>	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1. <i>Linhagens utilizadas</i>	25
3.2. <i>Procedimentos gerais para manipulação de S. cerevisiae e E. coli</i>	27
3.3. <i>Identificação das extensões mitocondria-específica</i>	28
3.4. <i>Sequência de iniciadores</i>	29
3.5. <i>Construção de variantes alélicas</i>	30
3.6. <i>Conservação de resíduos e análises de correlação</i>	32
3.7. <i>Ensaio de crescimento com diluição seriada</i>	33
3.8. <i>Marcação de proteínas codificadas pelo DNA mitocondrial</i>	34
4. RESULTADOS	34
4.1. <i>Identificação das regiões mitocondria-específica e análise estrutural</i>	34
4.1.1. <i>uL5</i>	34
4.1.2. <i>uL16</i>	37
4.1.3. <i>bL27</i>	39
4.1.4. <i>bL31</i>	41
4.2. <i>Análise de bioinformática de conservação e co-evolução de resíduo</i>	43
4.3. <i>Variantes alélicas obtidas</i>	46
4.4. <i>Testes biológicos de crescimento e função respiratória</i>	48
4.4.1. <i>Variantes de uL5</i>	48
4.4.2. <i>Variantes de uL16</i>	50

4.4.3. Variantes de <i>bL27</i>	51
4.4.4. Variantes de <i>bL31</i>	52
4.5. Avaliação da tradução mitocondrial	54
5. DISCUSSÃO	55
6. CONCLUSÃO.....	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
ANEXOS	68

3 INTRODUÇÃO

3.1 A importância da mitocôndria

Como uma "casa de força" da célula eucariótica, a mitocôndria é o centro do metabolismo energético da célula atuando na produção de ATP a partir da oxidação de carboidratos, proteínas e lipídios a CO_2 . Tal processo ocorre através da fosforilação oxidativa, com elétrons sendo retirados do alimento e utilizados na redução de elementos da cadeia respiratória. A cadeia respiratória recebe esse nome por utilizar uma série de transportadores eletrônicos que tem o O_2 como o receptor final dos elétrons. A cadeia é formada pelos complexos respiratórios mitocondriais (complexos I a IV), coenzima Q e citocromo *c*. Concomitante aos processos de óxido-redução dos sítios catalíticos dos complexos há o bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, gerando um gradiente eletroquímico. Diferentemente dos animais e mesmo de outros fungos, *Saccharomyces cerevisiae* não possui complexo respiratório correspondente à NADH desidrogenase (complexo I). Ao invés de um complexo, possui três enzimas isoladas, duas delas no espaço intermembranas (Nde1 e Nde2) são responsáveis pela oxidação do NADH citossólico enquanto Ndi1 na matriz mitocondrial é responsável pela oxidação do NADH gerado no interior da organela (Gomes et al., 2013). Além da oxidação de NADH, FADH_2 é também oxidado, mas pelo complexo II, a succinato desidrogenase. Succinato e NADH doam elétrons para a Coenzima Q, que por sua vez os transfere para a ubiquinol-citocromo *c* redutase, o complexo III e aqui há o concomitante bombeamento de prótons para o espaço intermembrana. Do complexo III os elétrons seguem para o citocromo *c* e desse para a citocromo *c* oxidase (complexo IV), com novo bombeamento de prótons e a redução final do oxigênio. Os prótons retornam à matriz mitocondrial pela ATP sintase (complexo V); esse movimento protônico é utilizado para a fosforilação de ADP em ATP. Em humanos o processo de fosforilação oxidativa garante a um indivíduo adulto a produção e consumo de cerca de 25 a 30 kg de ATP durante um dia (Skulachev, 1999). Além da produção de energia, a mitocôndria também desempenha funções essenciais em processos vitais como a apoptose (Liu et al., 1996; Susin et al., 1999), regulação da longevidade celular (Bonawitz et al., 2007; Holzemberger et al., 2003) e participa de diversos sistemas bioquímicos. Com esse papel central no metabolismo celular, não é por acaso que a maior causa de erros inatos do metabolismo

sejam derivados de doenças mitocondriais (Alston CL, Rocha MC, Lax NZ, Turnbull DM, Taylor RW. The genetics and pathology of mitochondrial disease. *J Pathol.* 2017;241(2):236-250. doi:10.1002/path.4809).

A hipótese mais aceita para a origem da mitocôndria é derivada da teoria endossimbiótica, originalmente proposta por Lynn Margulis (1981). De acordo com essa teoria a mitocôndria se originou a partir de um evento de endossimbiose entre uma α -proteobactéria com uma archaea, dessa associação houve um benefício mútuo que propiciou a evolução da célula eucariótica. A α -proteobactéria se manteve dentro da célula hospedeira de forma semi-autônoma. No decorrer do curso da evolução a maior parte do seu material genético foi transferido e incorporado no genoma da célula hospedeira, que se transformou no que hoje entendemos como o núcleo celular (Kurland e Andersson, 2000; Jornayvaz e Shulman, 2010). A estrutura da mitocôndria é dada por duas membranas, a membrana interna é dobrada em estruturas denominada cristas e delimita dois compartimentos distintos: a matriz mitocondrial e o espaço intermembrana (Figura 1). Nas cristas mitocondriais ficam concentrados os complexos respiratórios.

Os complexos respiratórios e os ribossomos mitocondriais (mitorribossomo) são exemplos únicos de unidades celulares animais e fúngicas cuja formação depende de dois genomas distintos. Pouco mais de uma dezena de proteínas são sintetizadas no interior da mitocôndria dos animais. Em sua essência são proteínas altamente hidrofóbicas que constituem os centros catalíticos dos complexos respiratórios e da ATP sintase. Já o DNA mitocondrial (mtDNA) de *S. cerevisiae* codifica 8 proteínas sendo elas três subunidades da citocromo *c* oxidase: *COX1*, *COX2* e *COX3*, três subunidades da ATP sintase: *ATP6*, *ATP8* e *ATP9*, uma subunidade da ubiquinol citocromo *c* redutase: *COB1*, uma proteína ribossomal: *VARI*, além de RNAr 15S e 21S e, finalmente os 24 tRNAs que perfazem todos os codons (Foury et al., 1998) (Figura 1).

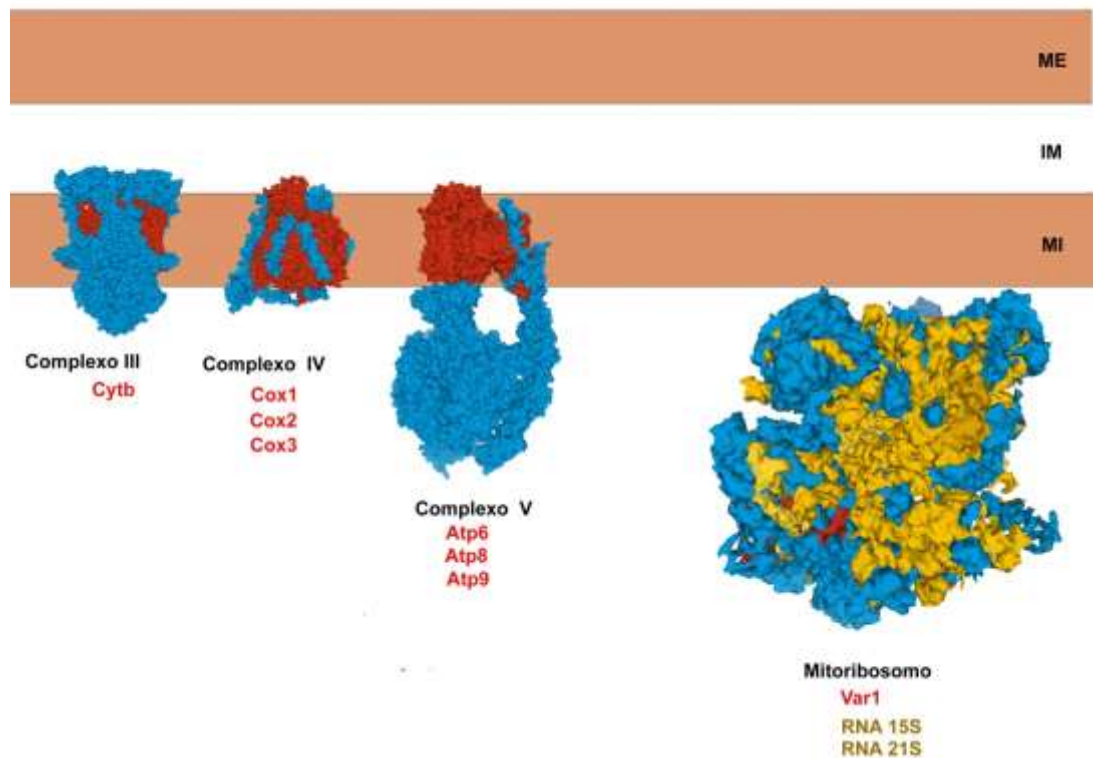


Figura 1 – Complexos híbridos mitocondriais. Os complexos respiratórios mitocondriais e o mitorribossomo são resultados de produtos gênicos codificados por dois genomas distintos. Em vermelho estão indicadas as proteínas codificadas pelo DNA mitocondrial e identificadas nominalmente em cada complexo. Em azul estão representadas as proteínas codificadas pelo DNA nuclear. Em amarelo os RNAs mitocondriais 15S e 21S constituintes do mitorribossomo. A figura foi preparada com base nas estruturas PDB 6G1Q, 6CP6 e 5MRC.

Por fim, no processo de biogênese dos complexos respiratórios e do mitorribossomo de levedura, as oito proteínas e os rRNAs codificadas pelo DNA mitocondrial se associam às proteínas oriundas do citoplasma. A importação deve ser feita de forma coordenada, e ao todo cerca de 1100 proteínas codificadas pelo genoma nuclear e sintetizadas nos ribossomos citosólicos são importadas para o interior da mitocôndria. Uma importante fração dessas proteínas importadas, aproximadamente uma centena, irá atuar exclusivamente na execução da síntese proteica mitocondrial (Merz e Westermann, 2009). Muitas delas regulam a expressão gênica mitocondrial de forma que a síntese de produtos

mitocondriais acompanhe em termos quantitativos a entrada de proteínas codificadas pelo DNA nuclear, estabelecendo um equilíbrio estequiométrico de proteínas no processo de montagem dos complexos mitocondriais. Um mecanismo de retroalimentação tautológica na regulação de expressão e montagem dos complexos envolve proteínas com mais de uma função, tais como na ativação da tradução de proteínas mitocondriais e na participação de etapas iniciais do processo de montagem dos complexos respiratórios (Barros e McStay, 2020, Franco et al., 2020).

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

Por ser um organismo anaeróbio facultativo, a levedura se torna um organismo modelo muito atraente ao estudar processos mitocondriais. O anaeróbio facultativo possui a capacidade de sobreviver sem uma cadeia respiratória em funcionamento, desde que cultivado com fontes de carbono fermentáveis. Essa capacidade da levedura pode ser usada para estudar inativações de componentes dos complexos respiratórios. Mesmo a perda do DNA mitocondrial (mtDNA) não é letal, desde que as células sejam mantidas em uma fonte de carbono fermentativo, levando ao crescimento de colônias muito pequenas (descrito inicialmente como “*petite*” por Boris Ephrussi em 1949).

3.3 *A mitocôndria e a saúde humana*

Dado papel central da mitocôndria no metabolismo celular, é compreensível que qualquer modificação que comprometa o seu funcionamento possa gerar danos severos às células, provocando doenças mitocondriais. Mutações nas MRPs (*mitoribosome proteins*), rRNAs e fatores de tradução são responsáveis por inúmeras doenças mitocondriais de caráter heterogêneo e multisistêmico, como a síndrome de Leigh, perda auditiva neurossensorial, encefalopatias e cardiomiopatias hipertróficas (De silva et al., 2015; Rotig, 2011; Smits et al., 2010).

Além disso, vários antibióticos clinicamente úteis utilizados como terapia de primeira linha contra doenças infecciosas microbianas podem, inadvertidamente, atingir mitorribossomos, resultando em efeitos colaterais de leves a graves em condições fisiológicas e patológicas (Singh et al., 2014; Jones et al., 2009). Os ribossomos

mitocondriais e seus componentes também estão surgindo como biomarcadores de câncer e alvos para a terapia do câncer (Kim et al., 2017). Em termos gerais, doenças associadas ao envelhecimento, como a diabetes tipo 2 e o Alzheimer, carregam importantes disfunções mitocondriais.

Os estudos a respeito da biogênese mitocondrial são fundamentais para melhor compreensão da interação entre os genomas mitocondrial e nuclear, elucidar o funcionamento das doenças mitocondriais permite elaborar formas de tratamento eficazes para as mesmas.

3.4 O ribossomo mitocondrial

O mitorribossomo 74S de *S. cerevisiae* possui um peso molecular de 3 MD, consistindo de uma subunidade 54S de 1,9 MD (*mtLSU*) e outra menor 37S de 1,1 MD (*mtSSU*) (Amunts et al., 2014). É um complexo ribonucleoproteico essencial para a síntese proteica organelar, é composto por 73 proteínas e dois rRNAs (Desai et al., 2017).

A teoria da endossimbiose para origem mitocondrial é corroborada por semelhanças existentes no sistema de expressão gênico existente em bactérias e organelas. Por exemplo, além da homologia do rRNA, algumas similaridades são encontradas como a sensibilidade a antibióticos aminoglicosídicos como chloroamfenicol, e à eritromicina (Tzagoloff, 1977), a necessidade de formilação da metionina inicial (Franco et al., 2019), ou o uso do mesmo tRNA-E para carregamento de glutamina e ácido glutâmico (Barros et al., 2012). Entretanto, mais de um bilhão de anos após o evento de endossimbiose é natural que divergências evolutivas tenham sido acumuladas, como a aquisição de novos elementos proteicos e segmentos de rRNA no mitorribossomo (Amunts et al., 2014; Desai et al., 2017; Mears et al., 2006). Como é conhecido hoje, os mitorribossomos de levedura têm um conteúdo mais alto de proteínas que rRNA em comparação com os seus homólogos bacterianos e essa diferença é ainda mais acentuada nos mitorribossomos de mamíferos (Tabela 1) (Suhm, 2019). Em resumo, no mitorribossomo de fungos e animais o conteúdo de RNA é menor, há total ausência do 5S rRNA, a massa de proteínas é maior, e há mudanças na arquitetura do túnel de saída das proteínas recém sintetizadas, em consequência da sua especialização na geração de produtos altamente hidrofóbicos (Mears et al., 2006; Amunts et al., 2014; Desai et al., 2017) e há uma possível especialização da protuberância central no controle do processo de tradução com o de montagem dos

complexos respiratórios mitocondriais (Box et al., 2017).

Ribossomo bacteriano	Mitorribossomo	
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Homo sapiens</i>
70S	74S	55S
LSU 50S	<i>mtLSU</i> 54S	<i>mtLSU</i> 39S
• 23S rRNS + 5S rRNA	• 21S rRNA	• 16S rRNA + mt-tRNA ^{Val}
• 36 proteínas	• 46 proteínas	• 50 proteínas
SSU 30S	<i>mtSSU</i> 37S	<i>mtSSU</i> 28S
• 16S rRNA	• 15S rRNA	• 12S rRNA
• 21 proteínas	• 34 proteínas	• 30 proteínas

Tabela 1: Estruturas dos ribossomos de bactéria 70S, mitorribossomo de levedura 74S e mitorribossomo de mamíferos 55S (Brown et al., 2014; Greber et al., 2015; Hentschel et al., 2017).

Nos últimos anos muitos estudos têm concentrado esforços na caracterização estrutural do mitorribossomo através do aprimoramento de técnicas de crio-microscopia eletrônica (Brown et al., 2014; Amunts et al., 2014; Desai et al., 2017) e no estudo de etapas necessárias para a sua montagem (Zeng et al., 2018). Entretanto, comparativamente ao processo de montagem dos ribossomos bacterianos (Shajani et al., 2011) pouco se conhece sobre o processo e a sequência de eventos necessários para a montagem das subunidades 54S e 37S do mitorribossomo de levedura. O processo de biogênese do mitorribossomo de levedura, envolve a transcrição, processamento e correto dobramento do rRNA; a ligação e soltura de fatores de montagem, incluindo GTPases mitocondriais – Mtg1p, Mtg2p e Mtg3 (Barrientos et al., 2003; Datta et al., 2005; Paul et al., 2012) – duas DEAD-box helicases (De Silva et al., 2013; De Silva et al., 2017) e chaperonas de montagem como Mam33p (Hillman e Henry, 2019). Em humanos se conhece fatores como Mtg1, Obh1, C7orf30 necessários para a montagem da subunidade maior (Kotani et al., 2013, Rorbach e ta l., 2012), enquanto Dra-lik1 e C4orf14 estão envolvidos na montagem da subunidade menor (Dennerlein et al., 2010; He et al., 2012).

Os eventos iniciais do processo de montagem do mitorribossomo são direcionados para ocorrer junto à membrana interna da mitocôndria através do ancoramento do 21S

rRNA recém transcrito à região (Zeng et al., 2018). Além disso, proteínas da membrana interna mitocondrial como Mba1p e Mrx15p têm o papel de alinhar o mitorribossomo com a translocase Oxa1p que irá introduzir os polipeptídeos recém-traduzidos na membrana interna mitocondrial (Pfeffer et al., 2015). Em humanos Mba1p é um constituinte integral do mitorribossomo recebendo a denominação mL45 (Brown et al., 2014).

A subunidade maior do mitorribossomo de levedura contém 46 proteínas e o 21S rRNA; ela é responsável por catalisar as ligações peptídicas ao longo do processo de síntese proteica e possui o túnel de saída dos polipeptídeos recém sintetizados. Inicialmente, as proteínas do mitorribossomo foram nomeadas por Mrp, Mrpl ou YmL (Graack e Wittmann-Liebold, 1998; Pan e Mason, 1995), contudo buscando-se um consenso com a nomenclatura das MRPs da subunidade maior (“L” *large*) dos outros tipos ribossômicos (bacterianos, citossólicos, cloroplastos) definiu-se os termos uL e bL para as proteínas com homólogos universais (uL) e bacterianos (bL), e para as típicas de mitorribossomo o termo mL. Assim, das 46 proteínas da subunidade 54S 26 apresentam homólogos bacterianos ou universais (uL e bL) e as outras 20 são consideradas novidades evolutivas típicas do mitorribossomo (mL). Dentre as 26 proteínas uL e bL, 22 delas apresentam sequências mitocôndria-específica nas porções N-terminal ou C-terminal (Amunts et al., 2014) não sendo portanto encontradas nos homólogos bacterianos ou citoplasmáticos.

As proteínas típicas e as extensões não presentes em outros ribossomos se acumulam mais tipicamente na sua superfície e conferem ao mitorribossomo um formato único e bem distinto dos demais (Amunts et al., 2014). Essas extensões mitocôndria-específicas são caracterizadas por longas caudas e loops ao longo dos domínios globulares centrais, promovendo associações com sequências mitocôndria-específicas de outras proteínas, ou com proteínas mL e expansões do 21S rRNA (Amunts et al., 2014). As extensões mitocôndria-específica têm, por exemplo, papel fundamental na formatação do túnel de saída do mitorribossomo que é especialmente adaptado para a translocação de proteínas altamente hidrofóbicas.

O laboratório tem como linha de pesquisa o estudo da expressão gênica mitocondrial e do seu processo de tradução, tendo recentemente caracterizado a proteína bL34 como um constituinte da subunidade maior do mitorribossomo (Guedes-Monteiro et al., 2018). Em um projeto colaborativo com o laboratório dos Dr. Barrientos e Dra.

Fontanesi (Universidade de Miami – Estados Unidos) iniciamos a investigação de relevância funcional das extensões mitocôndria-específica presentes nas 22 proteínas da subunidade maior do mitorribossomo.

Aqui avaliamos a importância funcional dessas extensões nos constituintes da protuberância central (protuberância central) da subunidade maior 54S do mitorribossomo, através da expressão de alelos truncados, mas com endereçamento mitocondrial garantido.

Em bactéria, archaea e ribossomos citoplasmáticos eucarióticos a protuberância central consiste de um núcleo central de rRNA interagindo com várias proteínas ribossomais. Como mencionado acima, os mitorribossomos dos fungos e dos animais não possuem 5S rRNA, um constituinte central da protuberância central em bactéria. Assim, os espaços deixados pelo 5S rRNA na protuberância central acabaram sendo espacialmente substituídos por novas proteínas ribossomais e novas extensões proteicas. A protuberância central dos mitorribossomos é constituída por proteínas específicas da mitocôndria (mL38, mL40, mL46, mL59), extensões do 23S rRNA (agrupamentos 82-ES e 84-ES1), e as proteínas uL5, uL16, bL27, bL31 e bL33 (Figura 2) encontradas em outros ribossomos, mas no mitorribossomo com suas respectivas extensões mitocôndria-específicas.

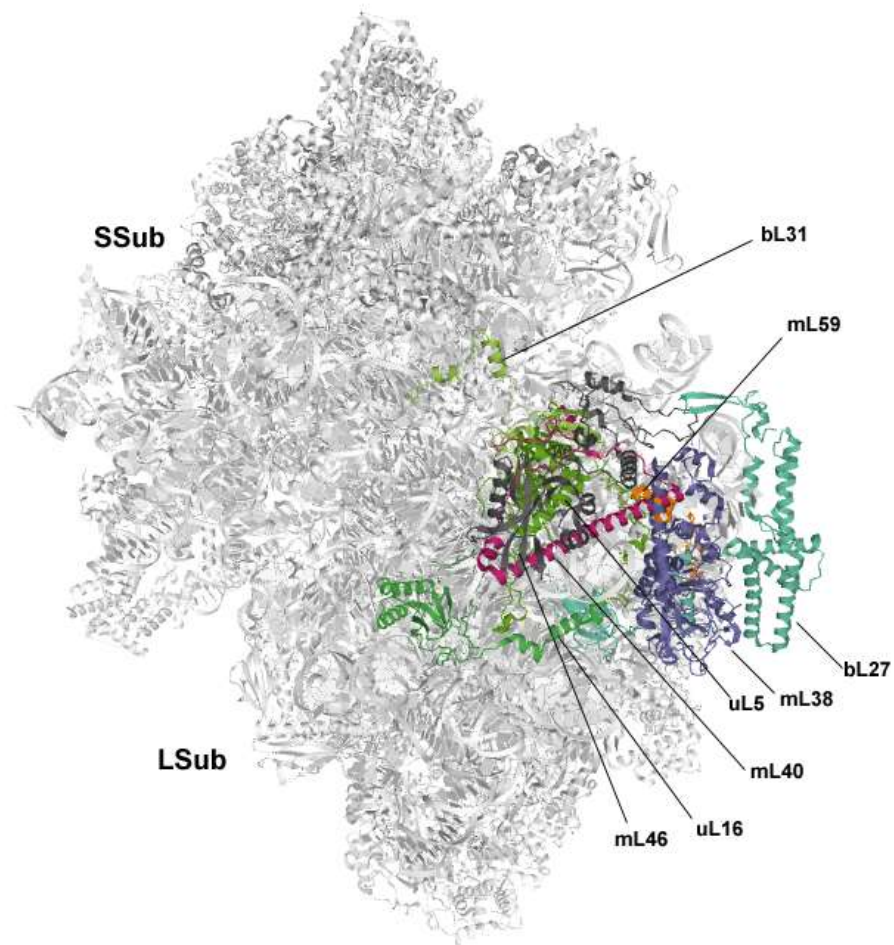


Figura 2- Estrutura do mitorribossomo com destaque aos constituintes da Protuberância central. A subunidade menor do mitorribossomo (SSub) e a maior (LSub) estão indicadas assim como as proteínas uL5 (verde escuro), uL16 (verde esmeralda), bL27 (verde água), bL31 (verde claro), mL38 (roxo), mL40 (lilás), mL46 (marrom) e mL 59 (laranja). Baseado na estrutura PDB 5MRC.

A montagem da *mtLSU* é hierárquica e modular, com estágio inicial na membrana mitocondrial (Zeng et al., 2018). O processo começa pela formação da protuberância voltada para a membrana, que irá ancorar a partícula pré-54S em crescimento na membrana interna mitocondrial, permitindo a incorporação das proteínas formadoras do túnel de saída do polipeptídeo. Em seguida, segue-se a incorporação de conjuntos de subunidades de estágio intermediário e o módulo da protuberância central pré-montado. A montagem terminaria pela incorporação de um aglomerado de proteínas associadas

periféricas, mas essenciais para a montagem do mitorribossomo (Zeng et al., 2018).

De acordo com as estruturas secundárias bacterianas 23S rRNA e 21S rRNA de levedura, o rRNA é dividido em seis domínios (I a VI). Esses domínios, no entanto, não correspondem bem aos domínios terciários estruturais (Williamson, 2003). Zeng et al. (2018) define que as proteínas em cada cluster de montagem localizam-se sobre vários domínios 21S rRNA, enquanto que as do cluster 4 interagem principalmente com hélices no domínio 21S rRNA V.

3.5 Proteínas conservadas da protuberância central do mitorribossomo

uL5/MRPL7

A proteína uL5 tem 292 resíduos e 33 KDa estimados; é codificada pelo gene *MRPL7* tendo esse *locus* já recebido denominações anteriores como *YmL5* e *YmL7* (Pan e Mason, 1995). A fim de seguir com a nomenclatura correntemente mais utilizada, neste trabalho iremos identificá-la como uL5. uL5 pertence principalmente à área da protuberância central e é classificada por Zeng et al. (2018) como proteína intermediária do conjunto 4 (figura 1).

Em bactérias a proteína homóloga L5, liga o tRNA do sítio P à subunidade ribossômica maior, onde medeia a ligação do 5S RNA. Algumas de suas proteínas associadas podem ajudar a estabilizar o posicionamento dos tRNAs ligados ao ribossomo. Ao contrário da L5 bacteriana, a uL5 de *S. cerevisiae* possui uma inserção de alça que se estende para região desocupada pelo 5S rRNA (Amunts et al., 2014, Zeng 2018).

uL16/MRPL16

A proteína uL16 tem 232 resíduos que corresponde a 26KDa (Pan e Mason, 1995); é codificado pelo gene *MRPL16*, o qual também recebe denominações anteriores com *YmL47* e *RML16*.

O tronco L7/L12 é uma grande protuberância ribossômica responsável pelo recrutamento de fatores de tradução. Em bactérias, é formado por 23S rRNA (h42 a h44),

L10, L11 e múltiplas cópias de L12. O aumento da estabilidade do tronco L7/L12 no mitorribossomo é produto de uma rede de proteínas não observada em outros ribossomos, com a extensão C-terminal mitocôndria-específica de uL16 participando diretamente desta coordenação (Brown et. al, 2014).

No ribossomo bacteriano, L16 se liga diretamente ao 23S rRNA e está localizada no sítio A do centro da peptidiltransferase, entrando em contato com tRNAs do sítio A e P. A extensão do C terminal de uL16 compensa a perda do 5S rRNA e de acordo com Zeng (2018) está na superfície da estrutura *mtLSU*, participando do estágio final da montagem.

bL27/MRP7

A proteína bL27 possui 371 resíduos que correspondem a 43 KDa; é codificada pelo gene *MRP7* e já recebeu denominações anteriores como *MRPL2* e *YmL2* (Graack e Wittmann-Liebold, 1998)

De acordo com a estrutura da subunidade 54S (Amunts, et al 2014) a extensão C-terminal de bL27 forma um domínio compacto que interage com rRNA na hélice 82-ES1-3, participando como extensão proteica para remodelar a protuberância central. Pertence ao grupo de clusters 2, no qual suas proteínas podem servir como conexão entre outros aglomerados durante o estágio intermediário da biogênese da subunidade 54S (Zeng et al 2018).

bL31/MRPL36

bL31 é uma proteína com 177 resíduos e peso estimado de 20KDa; é codificada pelo gene *MRPL36* que já foi denominado anteriormente como *YmL36* (Graack e Wittmann-Liebold, 1998).

Nas bactérias, as subunidades maior e menor do ribossomo estão conectadas através de 12 pontes intersubunidades (Liu e Fredrick, 2016). A única ponte proteína-proteína no ribossomo bacteriano é a ponte intersubunidade B1b ribossômica, que é formada principalmente pela proteína bL31 (que conecta o domínio da subunidade 30S a protuberância central da subunidade 50S (Lilleorg, 2017)). No mitorribossomo o C-terminal mitocôndria-específico de bL31 ainda realiza contato por pontes de hidrogênio com uS19 (Desai et al., 2017)

Em bactéria demonstrou-se que bL31 é importante para a fidelidade da tradução, na formação de polissomos e na facilitação do início da tradução (Lilleorg, 2017). Já em levedura a super-expressão de bL31 suprime mutações de ponto na sequência não codificante de *COX2* mas necessárias para a ativação de sua tradução (Bonney et al., 2001).

Presente no conjunto 4, classificado por Zeng, pertence principalmente à área da protuberância central, é proposto para formar um módulo de montagem independente de RNA. As três proteínas que se encontram com o tRNA (mL40, mL46, mL48), se ligam também a superfície de bL31, mas participam de um estágio de montagem mais tardio (Boghen et al., 2014; Zeng et al., 2018).

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Estudar o processo de biogênese da subunidade 54S do mitorribossomo através da caracterização de suas proteínas estruturais conservadas constituintes da protuberância central que apresentam extensões proteicas que estão ausentes no ribossomo bacteriano.

4.2 Objetivos Específicos

- Construção de variantes alélicas e linhagens contendo-as para os testes fenotípicos e bioquímicos;
- Avaliação da capacidade de tradução decorrentes das variantes alélicas construídas.
- Realizar análises de bioinformática para compreender a evolução das proteínas formadoras da protuberância central do mitorribossomo.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Linhagens utilizadas

As linhagens de *S. cerevisiae* e *E. coli* utilizadas neste trabalho estão listadas na tabela

a seguir.

Tabela 2: Linhagens utilizadas

<i>E. coli</i>	Genótipo	Referência
RR1	(Δ (<i>gpt-proA</i>) 62, <i>leuB6</i> , <i>thi-1</i> , <i>lacY1</i> , <i>hsdB20</i> , <i>rpsL20</i> (<i>StrT</i>), <i>ara-14</i> , <i>galK2</i> , <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>supE44</i> , <i>mcrBB</i>)	Hanahan, 1983
<i>S. cerevisiae</i>	Genótipo	Referência
W303-1B	<i>MATa ade2-1 trp1-1 his3-1,15 leu2-3,112 ura3-1</i>	Rothstein, R. Columbia University
aCB11 ρ^0	<i>MATa ade1</i> ρ^0	Tzagoloff et al., 1975
α KL14	<i>MATa his ile val</i> ρ^0	Tzagoloff et al., 1975
α W303 Δ MRPL7/ <i>I</i> ⁰ + <i>VARI</i> + <i>RNR1</i>	<i>MATa ade2-1 trp1-1 his3-1,15 leu2-3,112 ura3-1 mrp17::kanMX URA3::pRS316-VARI LEU2::YEplac181-RNR1, r⁺ I⁰</i>	Zeng et al., 2018
α W303 Δ MRPL16/ <i>I</i> ⁰ + <i>VARI</i> + <i>RNR1</i>	<i>MATa ade2-1 trp1-1 his3-1,15 leu2-3,112 ura3-1 mrp16:: kanMX URA3::pRS316-VARI LEU2::YEplac181-RNR1, r⁺ I⁰</i>	Zeng et al., 2018
α W303 Δ MRP7/ <i>I</i> ⁰ + <i>VARI</i> + <i>RNR1</i>	<i>MATa ade2-1 trp1-1 his3-1,15 leu2-3,112 ura3-1 mrp7:: kanMX URA3::pRS316-VARI LEU2::YEplac181-RNR1, r⁺ I⁰</i>	Zeng et al., 2018
α W303 Δ MRPL36/ <i>I</i> ⁰ + <i>VARI</i> + <i>RNR1</i>	<i>MATa ade2-1 trp1-1 his3-1,15 leu2-3,112 ura3-1 mrp136:: kanMX URA3::pRS316-VARI LEU2::YEplac181-RNR1, r⁺ I⁰</i>	Zeng et al., 2018
α W303 Δ MRPL7/ <i>I</i> ⁰ + <i>VARI</i> + <i>RNR1</i> + <i>MRPL7-7</i>	<i>MATa ade2-1 trp1-1 his3-1,15 leu2-3,112 ura3-1 mrp17:: kanMX URA3::pRS316-VARI LEU2::YEplac181-RNR1, TRP1::YCp22-GDP-NcATP9-MRPL7-7 ρ^+ I⁰</i>	Este trabalho
α W303 Δ MRPL7/ <i>I</i> ⁰ + <i>VARI</i> + <i>RNR1</i> + <i>MRPL7-56</i>	<i>MATa ade2-1 trp1-1 his3-1,15 leu2-3,112 ura3-1 mrp17:: kanMX URA3::pRS316-VARI LEU2::YEplac181-RNR1, TRP1::YCp22-GDP-NcATP9-MRPL7-56 ρ^+ I⁰</i>	Este trabalho
α W303 Δ MRPL7/ <i>I</i> ⁰ + <i>VARI</i> + <i>RNR1</i> + <i>MRPL7-F5</i>	<i>MATa ade2-1 trp1-1 his3-1,15 leu2-3,112 ura3-1 mrp17:: kanMX URA3::pRS316-VARI LEU2::YEplac181-RNR1, TRP1::YCp22-GDP-NcATP9-MRPL7-F5 ρ^+ I⁰</i>	Este trabalho
α W303 Δ MRPL7/ <i>I</i> ⁰ + <i>VARI</i> + <i>RNR1</i> + <i>MRPL7-F6</i>	<i>MATa ade2-1 trp1-1 his3-1,15 leu2-3,112 ura3-1 mrp17:: kanMX URA3::pRS316-VARI LEU2::YEplac181-RNR1, TRP1::YCp22-GDP-NcATP9-MRPL7-F6 ρ^+ I⁰</i>	Este trabalho
α W303 Δ MRPL7/ <i>I</i> ⁰ + <i>VARI</i> + <i>RNR1</i> + <i>puL5-86</i>	<i>MATa ade2-1 trp1-1 his3-1,15 leu2-3,112 ura3-1 mrp17::kanMX URA3::pRS316-VARI LEU2::YEplac181-RNR1, TRP1::puL5-86 ρ^+ I⁰</i>	Este trabalho
α W303 Δ MRPL16/ <i>I</i> ⁰ + <i>VARI</i> + <i>RNR1</i> + <i>MRPL16-8</i>	<i>MATa ade2-1 trp1-1 his3-1,15 leu2-3,112 ura3-1 mrp16:: kanMX URA3::pRS316-VARI LEU2::YEplac181-RNR1, TRP1::YCp22-GDP-NcATP9-MRPL16-8 ρ^+ I⁰</i>	Este trabalho
α W303 Δ MRPL16/ <i>I</i> ⁰ + <i>VARI</i> + <i>RNR1</i> + <i>MRPL16-9</i>	<i>MATa ade2-1 trp1-1 his3-1,15 leu2-3,112 ura3-1 mrp16:: kanMX URA3::pRS316-VARI LEU2::YEplac181-RNR1, TRP1:: YCp22-GDP-NcATP9-MRPL16-9 ρ^+ I⁰</i>	Este trabalho
α W303 Δ MRPL16/ <i>I</i> ⁰ + <i>VARI</i> + <i>RNR1</i> + <i>MRPL16-60</i>	<i>MATa ade2-1 trp1-1 his3-1,15 leu2-3,112 ura3-1 mrp16:: kanMX URA3::pRS316-VARI LEU2::YEplac181-RNR1, TRP1:: YCp22-GDP-NcATP9-MRPL16-60 ρ^+ I⁰</i>	Este trabalho

α W303 Δ MRP7/I ⁰ + VARI + RNR1 + - MRP7-25	MAT α ade2-1 trp1-1 his3-1,15 leu2-3,112 ura3-1 mrp7:: kanMX URA3::pRS316-VARI LEU2::YEplac181-RNR1 TRP1:: YCp22-GDP-NcATP9- MRP7-25 ρ^+ I ⁰	Este trabalho
α W303 Δ MRP7/I ⁰ + VARI + RNR1 + MRP7-26	MAT α ade2-1 trp1-1 his3-1,15 leu2-3,112 ura3-1 mrp7:: kanMX URA3::pRS316-VARI LEU2::YEplac181-RNR1 TRP1:: YIp349- MRP7-26 ρ^+ I ⁰	Este trabalho
α W303 Δ MRP7/I ⁰ + VARI + RNR1 + MRP7-51	MAT α ade2-1 trp1-1 his3-1,15 leu2-3,112 ura3-1 mrp7:: kanMX URA3::pRS316-VARI LEU2::YEplac181-RNR1 TRP1:: YCp22-GDP-NcATP9- MRP7-51 ρ^+ I ⁰	Este trabalho
α W303 Δ MRPL36/I ⁰ + VARI + RNR1 + MRPL36-37	MAT α ade2-1 trp1-1 his3-1,15 leu2-3,112 ura3-1 mrpl36:: kanMX URA3::pRS316-VARI LEU2::YEplac181-RNR1 TRP1:: YCp22-GDP-NcATP9- MRPL36-37 ρ^+ I ⁰	Este trabalho
α W303 Δ MRPL36/I ⁰ + VARI + RNR1 + MRPL36-38	MAT α ade2-1 trp1-1 his3-1,15 leu2-3,112 ura3-1 mrpl36:: kanMX URA3::pRS316-VARI LEU2::YEplac181-RNR1 TRP1:: YCp22-GDP-NcATP9- MRPL36-38 ρ^+ I ⁰	Este trabalho
α W303 Δ MRPL36/I ⁰ + VARI + RNR1 + MRPL36-39	MAT α ade2-1 trp1-1 his3-1,15 leu2-3,112 ura3-1 mrpl36:: kanMX URA3::pRS316-VARI LEU2::YEplac181-RNR1 TRP1:: YCp22-GDP-NcATP9- MRPL36-39 ρ^+ I ⁰	Este trabalho
α W303 Δ MRPL36/I ⁰ + VARI + RNR1 + MRPL36-39 + LPE10	MAT α ade2-1 trp1-1 his3-1,15 leu2-3,112 ura3-1 mrpl36:: kanMX URA3::pRS316-VARI LEU2::YEplac181-RNR1 TRP1:: YCp22-GDP-NcATP9- MRPL36-39 ρ^+ I ⁰ + LPE10	Este trabalho
α W303 Δ MRPL36/I ⁰ + VARI + RNR1 + MRPL36-39 + MRS2	MAT α ade2-1 trp1-1 his3-1,15 leu2-3,112 ura3-1 mrpl36:: kanMX URA3::pRS316-VARI LEU2::YEplac181-RNR1 TRP1:: YCp22-GDP-NcATP9- MRPL36-39 ρ^+ I ⁰ + MRS2	Este trabalho
α W303 Δ MRPL36/I ⁰ + VARI + RNR1 + MRPL36-40	MAT α ade2-1 trp1-1 his3-1,15 leu2-3,112 ura3-1 mrpl36:: kanMX URA3::pRS316-VARI LEU2::YEplac181-RNR1 TRP1:: YCp22-GDP-NcATP9- MRPL36-40 ρ^+ I ⁰	Este trabalho
α W303 Δ MRPL36/I ⁰ + VARI + RNR1 + MRPL36-66	MAT α ade2-1 trp1-1 his3-1,15 leu2-3,112 ura3-1 mrpl36:: kanMX URA3::pRS316-VARI LEU2::YEplac181-RNR1 TRP1:: YCp22-GDP-NcATP9- MRPL36-66 ρ^+ I ⁰	Este trabalho

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

Tabela 3: Meios de cultura utilizados

Meio	Composição
YPD	1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% glicose
YPEG	1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% glicerol, 2% etanol
YPGal	1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% galactose

WO	0,17% base nitrogenada, 0,5 sulfato de amônio, 2% glicose, suplementado quando necessário com os requerimentos auxotróficos
LB	1% triptona, 0,5% extrato de levedura, 0,5% NaCl, 0,1% glicose
LA	LB, ampicilina 200µg/ml
Kac	0,5% extrato de levedura, 1% acetato de amônio e 0,05% de glicose

O meio rico YPD sólido foi utilizado para a manutenção das linhagens, para avaliação da capacidade respiratória de leveduras foi utilizado como meio seletivo YPEG sólido, por ser não fermentável. O meio mínimo (WO) suplementado foi empregado para seleção de linhagens de acordo com seus requerimentos auxotróficos (Rose et al. 1990). Em crescimentos bacterianos usou-se o meio Luria-Bertani (LB), acrescido de ampicilina para seleção plasmidial quando necessário. Os meios sólidos foram preparados conforme descrição da tabela 3, seguindo a adição de 2% de ágar bacteriológico.

Os cultivos celulares de *S. cerevisiae* e *E. coli* foram realizados a 30°C e a 37°C, respectivamente, em incubadora sob constante agitação a 180 rpm. As diferentes linhagens de *S. cerevisiae* e *E. coli* foram armazenadas em meio YPD líquido contendo glicerol 20% e estocadas à -80°C.

Mutantes diplóides foram esporulados em meio KAc e após a dissecação de suas tétrades, foram selecionados em meio mínimo respeitando a marca de seleção conferida pelos genes repórteres inicialmente utilizados para construir os mutantes simples, como também observando-se a segregação Mendeliana das marcas em heterozigose conhecidas.

5.3 Identificação das extensões mitocôndria-específica

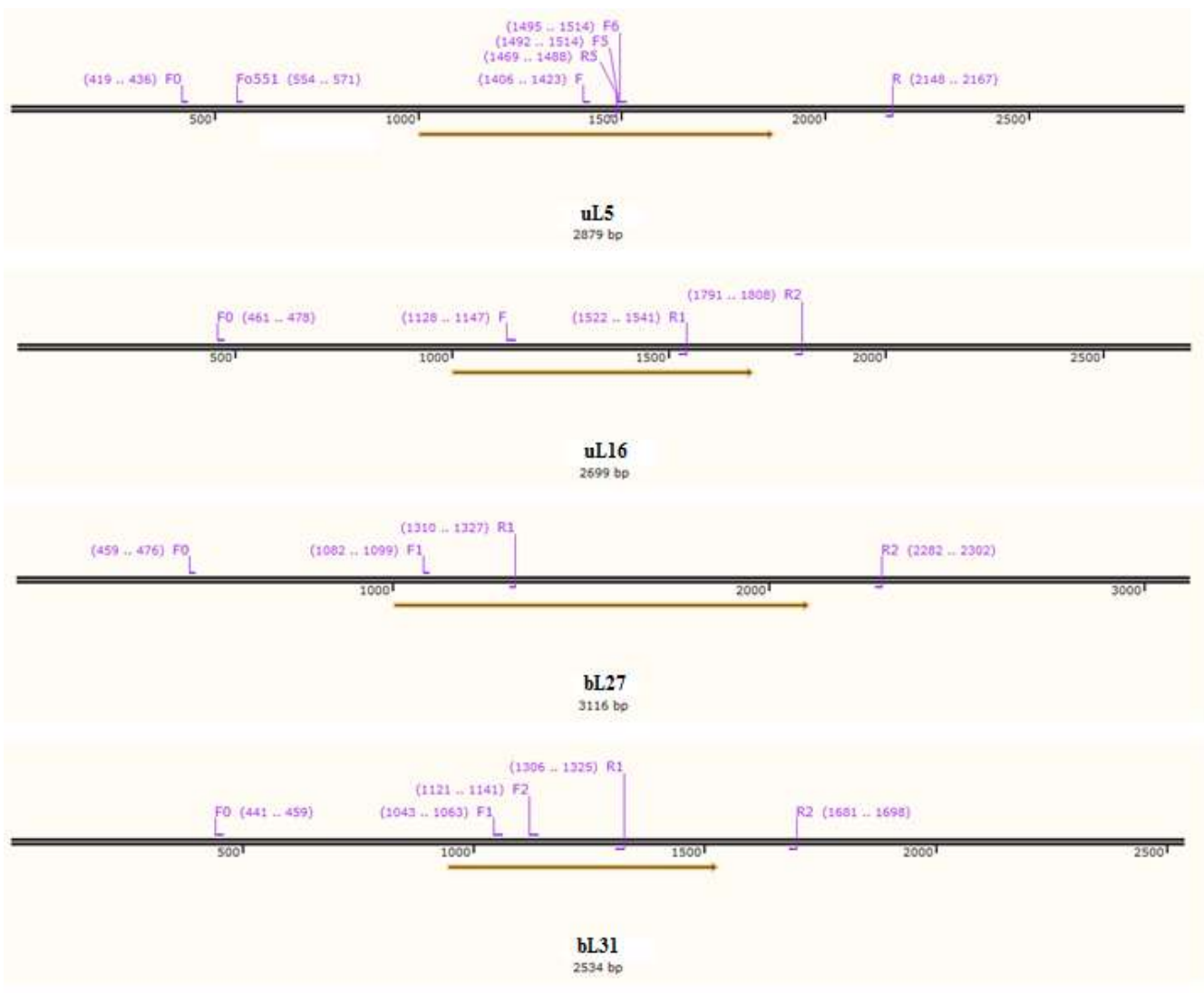
A maioria das proteínas do mitorribossomos que possuem homólogos bacterianos contém extensões únicas em suas regiões N- e C- terminais. Curiosamente, essas extensões raramente guardam conservação em comprimento, sequência ou estrutura entre os mitorribossomos (Desai et al., 2017).

A fim de melhor compreender a funcionalidade destas extensões, foram construídas variantes alélicas removendo as regiões N- e/ou C- terminais para os seguintes constituintes da protuberância central (CP) da subunidade maior (54S) do mitorribossomo: uL5, uL16, bL27 e bL31.

Inicialmente, os genes de interesse foram amplificados por reações de PCR, e os fragmentos resultantes ligados em vetores de clonagem. Para isso, identificaram-se as extensões proteicas presentes em *S. cerevisiae* e ausentes *E. coli* através de alinhamentos feitos utilizando as ferramentas online Clustal Ômega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) e Box Shade (https://embnet.vital-it.ch/software/BOX_form.html), obtendo as sequências gênicas de *S. cerevisiae* na base de dados SGD (<https://www.yeastgenome.org/>) e *E. coli* pela Uniprot (<https://www.uniprot.org/>).

5.4 Sequência de iniciadores

Os iniciadores estão descritos no anexo 1, e foram utilizados em reações de PCR para amplificação dos segmentos gênicos de interesse, a figura 4 mostra as regiões de alinhamento



dos respectivos iniciadores desenhados com os genes estudados.

Figura 3: Posicionamento dos iniciadores desenhados para cada gene. O esquema indica a posição de anelamento dos iniciadores descritos na tabela 4 nos respectivos genes. As setas amarelas indicam a região codificadora de cada gene.

5.5 Construção de variantes alélicas

Posteriormente digeridas com enzimas de restrição, foram corridas em gel de agarose, recuperando o DNA por eletroeluição. As reações de ligação seguiram de acordo às metodologias descritas por Sambrook et al. (1989). Os fragmentos gênicos amplificados através de reações de PCR, foram clonados no vetore YIp349 (McStay et al., 2013), utilizado para transformar os respectivos mutantes nulos de cada gene, descritos na tabela 4.

Tabela 4: Descrição das variantes alélicas

	Iniciadores		Enzimas de Restrição		Plasmídeo para clonagem	Propriedade da construção
pMRPL7/7	F	R1	<i>Bam</i> HI	<i>Pst</i> I	YCp22-NcATP9	A fusão inicia em G136
pMRPL7/F5	F0	R5	<i>Bam</i> HI	<i>Mfe</i> I	YIp349	Troca Q164 por A164
	R	F5	<i>Mfe</i> I	<i>Pst</i> I		
pMRPL7/F6	F0	R5	<i>Bam</i> HI	<i>Mfe</i> I	YIp349	Troca Q164 e Q165 por A164 e A165
	R	F6	<i>Mfe</i> I	<i>Pst</i> I		
pMRPL7/56	F0	R2	<i>Bam</i> HI	<i>Pst</i> I	YCp22-NcATP9	WT MRPL7
pMRPL7/86	F1	R2	<i>Bam</i> HI	<i>Pst</i> I	YCp22-NcATP9	A fusão inicia em K20
pMRPL16/8	F	R1	<i>Bam</i> HI	<i>Pst</i> I	YCp22-NcATP9	A fusão inicia em R44 e termina em S180
pMRPL16/9	F	R2	<i>Bam</i> HI	<i>Pst</i> I	YCp22-NcATP9	A fusão inicia em R44
pMRPL16/60	F0	R2	<i>Bcl</i> I	<i>Pst</i> I	YCp22-NcATP9	WT MRPL16
pMRP7/25	F1	R1	<i>Bcl</i> I	<i>Nsi</i> I	YCp22-NcATP9	A fusão inicia em A28 e termina em V109
pMRP7/26	F	R2	<i>Bcl</i> I	<i>Nsi</i> I	YCp22-NcATP9	A fusão inicia em A28
pMRP7/51	F0	R2	<i>Bcl</i> I	<i>Nsi</i> I	YCp22-NcATP9	WT MRP7
pMRPL36/37	F1	R1	<i>Bcl</i> I	<i>Pst</i> I	YCp22-NcATP9	A fusão inicia em Y15 e termina em L108

pMRPL36/38	F1	R2	<i>BclI</i>	<i>PstI</i>	YCp22-NcATP9	A fusão inicia em Y15
pMRPL36/39	F2	R1	<i>BclI</i>	<i>PstI</i>	YCp22-NcATP9	A fusão inicia em I40 e termina em L108
pMRPL36/40	F2	R2	<i>BclI</i>	<i>PstI</i>	YCp22-NcATP9	A fusão inicia em I40
pMRPL36/66	F0	R2	<i>BclI</i>	<i>PstI</i>	YCp22-NcATP9	<i>WT MRPL36</i>

Nas construções em que a sequência promotora endógena de cada gene foi conservada (construções com os primers F0), utilizou-se o vetor YIp349. Para as demais, foi utilizado o vetor YCp22-GDP-NcATP9, que apresenta região regulada por promotor forte (GDP – Mumberg et al., (1995) e a sequência de endereçamento mitocondrial da proteína Atp9 de *Neurospora crassa*, garantindo que a proteína fosse expressa e transportada para a mitocôndria.

Posteriormente às construções, realizou-se a preparação de bactérias competentes e a transformação de *E. coli* com DNA exógeno pelo método CaCl₂ (Sambrook et al., 1989), para minipreparações de DNA plasmidial foi utilizado o conjunto de reagentes Pure Yield™ Mini-Prep system da Promega. Após a confirmação e verificação por sequenciamento de Sanger, procedeu com preparações de DNA plasmidial em média escala para fins de transformação de levedura, seguindo o método de lise por Triton (Ausubel et al., 1989) e a transformação de *S. cerevisiae*, feita pelo método LiAc descrito em Schiestl et al (1989). As linhagens contendo os mutantes nulos foram gentilmente fornecidas pelo colaborador deste projeto Dr. Antoni Barrientos da Universidade de Miami.

5.6 Conservação de resíduos e análise de correlação

As sequências primárias das proteínas uL5, uL16, bL27 e bL31 foram obtidas a partir da base de dados SGD (<https://www.yeastgenome.org/>) depois utilizadas como dados de entrada para obtenção dos alinhamentos das respectivas famílias no Pfam (<https://pfam.xfam.org/>). Em ambos os *softwares* utilizados as sequências foram filtradas por tamanho para eliminação de fragmentos sem o mínimo de 80% de cobertura em relação à sequência de referência, restringindo a identidade mínima em 20% e, para eliminação de redundância, aplicou-se um filtro de identidade máxima: para qualquer par de sequências com mais de 80% de identidade, uma delas é eliminada, preferencialmente a de menor tamanho.

O alinhamento final foi utilizado para determinar a frequência dos resíduos conservados e os correlacionados. Em um experimento de perturbação estatística, utilizando os *softwares* CONAN e PFstats, identificou-se os resíduos correlacionados. Primeiramente, fixou-se um dado aminoácido na posição “i” do alinhamento e construiu-se um subalinhamento, contendo o mesmo resíduo em posição equivalente (figura 5). Em seguida, calculou-se a distribuição dos resíduos de aminoácidos em todas as demais posições do alinhamento. Quando a frequência de um resíduo em uma posição “j” do subalinhamento aumenta ou diminui, diz-se que as posições “i” e “j” estão acopladas.

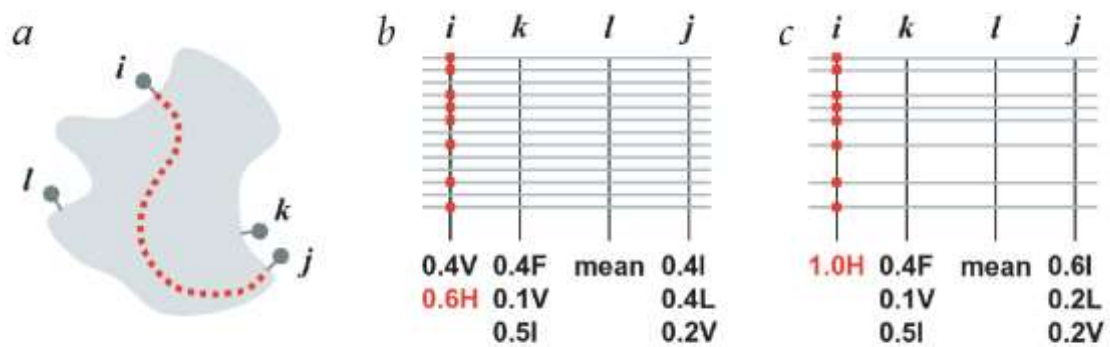


Figura 5: Método de perturbação estatística para medir interações entre resíduos proteicos. A) Proteína hipotética, com posições i, j, k e l; B) Alinhamento múltiplo de sequências e seus resíduos conservados. C) Alinhamento múltiplo sequências após a fixação de histidina na posição i. É demonstrado que: (I) l não contribui para estrutura ou função da proteína, porém, i, j e k contribuem de certa forma, (II) i e k agem independentemente um do outro e i e j agem cooperativamente. Com isso, l é energeticamente sem valor, i e k são energeticamente aditivos e i e j são energeticamente acoplados (BLEICHER, 2011).

O produto do experimento de perturbação estatística é uma matriz de auto-correlação que representa as frequências dos aminoácidos nas posições “j” do subalinhamento comparadas à frequência no alinhamento completo, para um aminoácido fixado em todas posições “i” possíveis (no anexo 6 exemplificado pelos resultados de uL5).

Por fim, o *software* utiliza a matriz de autocorrelação para construir uma rede de resíduos de aminoácidos correlacionados e determinar comunidades que estão mais

conectadas entre si que os demais membros da rede.

5.7 *Ensaio de crescimento com diluição seriada*

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

5.8 *Marcação de proteínas codificadas pelo DNA mitocondrial*

A avaliação da capacidade de síntese das proteínas mitocondriais se dá a partir de linhagens cultivadas em 8mL de meio rico YPGal por 16 horas a 30°C sob agitação de 150rpm. Após esse período as células são centrifugadas e lavadas com água e reinoculadas para novo crescimento em 8mL de meio mínimo WO contendo galactose como fonte de carbono por duas horas a 30°C sob agitação de 150rpm. A cultura de células tem sua absorbância a 600nm ajustada para 3 e 0,5mL dessa cultura é tratada com cicloheximida (10µl de solução 7 mg/mL) por 10 minutos para inativação da síntese proteica citossólica, e na sequência são adicionados 5µl de 2mCi ³⁵S metionina/cisteína, o qual é incubado por 12 minutos a temperatura ambiente. A reação de marcação é interrompida após centrifugação da células e sua suspensão em tampão de lise e a adição de metionina/cisteína não marcada, o conjunto de proteínas é precipitado pela adição de 1 volume de 50% TCA e centrifugação. As proteínas são lavadas com água e suspensas em 45 µl de tampão de Laemmli (1970) e separadas por eletroforese em gel 12,5% acrilamida 6M Urea. Após a eletroforese as proteínas são transferidas para membrana de nitrocelulose por 1,5 horas a 200mA. A membrana é corada com Ponceau 2% para checagem da eficácia da transferência, seca a 60°C por 1hora e finalmente exposta a filme de raio X para detecção dos produtos mitocondriais radioativamente marcados.

6 RESULTADOS

Os componentes proteicos conservados da protuberância central contendo extensões específicas mitocondriais foram expressos como diferentes variantes alélicas a fim de avaliar as propriedades funcionais dessas extensões. Assim, as extensões de uL5,

uL16, bL27 e bL31 foram avaliadas inicialmente com relação as suas propriedades de interação com outras subunidades do mitorribossomo.

4.1 Identificação das regiões mitocôndria-específica e análise estrutural

4.1.1 uL5

Através do alinhamento de uL5 com o homólogo bacteriano L5 é possível identificar a região N-terminal mitocôndria-específica que se estende até P136. Dentro dessa região ainda se encontra a porção de uL5 responsável pelo seu endereçamento mitocondrial que é identificada com os 19 primeiros resíduos (P19) (Figura 6A)

Baseando-se na estrutura do mitorribossomo (PDB 5MRC) a região N-terminal mitocôndria-específica de uL5 interage ao menos com 11 bases do 21S rRNA nos resíduos K20, K37, S41, F44, Q98, R99, Y107, N110, Q122, L123, D125, e com seis diferentes proteínas: uL16, bL27, bL31, mL38, mL40, mL46, todos componentes da protuberância central, sendo a única extensão mitocôndria-específica dentre todas estudadas neste trabalho que apresenta tal gama de interações com os demais componentes da protuberância central (Figura 6B). Nominalmente, W101, G103 e H108 interagem com Y204, F203 e Y204 da região mitocôndria-específica de uL16; já S24 com R70 de bL27; K60 com A40 de bL31; H30 e D36 com mL38 de; Y86 e H88 com E99 e N118 de mL40; e finalmente T64, D71, S79 e D80 respectivamente com S53, S39, K233 e K233 de mL46. Esse conjunto de interações sugerem um papel estrutural de extrema relevância para essa região de uL5 na organização da protuberância central.

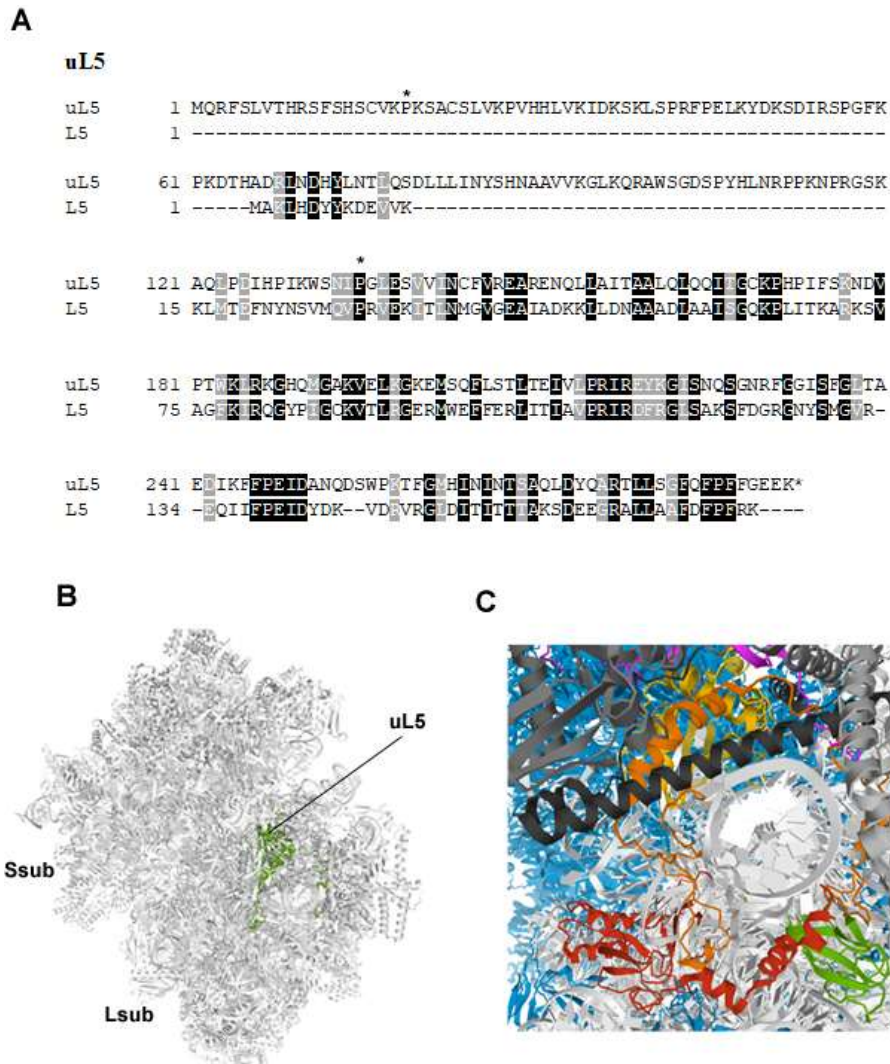


Figura 6 – Proteína uL5 da protuberância central do mitorribossomo. **A)** Alinhamento da sequência de aminoácidos da uL5 de levedura com a L5 de *E. coli*, realizado através do programa clustaw, seguido do programa box-shade (ver métodos) para realce dos resíduos idênticos (em preto) e os similares (cinza), os asteriscos posicionados nas posições P19 e P136 delimitam a região mitocôndria-específica presente na proteína madura de uL5 **B)** Destaque a proteína uL5 na subunidade maior (Lsub) do mitorribossomo. **C)** Detalhe da proteína uL5 em amarelo e laranja na protuberância central. A parte amarela indica a região conservada com bactéria e a laranja a região mitocôndria-específica. Em branco: 21S rRNA, cinza claro: mL38, cinza: mL46, cinza escuro: mL40, vermelho: uL16, rosa: bL31, verde: bL27. Esquemas baseados na estrutura PDB 5MRC.

4.1.2 uL16

O alinhamento de uL16 com o homólogo bacteriano L16 revela porções mitocôndria-específicas na parte N-terminal como na C-terminal (Figura 7A). Na porção N-terminal os 38 primeiros resíduos não estão presentes na proteína madura sendo provavelmente processados no transporte da proteína para a mitocôndria. Resta, assim, na proteína uL16 madura uma sequência mitocôndria-específica de 24 resíduos na porção N-terminal, e na porção C-terminal uma sequência mitocôndria específica de 52 resíduos.

Com base na estrutura (PDB 5MRC) fez-se a análise de interações de uL16 com outros componentes do mitorribossomo. A proteína uL16 madura inicia com o resíduo K38 seguido de resíduos mitocôndria-específico internalizados e ricos em resíduos ácidos, com oito interações com 21S rRNA nas posições K38, H39, R44, K46, Q49, K50, K53, R55. Já a extensão C-terminal mitocôndria-específico está mais exposta na estrutura do mitorribossomo (Figura 7B), apresentando associações com 21S rRNA nas posições R186 e R230; com a proteína uL5 duas interações de F203 e Y204 respectivamente com G103 e H108 de uL5. E finalmente cinco interações com a região conservada de bL27, havendo associação dos resíduos de uL16: N217, S221, Y226, e R232 respectivamente com P99, P102, F100, e novamente F100 de bL27. O resíduo F229 de uL16 interage com F122 da parte mitocôndria-específico de bL27.

A

uL16

```

uL16      1 MFPYLTRMNLISIKMGGLTLKESSFNALNNTTIARRFKHEYA*RFKIVQKKQKGRVFPRT
L16      1 -----MLQ*RTKFRKMH----KGN

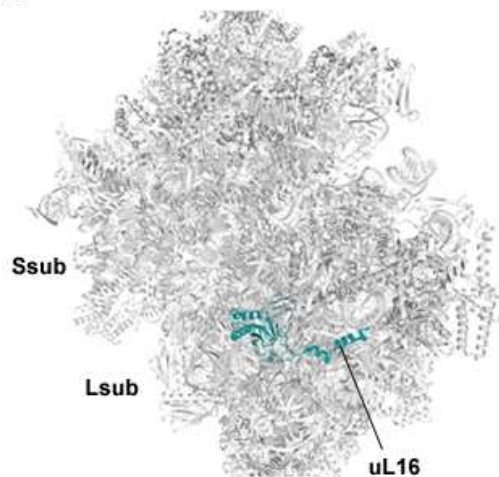
uL16      61 GCSIK*G*STIQFCK*GL*LKSEGI*RS*ACQ*KEADNA*MR*Y*WRPLN*GH*WR*CTNVA*G
L16      18 RGLACG*D*SEFGS*GL*AVGRGR*--*ARQ*EAARRA*TRAV*--*KR*G*TW*RW*FPDKP*IT

uL16     121 IKGNET*RMGK*GK*GF*HW*VR*PT*CK*LE*IN*DD*HK*AREAF*PA*TK*LE*GVYE*EVS
L16      75 EKPLAV*RMGK*GK*GNV*Y*W*AL*QF*CK*LE*E*DC*--*P*E*AREAF*LA*AK*LE*IKIT*EVI

uL16     181 LDS*VRVGLH*SFKNPKDD*PVKNFYDENAKKPSK*YLNILKSQEPQYK*LFGR*
L16     133 KTV*-----

```

B



C

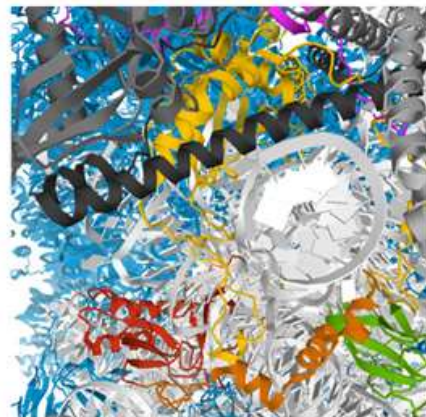


Figura 7 – Proteína uL16 da protuberância central do mitorribossomo. **A)** Alinhamento da sequência de aminoácidos da uL16 de levedura com a L16 de *E. coli*, realizado através do programa clustaw, seguido do programa box-shade (ver métodos) para realce dos resíduos idênticos (em preto) e os similares (cinza), os asteriscos posicionados nas posições K38 e P136 delimitam a região mitocôndria-específica presente na proteína madura de uL5. **B)** Destaque da proteína uL16 na subunidade maior do mitorribossomo. **C)** Detalhe da proteína uL16 em vermelho e laranja na protuberância central. A parte vermelha indica a região conservada com bactéria e a laranja as regiões mitocôndria-específica. Em branco: 21S rRNA, cinza claro: mL38, cinza: mL46, cinza escuro: mL40, amarelo: uL5, rosa: bL31, verde: bL27. Esquemas baseados na estrutura PDB 5MRC.

4.1.3 bL27

A análise de alinhamento de bL27 com seu homólogo bacteriano L27 permite a identificação de uma porção C-terminal mitocôndria-específica presente na bL27 madura. A sequência N-terminal de bL27 que não encontra homologia com a L27 bacteriana não está presente na proteína madura, devendo ser portanto uma sequência de endereçamento para a mitocôndria.

Avaliando a estrutura do mitorribossomo (PDB 5MRC) percebe-se que a extensão C-terminal mitocôndria-específica de uL16 apresenta interação mais próxima com bL27, que apresenta uma longa extensão C-terminal mitocôndria específica (Figura 8A). Dentre todas as extensões mitocôndria-específica do mitorribossomo as extensões presentes em uL17 e bL27 são as únicas a formarem domínios compactos estruturados (Amunts et al., 2014). Além das já descritas interações com uL16, o C-terminal de bL27 também interage com 21S rRNA em 15 diferentes posições, e com outros componentes da protuberância central tais como uL5, mL38 e mL46. Com uL5 uma única posição (H121-H30) e com mL46 (2 posições: R348 e F350 ambos com W94 de mL46) também interage, mL38 mais intimamente em ao menos 14 posições (F122, T125, R127, R128, F129, R131(3x), F132, C134, E143, S146, G208, R232)

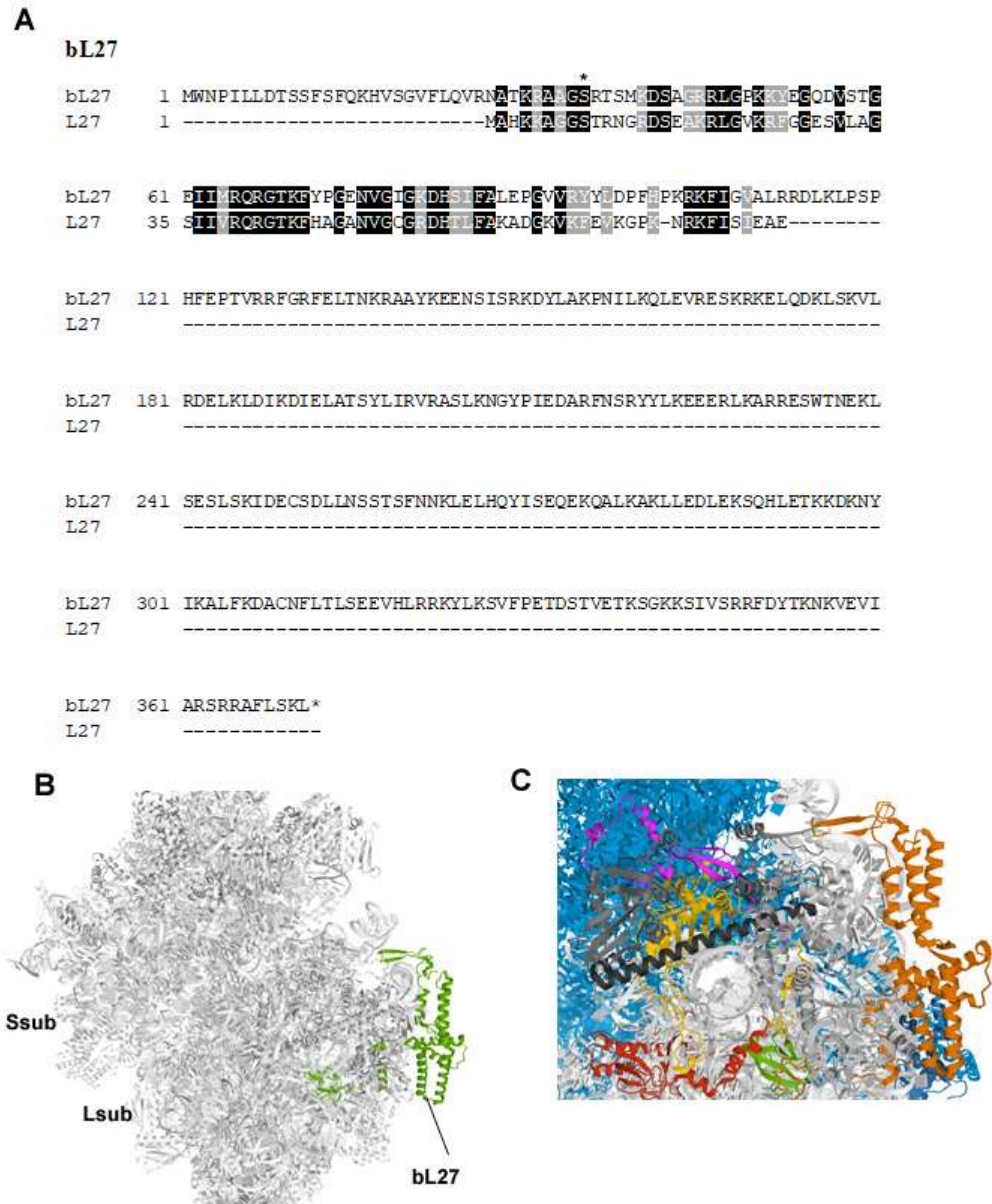


Figura 8 – Proteína bL27 da protuberância central do mitorribossomo. **A)** Alinhamento da sequência de aminoácidos da bL27 de levedura com a L27 de *E. coli*, realizado através do programa clustaw, seguido do programa box-shade (ver métodos) para realce dos resíduos idênticos (em preto) e os similares (cinza). O asterisco posicionado na posição S35 indica o início da proteína madura. **B)** Destaque da proteína bL27 na subunidade maior (Lsub) do mitorribossomo. **C)** Detalhe da proteína bL27 em verde e laranja na protuberância central. A parte verde indica a região conservada com bactéria e a laranja a região mitocôndria-específica. Em branco: 21S rRNA, cinza claro: mL38, cinza:

mL46, cinza escuro: mL40, amarelo: uL5, vermelho: uL16, rosa: bL31. Esquemas baseados na estrutura PDB 5MRC.

4.1.4 bL31

A análise de alinhamento de bL31 com seu homólogo bacteriano L31 permite a identificação de uma porção C-terminal mitocôndria-específica presente na bL31 madura de 73 resíduos. A sequência N-terminal de bL31 apresenta os 15 primeiros resíduos não presentes na proteína madura indicando seu envolvimento no endereçamento de bL31 a mitocôndria. Os outros 26 resíduos na porção N-terminal que não encontram homologia com a L31 bacteriana constitui também uma região mitocôndria-específica.

Novamente com base na estrutura do mitorribossomo fez-se a análise de interações das regiões mitocôndria específica de bL31. A porção N-terminal apresenta uma íntima relação com a protuberância central estando mergulhada na estrutura do mitorribossomo (Figura 9B). Observam-se várias interações desse segmento com componentes da protuberância central, tais como: uL5 (4 interações bL31-uL5: R21 com A149 e R150, e I22-Q153 e A40-L60), bL33 (1 interação R27-T68) e com 21S rRNA sete interações (L24, R26, R27, K30, K31, Q33, R38). Já a sequência mitocôndria-específica na parte C-terminal se afasta da protuberância central e só se nota uma interação com a proteína uS19 da subunidade menor do mitorribossomo.

4.2 Análises de bioinformática de conservação e co-evolução

A fim de melhor entender a evolução das proteínas formadoras da protuberância central do mitorribossomo realizou-se estudos de comunidades de aminoácidos, os quais podem revelar a existência de subclasses funcionais de uma dada família de proteínas (Bleicher; Lemke; Garratt, 2011).

A maioria dos aminoácidos de uma proteína pode passar por mutações aleatórias sem alterações nas funções da mesma, sendo apenas alguns poucos sítios sob uma restrição evolucionária mais rigorosa, refletindo uma maior conservação de propriedades de sequência e estrutural (Kimura, 1983). Análises de conservação identificam os resíduos de maior frequência em posições específicas nas colunas do alinhamento, indicando prováveis candidatos a análises funcionais, permitindo definir os elementos principais na estrutura e função de famílias de proteínas.

Outra maneira de identificar resíduos essenciais para a função de uma proteína é a análise de coevolução de resíduos, sendo DRCN (Decomposição de Redes de Coevolução de Resíduos) um desses métodos (Bleicher, 2011). Essa ferramenta possibilita analisar famílias de proteínas representadas por alinhamentos múltiplos de sequências e obtém determinantes de sub-classes funcionais (Fonseca-Júnior et al., 2018). O alinhamento múltiplo de sequências é realizado com três ou mais sequências primárias que possuem um ancestral comum. Resíduos de importância estrutural e funcional para a proteína, uma vez que nenhuma mudança foi permitida nessas posições durante o processo evolutivo, podem ser observados em posições completamente conservadas ou não (Bleicher, 2011).

Análises de co-evolução entre resíduos de uma mesma proteína podem ser realizadas através do PFstats, que é um conjunto de programas e algoritmos dedicados a analisar as famílias de proteínas usando estatísticas simples, sua única entrada obrigatória é um alinhamento múltiplo de sequências no formato PFAM.

A análise realizada pelo PFstats para uL5 não demonstrou resultados relevantes que indicassem possíveis candidatos à mutações, como visto no anexo 6 disponível, nenhum resíduo aumentou sua frequência significativamente ao ser correlacionado com outro.

O *software* CONAN (Fonseca-Júnior et al., 2018; Bleicher, 2011) analisa uma rede de co-variação de resíduos com o objetivo de enfatizar restrições co-evolutivas locais e,

consequentemente, detectar sítios relacionados com especificidade determinante e funcional. Como essa metodologia trabalha com grandes alinhamentos múltiplos de sequências, incluindo sequências não anotadas, ela possui uma etapa de pré-processamento muito importante, na qual fragmentos e sequências com alta identidade são removidos. Também é possível filtrar resíduos por frequência, resíduos com uma frequência muito baixa não possuem amostragem suficiente para passar no teste de aleatoriedade e, portanto, podem ser descartados. Em contraste, resíduos extremamente conservados são fáceis de detectar e, portanto, também poderiam ser descartados.

O programa aplica ao alinhamento múltiplo de sequências filtros de cobertura de sequência, redundância, identidade mínima e máxima. O alinhamento resultante é utilizado no experimento de perturbação estatística e gera uma matriz contendo as correlações entre os pares de resíduos da proteína. PFstats determina os resíduos mais conservados e ilustra a rede de comunidades de resíduos que coevoluíram. O conjunto dessas informações pode ser utilizado para mutações sítio-dirigidas (Fonseca-Júnior et al., 2018).

Utilizando o *software* CONAN para análises de conservação de resíduos e correlação, apenas em uL5 (PF00281) foi possível detectar comunidades de resíduos co-evolucionados (figura 10). Curiosamente, tais comunidades praticamente só ocorrem nesta proteína do mitorribossomo, enquanto as comunidades em comum das outras classes (ribossomos citoplasmáticos e procariotos) não estão presentes. A partir deste resultado, identificou-se na sequência o resíduo conservado (Q164 em *S. cerevisiae*) e comparou-se a posição em uL5 de *E. coli*, onde foram observados resíduos distintos do alinhamento de *S. cerevisiae*.

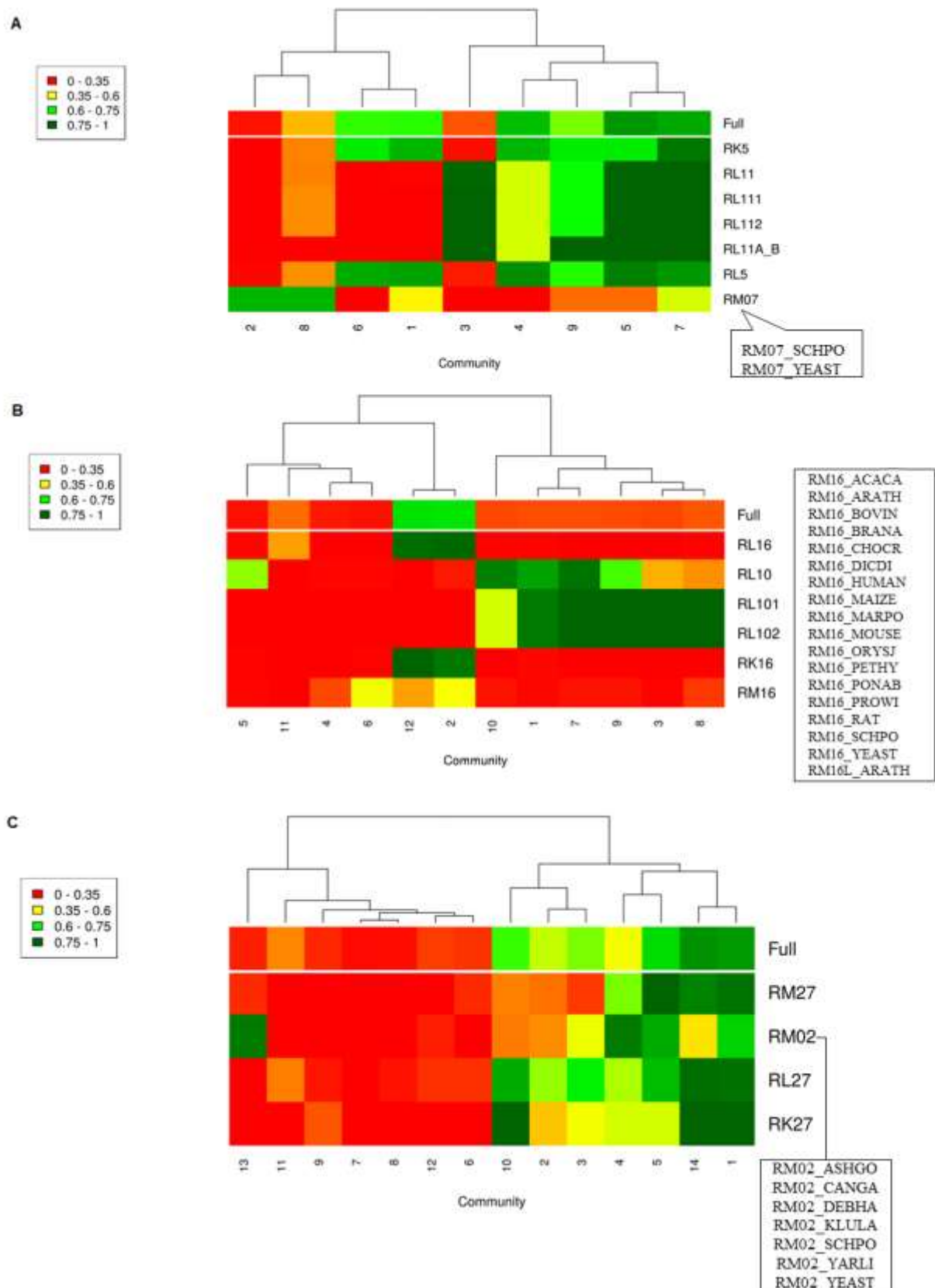


Figura 10: Gráfico da interpretação do *software* CONAN, onde no eixo X representa-se as comunidades dos resíduos e no eixo Y as classes dos organismos analisados, sendo classificados em escala de cor do verde escuro (75 – 100% de conservação) ao vermelho (0 – 35% de conservação). **A)** Análise de conservação de uL5 e seus homólogos do citossol,

bactéria e cloroplasto conforme indicado. **B)** Análise uL16 e seus homólogos do citossol, bactéria e cloroplasto conforme indicado. **C)** Análise de bL27 e seus homólogos do citossol, bactéria e cloroplasto conforme indicado. Deste, é possível concluir que a comunidade 2 possui características conservadas exclusivas de RM07.



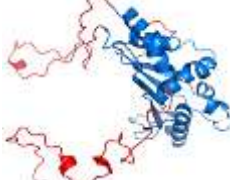





As análises realizadas pelo PFstats e CONAN para uL5 revelam que a comunidade 2, formada pelos resíduos W183, N133 e Q164, e a comunidade 8, resíduo T167, possuem características conservadas exclusivas do mitorribossomo. Já uL16 não apresentou conservação relevante ao grupo de homólogos de mitorribossomo, em bL27 a comunidade 13, formada pelos resíduos G108 e Y96, também se mostrou exclusiva ao mitorribossomo. Não foi possível realizar a análise de PFstats e CONAN para bL31 por conta de um menor número de sequências disponíveis para a segurança das análises de conservação.







Ao comparar os resíduos conservados das comunidades 2 e 8 de uL5 em alinhamento ao de seu homólogo bacteriano L5, percebeu-se que apenas em Q164A ocorre uma troca de resíduo com propriedade química diferente. Já na comunidade 13 de bL27 seu homólogo bacteriano L2 possui resíduos de propriedades químicas diferentes em G108S e Y96E. Futuramente pretende-se estudar a comunidade 13 de bL27 por mutações sítio-dirigidas que permitam a sua avaliação funcional.

4.3. Variantes alélicas obtidas

Através da confecção de oligonucleotídeos específicos, desenhados a partir da identificação de regiões conservadas (Figuras 6 a 9), foram clonados os genes e as respectivas variantes alélicas que excluem as extensões mitocôndria-específicas N- ou C-terminais das proteínas uL5, uL16, bL27 e bL31. Na tabela 5 estão descritos os plasmídeos recombinantes obtidos para cada um dos genes e as respectivas variantes alélicas obtidas nesse trabalho. A tabela também representa o modelo estrutural de cada uma das variantes – em alguns casos a remoção da extensão mitocôndria-específica na porção N-terminal não corresponde exatamente ao total removido da proteína madura. Isto se dá pela remoção da sequência de endereçamento mitocondrial presente na porção N-terminal da maioria das proteínas mitocondriais. Por essa razão, a remoção de resíduos nas variantes truncadas em alguns casos não reflete em mudanças significativas no esquema estrutural.

Tabela 5 – Plasmídeos recombinantes expressando variantes alélicas de uL5, uL16, bL27 e bL31. Estão indicados o plasmídeo base da construção, a região de truncamento N-terminal ou C-terminal e a respectiva quantidade de resíduos removida na respectiva versão alélica. Na coluna de estrutura ilustra-se a representação da estrutura 3D dos mutantes construídos através do *software* PyMOL (PDB 5MRE). Está representada em azul a região conservada da proteína e em vermelho a(s) sequência(s) mitocôndria-específica

Plasmídeo Recombinante	Plasmídeo Base	Região de truncamento	Resíduos removidos	Estrutura
uL5-7	YCp22-NATP9	N C	136 Nenhum	
uL5-56	YIp349	N e C	Nenhum	
uL5-86	YCp22-NATP9	N C	19 Nenhum	
uL16-8	YCp22-NATP9	N C	44 52	
uL16-9	YCp22-NATP9	N C	44 Nenhum	
uL16-60		N e C	Nenhum	
bL27-25	YCp22-NATP9	N C	28 262	
bL27-26	YCp22-NATP9	N C	28 Nenhum	

bL27-51	YIp349	N e C	Nenhum	
bL31-37	YCp22-NATP9	N C	15 73	
bL31-38	YCp22-NATP9	N C	15 40	
bL31-39	YCp22-NATP9	N C	40 73	
bL31-40	YCp22-NATP9	N C	40 Nenhum	
bL31-66	YIp349	N e C	Nenhum	

4.4 Testes biológicos de crescimento e função respiratória

4.4.1 Variantes de uL5

Para a proteína uL5 foram construídas variantes alélicas presentes nos plasmídeos uL5-7, uL5-56 e uL5-86 (Tabela 5). Também com base nos estudos de conservação e co-evolução identificou-se os resíduos Q164 e Q165 de uL5 como altamente conservados, e assim construiu-se os vetores uL5-F5 que realiza a troca Q164A e uL5-F6 com as trocas Q164A e Q165A.

A avaliação das respectivas propriedades de crescimento conferidas pelas novas variantes alélicas foi alcançada através do ensaio com diluição seriada (figura 11). Nota-se que a linhagem contendo a construção uL5-7 foi incapaz de crescer em meio seletivo contendo fontes de carbono não fermentável (YPEG). Nessa construção a região N-

terminal mitocôndria-específica não está presente, indicando sua essencialidade. Já a construção uL5-86 avalia se a sequência de endereçamento mitocondrial endógena pode ser substituída pela sequência de endereçamento de NcATP9, a qual foi utilizada também em uL5-7. Nota-se a competência respiratória do mutante nulo Δ uL5 expressando uL5-86 e assim conclui-se que a versão truncada está corretamente sendo direcionada para a mitocôndria. Conforme discutido anteriormente (Figura 6) a extensão mitocôndria-específica de uL5 interage com todos os outros componentes da protuberância central ocupando um região que no ribossomo bacteriano, estaria o 5S RNA (Brown et al., 2014), o que sugere sua importância estrutural. Já os mutantes pontuais expressos em uL5-F5 e uL5-F6 também recuperaram de forma nítida o crescimento do mutante nulo Δ uL5. Embora extremamente conservados, esses resíduos não são cruciais para a função de uL5 na montagem do mitorribossomo. Conclui-se que a troca do resíduo conservado Q164 e seu adjacente Q165 para A164 e A165, não foram essenciais nos processos de montagem e função do mitorribossomo.

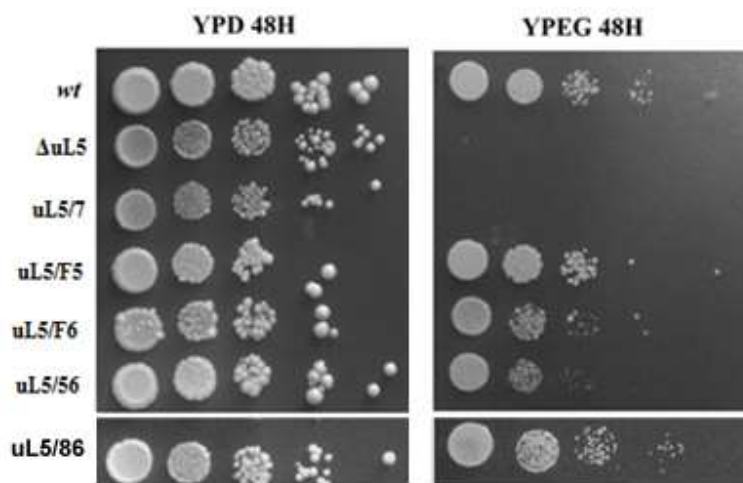


Figura 11: Propriedades de crescimento de mutantes uL5. Teste comparativo de crescimento da linhagem selvagem (*wt*), mutante nulo e as variantes alélicas uL5/7, uL5/F5, uL5/F6 e uL5/56 representadas ao lado em meio rico contendo glicose (YPD) e meio seletivo para a atividade respiratória (YPEG). As placas foram fotografadas 2-3 dias após incubação a 30°C.

De fato, Q164 deve ter algum papel na estabilização de uL5. Através do *software* PyMol (PDB 5MRC) foi verificada as possíveis ligações químicas de Q164 até 4Å de distância (figura 12). Presumiu-se uma interação eletrostática direta com os resíduos Y42 e Q62 na estrutura da proteína bL31, em região precedente à uma folha β (figura 12). Assim como uL5, bL31 compõe um módulo de estabilização formado por proteínas da protuberância central.

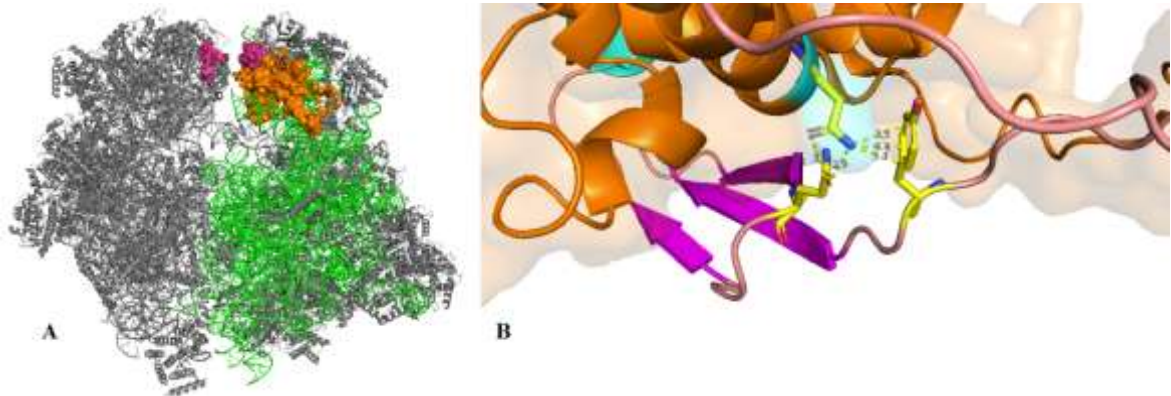


Figura 12: (A) Estrutura 3D do mitorribossomo, onde está representado em verde o 21S RNA na *mtLSU*, em laranja a proteína uL5 e em rosa bL31. (B) Ilustração das interações eletrostáticas próximas ao resíduo Q164 de uL5 (em azul) com Y42 e Q62 em bL31. As figuras foram feitas através do *software* PyMOL utilizando o PDB 5MRC.

4.4.2 Variantes de uL16

Para a proteína uL16 construiu-se três variantes alélicas (tabela 5), a primeira abole os 44 primeiros aminoácidos N-terminal e os 52 últimos da extensão mitocôndria-específica C-terminal (uL16-8), o segundo exclui somente os 52 resíduos da extensão mitocôndria-específica C-terminal (uL16-9) e uma terceira que preserva a sequência do tipo selvagem nomeada uL16-60.

Observa-se pelo teste comparativo de crescimento (figura 13), que a remoção da porção C-terminal mitocôndria-específica em uL16-8 o torna incapaz de restaurar o crescimento em meio seletivo para a atividade respiratória (YPEG). A variante alélica *uL16-9* permitiu avaliar que os seis primeiros resíduos da parte N-terminal da proteína madura não são essenciais para a função de uL16 na montagem do mitorribossomo ao recuperar o crescimento do mutante nulo de Δ uL16 no meio seletivo para a atividade

respiratória. Embora 44 resíduos da parte N-terminal terem sido removidos nessa construção, os 38 primeiros devem fazer parte da sequência de endereçamento mitocondrial, assim são normalmente processados e não fazem parte da proteína madura. A construção uL16-60 expressa o alelo selvagem de uL16 e portanto é utilizado como controle positivo do experimento. Nota-se que a sequência mitocôndria-específica de uL16 se projeta para o exterior do mitorribossomo, apresenta mais íntima relação com bL27 e deve estar envolvida no processo de recrutamento dos fatores de iniciação de tradução mIF2, mIF3 (Brown et al., 2014).

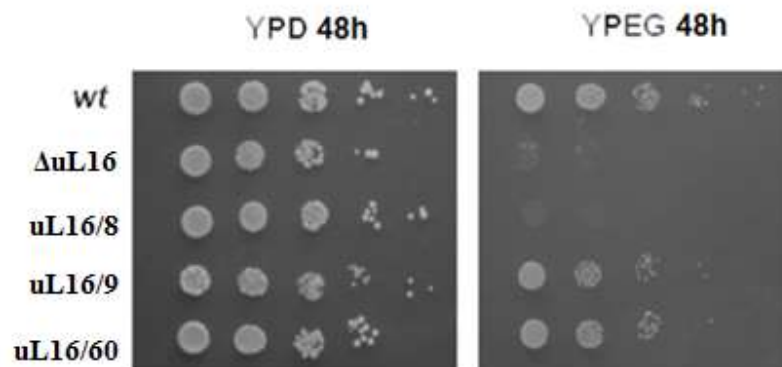


Figura 13: Propriedades de crescimento de mutantes uL16. Teste comparativo de crescimento da linhagem selvagem (*wt*) e mutantes uL16 contendo as variantes alélicas uL16/8, uL16/9 e uL16/60 representadas ao lado em meio rico contendo glicose (YPD) e meio seletivo para a atividade respiratória (YPEG). As placas foram fotografadas 2-3 dias após incubação a 30°C.

4.4.3 Variantes de bL27

Para o gene *bL27* construiu-se três variantes alélicas (tabela 5), a primeira remove 28 aminoácidos N-terminal e 262 da sequência mitocôndria-específica C-terminal (bL27-25), a segunda abole apenas os 28 resíduos da extensão N-terminal (bL27-26) e nesse caso corresponde à sequência de endereçamento mitocondrial, não participando da formação da proteína madura; a terceira que preserva a sequência do tipo selvagem bL27-51 e foi utilizada como controle positivo.

Ao analisar a capacidade respiratória através do teste fenotípico de crescimento em meio seletivo contendo etanol-glicerol como fontes de carbono não fermentáveis (figura 14), percebe-se que a extensão mitocôndria específica C-terminal removida na construção bL27-25 é essencial para correta função e montagem do mitorribossomo. Já a substituição da sequência endógena de endereçamento mitocondrial de bL27 pela sequência de NcATP9 não afetou o processo de importação da proteína pois a proteína truncada é funcional como verificado na construção bL27-26.

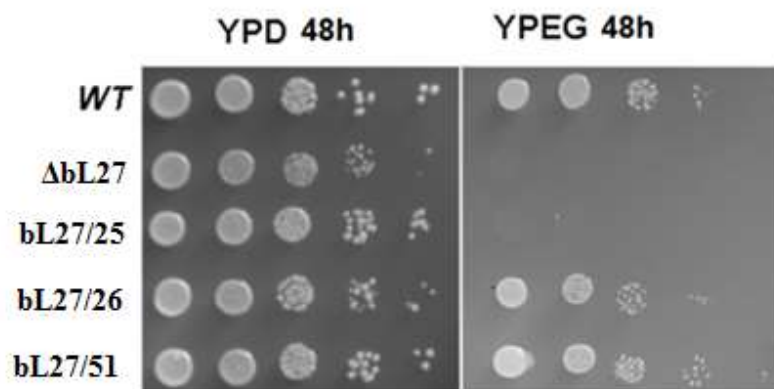


Figura 14: Propriedades de crescimento de mutantes bL27. Teste comparativo de crescimento da linhagem selvagem (*wt*) e mutantes bL27 contendo as variantes alélicas bL27/25, bL27/26 e bL27/51 representadas ao lado em meio rico contendo glicose (YPD) e meio seletivo para a atividade respiratória (YPEG). As placas foram fotografadas 2-3 dias após incubação a 30°C.

A longa sequência mitocôndria-específica de 262 resíduos presentes em bL27 apresenta íntima interação com a proteína mL38 (Figura 8) e forma um conjunto de alfa-helices que se projetam para o exterior do mitorribossomo com provável função regulatória, ou de recrutamento de fatores de tradução.

4.4.4 Variantes de bL31

Para a proteína bL31 construiu-se cinco variantes alélicas (tabela 5): bL31-37 apresenta remoção da sequência de endereçamento mitocondrial N-terminal de 15 resíduos e sequência mitocôndria-específica C-terminal de 73 resíduos; bL31-38 remove os mesmos 15 resíduos do N-terminal, e somente 40 do C-terminal; bL31-39 remove além dos 15 resíduos de endereçamento outros 25 de uma sequência mitocôndria-específica no N-

terminal como também os 73 resíduos mitocôndria-específico do C-terminal; bL31-40 somente remove os 15 + 25 resíduos da porção N-terminal; por fim bL31-66 representa o alelo selvagem intacto.

O teste de crescimento respiratório em meio seletivo contendo fontes de carbono não fermentáveis demonstrou que a extensão mitocôndria-específica C-terminal totalmente removida em bL31-37, bL31-39 é essencial para a montagem do mitorribossomo mas a remoção parcial em bL31-38 produziu um alelo capaz de complementar o mutante nulo de bL31. Fenótipo de recuperação da capacidade respiratória também foi observado na construção bL31-40, que remove 25 resíduos da sequência mitocôndria-específica no N-terminal mas mantém intacto o C-terminal (figura 15). Na análise da estrutura de bL31 nota-se que embora essencial a parte mitocôndria-específica no C-terminal não mantém interações com o restante do mitorribossomo, exceto por uma interação com uma proteína da subunidade menor do mitorribossomo (figura 9), sua essencialidade deve-se portanto a um provável efeito de regulatório ou de posicionamento de tRNA no processo de tradução. Já a parte N-terminal mitocôndria-específica de bL31 apesar de apresentar mais interações (com uL5 e 21S rRNA principalmente) não se mostra essencial.

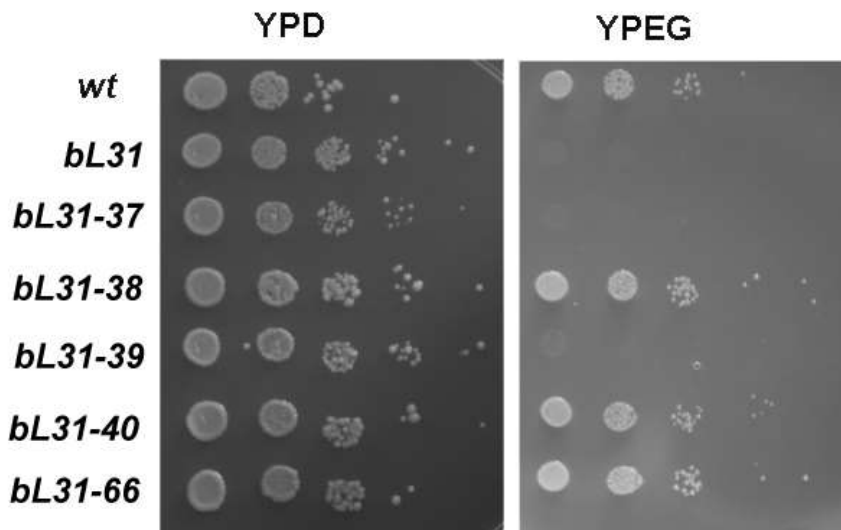


Figura 15: Propriedades de crescimento de mutantes bL31. Teste comparativo de crescimento da linhagem selvagem (*wt*) e mutantes bL31 contendo as variantes alélicas bL31/37, bL31/38, bL31/39, bL31/39, bL31/40 e bL31/66 representadas ao lado em meio rico contendo glicose (YPD) e meio seletivo para a atividade respiratória (YPEG).

4.5 Avaliação da tradução mitocondrial

As proteínas constituintes da protuberância central do mitorribossomo têm papel central no processo de tradução através da ligação ao tRNA, entrada no sítio A, transferência para o sítio P além de provável coordenação com o processo de montagem do complexo relacionado ao polipeptídeo recém sintetizado (Box et al., 2017). A fim de avaliar se as alterações realizadas nas diferentes variantes alélicas aqui construídas afetavam a síntese de proteínas mitocondriais realizou-se o ensaio de marcação radioativa de polipeptídeos recém sintetizados. Uma característica secundária comum entre as linhagens de levedura que apresentam a síntese proteica mitocondrial interrompida é a progressiva perda do DNA mitocondrial da linhagem (Myers et al., 1986). Essa instabilidade do DNA mitocondrial torna mais difícil a avaliação se uma dada mutação afeta diretamente a síntese proteica ou se a ausência de síntese proteica é decorrente da perda de DNA mitocondrial. Para minimizar esse efeito descobriu-se o efeito supressor da super-expressão dos genes *nVARI* e *RNR1* na perda de DNA mitocondrial nessa classe de mutantes (Zeng et al., 2018). Assim os mutantes nulos utilizados nesse trabalho (tabela 2) contêm em sua constituição os plasmídeos supressores, permitindo que ao final dos ensaios pelo menos 15% das células ainda mantivessem DNA mitocondrial.

Assim, as diferentes linhagens geradas e descritas nos testes da capacidade respiratória das variantes das proteínas uL5, uL16, bL27 e bL31 também foram utilizadas em ensaios específicos para avaliação das suas capacidades traducionais. Nesse ensaio, cada linhagem foi cultivada em meio de cultura contendo galactose como fonte de carbono e após 16h de crescimento as células são tratadas com cicloheximida para repressão da síntese proteica citossólica seguida de tratamento com radionuclídeos de ^{35}S metionina-cisteína. Após a marcação radioativa as células são precipitadas e o seu extrato proteico separado em gel de acrilamida-uréia para a separação dos polipeptídeos mitocondriais recém-sintetizados. A figura 16 representa ensaios realizados em caráter qualitativo para as diferentes linhagens, isto é, a avaliação principal aqui é se há ou não tradução mitocondrial nas linhagens estudadas. Devido a interrupção do fornecimento de S^{35} ao laboratório durante o decorrer deste projeto, os ensaios utilizando as linhagens derivadas de bL27 e bL31 foram realizados no laboratório do Dr. Antoni Barrientos na Universidade de Miami – colaborador desse projeto.

Assim, está clara a concordância entre o ensaio de tradução e o testes respiratórios previamente mostrados (Figuras 12 a 15). As linhagens que foram incapazes de crescer no meio seletivo para a atividade respiratória, também mostraram-se incapazes de sintetizar os produtos gênicos mitocondriais, comprovando que a deficiência respiratória observada nos diferentes mutantes construídos é de fato devido a ausência da tradução dos polipeptídeos mitocondriais, função desempenhada pelo mitorribossomo.

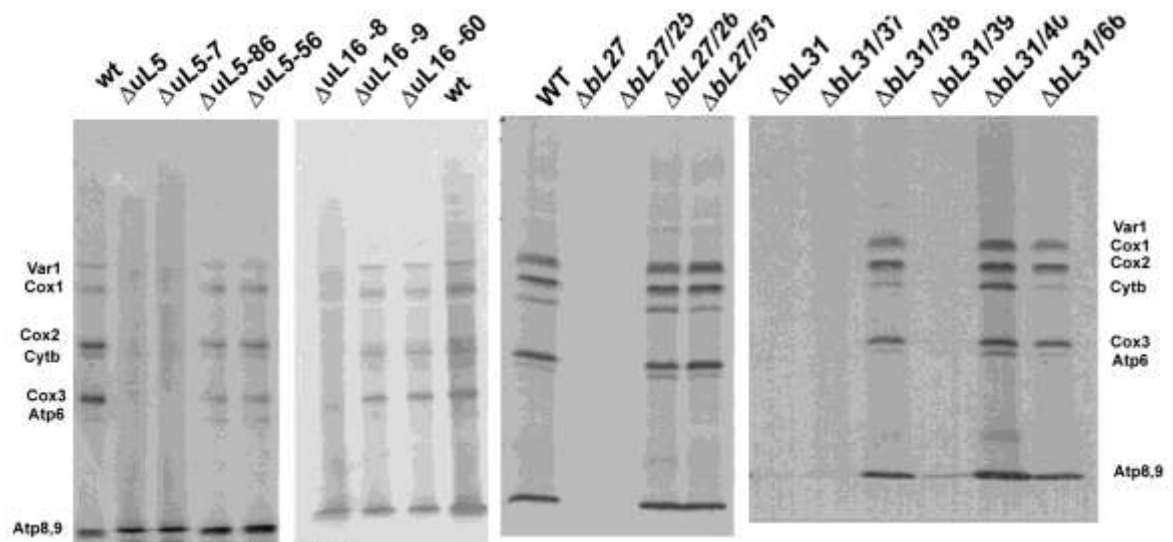


Figura 16 – Análise da tradução dos polipeptídeos mitocondriais. Extratos proteicos de diferentes linhagens expressando as versões truncadas de uL5, uL16, bL27 e bL31, seus respectivos mutantes nulos e a linhagem selvagem (wt) foram separados em gel de 12% acrilamida – 6M ureia, transferido para nitrocelulose, e finalmente exposto a filme de raio X. A posição esperada dos polipeptídeos mitocondriais está indicada ao lado dos painéis à esquerda e à direita.

5- DISCUSSÃO

Os mitorribossomo de animais e fungos se assemelham em diversos aspectos funcionais, e *Saccharomyces cerevisiae* é um organismo modelo extensivamente empregado na elucidação da função de proteínas envolvidas com a montagem do mitorribossomo (Desai et al., 2017; Zeng et al., 2018). Por sua vez, a evolução dos mitorribossomos é um objeto de estudo dos mais interessantes por evidenciar a existência de eventos ocorridos há mais de um bilhão de anos. Também evidencia todo o processo de especialização funcional que vem ocorrendo desde então nos diferentes organismos.

Aqui realizamos comparações evolutivas de quatro proteínas constituintes do mitorribossomo, com ribossomos de bactérias, citossol e cloroplastos. Buscamos a identificação de resíduos que fossem específicos dos mitorribossomo que pudessem indicar mais informações sobre a sua especialização funcional. Dessa forma, encontramos comunidades de resíduos em uL5 e bL31 (Figura 12) que representam essa conservação e serão objeto de estudo futuro para sua devida caracterização. A análise de conservação e agrupamento de comunidades realizada por programas como PfStats (Fonseca-Junior et al., 2018) pode futuramente ser aprimorada para correlação entre duas ou mais proteínas ao mesmo tempo a fim de se estabelecer resíduos de duas proteínas distintas que co-evoluem. No caso do mitorribossomo no qual as proteínas componentes apresentam um íntimo contato estrutural essa tipo de análise seria extremamente informativo.

No processo evolutivo do mitorribossomo chama a atenção a perda do 5S rRNA em fungos e animais, enquanto em plantas e protistas ele se mantém (Brown et al., 2014, Amunts et al., 2014). O 5S rRNA tem papel estrutural fundamental na organização da protuberância central dos ribossomos, no caso do mitorribomo de fungos e animais esse papel foi substituído por proteínas exclusivas do mitorribossomo e extensões proteica mitocôndria-específicas presentes em proteínas conservadas (Amunts et al., 2014). O estudo da importância da especialização funcional gerada por essas extensões mitocôndria-específicas foi o principal direcionador deste trabalho.

Nesse trabalho foram avaliadas 14 variantes alélicas de quatro genes que codificam proteínas componentes da subunidade 54S do mitorribossomo que apresentam homólogos bacterianos e extensões mitocôndria-específica. As quatro proteínas estudadas fazem parte da protuberância central do mitorribossomo.

A protuberância central dos ribossomos bacterianos e citossólicos tem o rRNA 5S como um componente principal. A ausência desse componente nos mitorribossomos dos fungos e animais já indica uma divergência evolutiva importante dessa região do mitorribossomo. Comparativamente com o ribossomo bacteriano a protuberância central dos mitorribossomos encontra-se expandida e mesmo sem contar com rRNA 5S possui um volume cerca de três vezes maior que o presente em bactérias. Esse volume é preenchido por extensões do RNA 21S, pelas proteínas específicas do mitorribossomo: mL38, mL40 e mL46 e das extensões mitocôndria-específicas de uL5, uL16, bL27, bL31 e bL33 (Amunts et al., 2014). A maior extensão física da protuberância central no mitorribossomo confere

a essa região uma maior interação com outros componentes do mitorribossomo, inclusive da subunidade menor como observado pela extensão C-terminal de bL31. O conjunto de interações realizado pelos componentes da protuberância central confere a região um papel regulador central na regulação da síntese proteica mitocondrial, como a fidelidade do processo traducional, e a atividade peptidil-transferase interagindo com tRNA entre os sítios A e P. Além dessas etapas cruciais, a partir da protuberância central a proteína mL38 tem papel na coordenação do processo de tradução com eventos posteriores de inserção e associação de chaperonas necessários para a montagem dos complexos respiratórios (Box et al., 2017). Eventos regulatórios como esse são essenciais para a ótima coordenação da biogênese dos complexos respiratórios mitocondriais e a síntese de novas subunidades pelo mitorribossomo (Seshadri et al., 2020).

Conforme esperado, a remoção da maioria das extensões mitocôndria-específica das proteínas uL5, uL16, bL27 e bL31 se mostrou prejudicial para a atividade traducional do mitorribossomo. Foi realizada a construção de variantes alélicas para bL33, mas os testes de complementação com a variante do tipo de selvagem não complementou o mutante nulo Δ bL33 que dispomos, e por isso essas variantes não constam nesse trabalho. Essencialmente, as extensões mitocôndria-específica das proteínas estudadas interagem unicamente com outras proteínas componentes da protuberância central. A exceção fica com a extensão C-terminal de bL31 cujo prolongamento progride pela superfície do mitorribossomo e chega a interagir com a proteína uS19 da subunidade menor do mitorribossomo.

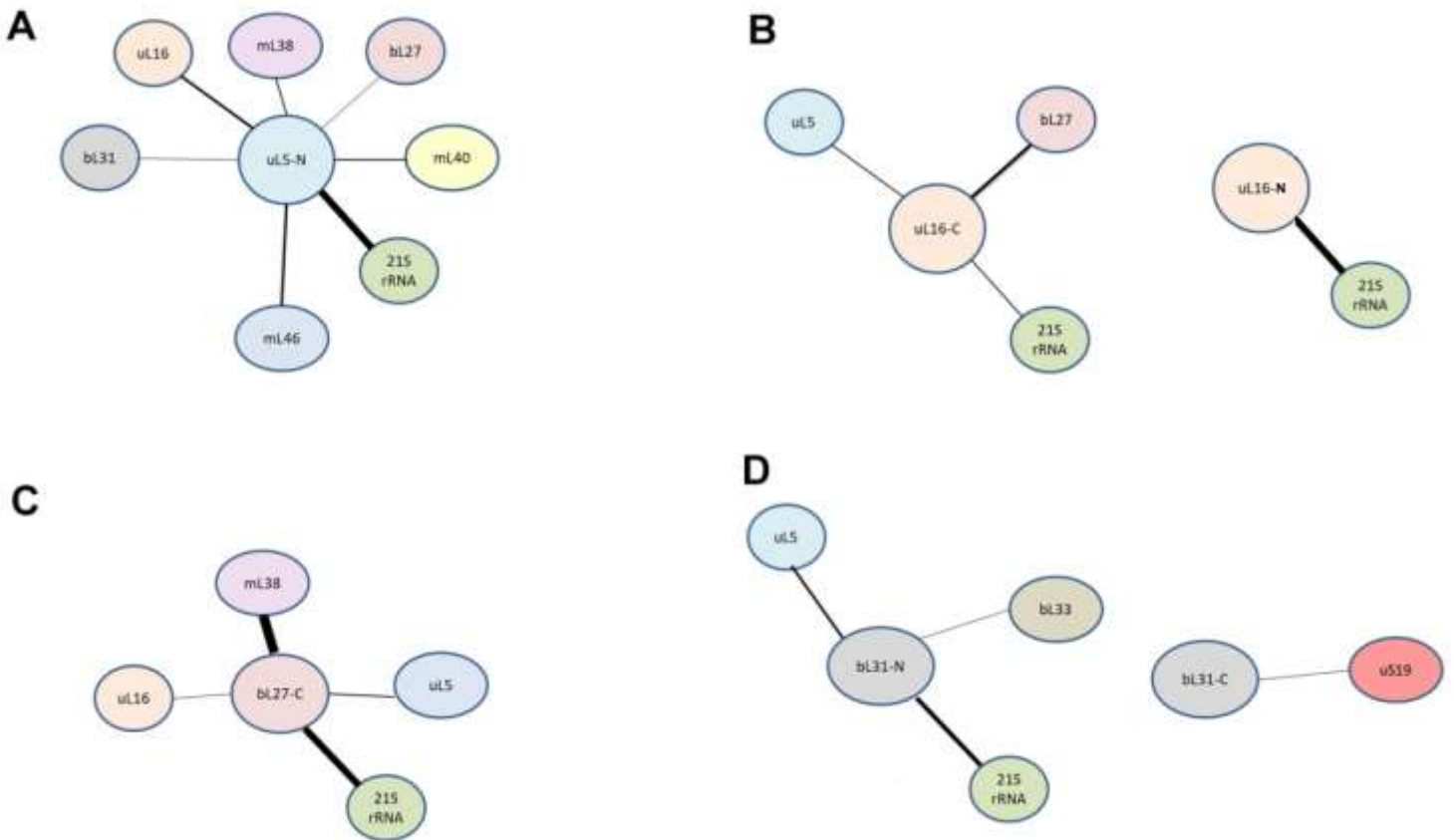


Figura 17 – Rede interações das extensões mitocôndria-específica das proteínas uL5, uL16, bL27 e bL31 baseado na estrutura PDB 5MRC. **A** Interações da extensão N-terminal de uL5 com as seis proteínas indicadas e 21S rRNA. **B** Interações de uL16 N-terminal com 21S rRNA, uL16 C-terminal com uL5, bL27 e 21S rRNA. **C** Interações de bL27 com 21S rRNA, uL16, uL5 e mais fortemente com mI38 (14 interações). **D** Conexões bL31 N-terminal com uL5, bL33 e 21S rRNA e C-terminal com uS19 na subunidade menor do mitorribossomo.

A longa extensão mitocôndria-específica N-terminal da proteína uL5 apresenta a mais ampla gama de conexões, ocupando o espaço que em bactéria é preenchido pelo 5S rRNA. A variante uL5-7 apresenta essa porção N-terminal removida e apresentou fenótipos semelhantes ao mutante nulo $\Delta uL5$, ou seja, deficiência de crescimento em meio não fermentativo, incapacidade de síntese proteica mitocondrial e alta instabilidade do DNA mitocondrial, o que demonstra a sua clara relevância para a síntese proteica mitocondrial.

A proteína uL16 apresenta extensões mitocôndria-específicas nas suas duas extremidades. Neste estudo, a variante uL16-9 avaliamos a remoção da seis resíduos da extensão N-terminal, avaliando o alinhamento entre uL16 e L16 (Figura 7) é possível que a extensão mitocôndria específica se estenda além dos desses 6 primeiros resíduos

inicialmente testados. De qualquer maneira, a remoção dos 6 primeiros resíduos a proteína se mostrou funcional pois a síntese proteica mitocondrial se manteve, assim como a capacidade de crescimento em meio seletivo para a atividade respiratória. Contudo, neste caso uma nova variante deve ser considerada para a remoção de outros 17 resíduos além do ponto de corte em uL16-9. Já a extensão C-terminal, foi avaliada com a construção uL16-8 e se mostrou necessária, apresentando fenótipos avaliados idênticos ao mutante nulo Δ uL16. As extensões de uL16 têm um papel compensatório de preenchimento de espaço deixado pela perda do 5S rRNA.

Por sua vez, a proteína bL27 apresenta uma extensão mitocôndria-específica na porção C-terminal a qual foi estudada na variante bL27-25. O mutante nulo Δ bL27 expressando a variante bL27-25 apresentou fenótipos idênticos ao mutante sozinho, indicando que a remoção da porção mitocôndria-específica dessa proteína a torna não funcional. Nota-se também que a extensão C-terminal de bL27 tem uma forte interação com mL38 (Figura 18) a qual tem sido estudada como uma possível proteína regulatória de acoplamento entre a síntese proteica mitocondrial e o encaminhamento para montagem dos polipeptídeos mitocondriais recém sintetizados conforme discutido anteriormente. Mutantes mL38 foram isolados com deficiência específica na síntese do polipeptídeo mitocondrial *COXI* (Box et al., 2017). Conforme se observa na estrutura do mitorribossomo (Figura 2) a longa extensão C-terminal de bL27 forma um domínio compacto na superfície da estrutura, com contato direto com mL38 o que permite especular possíveis interações com componentes externos ao mitorribossomo dando um possível papel regulatório a essa extensão. (Box et al., 2017).

Por fim, bL31 também possui extensões mitocôndria-específicas nas duas extremidades, e as duas se mostraram essenciais para a função de bL31. A remoção da extensão N-terminal foi estudada com a variante bL31-40, enquanto na variante bL31-37 estudou-se a extensão C-terminal. Enquanto a remoção total da extensão C-terminal foi incapaz de complementar a deficiência respiratória do mutante nulo Δ bL31, a remoção parcial dessa extensão (bL31-38) se mostrou funcional, assim como a remoção da extensão N-terminal que também recuperou a capacidade de síntese proteica do mutante Δ bL31. A ausência de uma forte rede de interações das porções N-terminal e C-terminal com outras proteínas do mitorribossomo talvez justifique a manutenção funcional das versões truncadas bL31-38 e bL31-40. Com a remoção do C-terminal em bL31-37 perde-se a ponte proteína-proteína com a subunidade menor no resíduo K130. Considerando o papel do

homólogo bacteriano L31 no controle da fidelidade do processo traducional, pode-se futuramente usar a variante funcional bL31-38 para estudar esse processo, por exemplo, investigando inicialmente a viabilidade celular (Franco et al., 2019).

6- CONCLUSÃO

Com exceção das extensões mitocôndria específica N-terminal de uL16 e da extensão N-terminal de bL31 todas as demais analisadas nesse trabalho se mostraram essenciais para manter a síntese proteica mitocondrial e por conseguinte a respiração celular. Com base nos resultados obtidos neste estudo e na literatura existente chegamos às conclusões delineadas abaixo que direcionarão a continuidade desses estudos.

A ampla rede de conexões da extensão mitocôndria-específica de uL5 demonstra seu papel central na organização estrutural da protuberância central.

uL16 na porção N-terminal tem uma alta conectividade com 21S rRNA, mas a remoção de seis resíduos iniciais não alterou significativamente a síntese proteica mitocondrial.

O domínio organizado da extensão mitocôndria-específica de bL27 interage intimamente com mL38. Um possível papel regulatório dessa conexão deve ser investigado.

A extensão mitocôndria-específica C-terminal de bL31 estende a rede de interações dessa porção da proteína com a subunidade menor do mitorribossomo com provável papel na acuidade do processo traducional.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKANUMA, Genki et al. Defect in the formation of 70S ribosomes caused by lack of ribosomal protein L34 can be suppressed by magnesium. **Journal of bacteriology**, v. 196, n. 22, p. 3820-3830, 2014.

ANDERSSON, S. G. E.; KARLBERG, O.; CANBÄCK, B.; KURLAND, C. G. On the origin of mitochondria: a genomics perspective. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 358, n. 1429, p. 165–177; discussion 177–179, 2003.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E. Moore. DD, Seidman, JG. Smith, JA and Struhl. K. **Current Protocols in Molecular Biology, Vols**, v. 1, 1989.

BARRIENTOS A, KORR D, BARWELL KJ, SJULSEN C, GAJEWSKI CD, MANFREDI G, ACKERMAN S, TZAGOLOFF A. (2003) MTG1 codes for a conserved protein required for mitochondrial translation. **Mol Biol Cell**. 14(6):2292-302

BARRIENTOS, Antoni et al. MTG1 codes for a conserved protein required for mitochondrial translation. **Molecular biology of the cell**, v. 14, n. 6, p. 2292-2302, 2003..

BARROS MH, MCSTAY GP. Modular biogenesis of mitochondrial respiratory complexes. **Mitochondrion**. 2020;50:94-114. doi:10.1016/j.mito.2019.10.008

BARROS MH, RAK M, PAULELA JA, TZAGOLOFF A. Characterization of Gtf1p, the connector subunit of yeast mitochondrial tRNA-dependent amidotransferase. **J Biol Chem**. 2011 Sep 23;286(38):32937-47.

BLEICHER, Lucas; LEMKE, Ney; GARRATT, Richard Charles. Using amino acid correlation and community detection algorithms to identify functional determinants in protein families. **PloS one**, v. 6, n. 12, p. e27786, 2011.

BOGENHAGEN, Daniel F.; MARTIN, Dwight W.; KOLLER, Antonius. Initial steps in RNA processing and ribosome assembly occur at mitochondrial DNA nucleoids. **Cell metabolism**, v. 19, n. 4, p. 618-629, 2014.

BONAWITZ, Nicholas D. et al. Reduced TOR signaling extends chronological life span via increased respiration and upregulation of mitochondrial gene expression. **Cell metabolism**, v. 5, n. 4, p. 265-277, 2007.

BONNEFOY N, BSAT N, FOX TD. Mitochondrial translation of *Saccharomyces*

cerevisiae COX2 mRNA is controlled by the nucleotide sequence specifying the pre-Cox2p leader peptide. **Mol Cell Biol.** 2001 Apr;21(7):2359-72

BOX, Jodie M.; KAUR, Jasvinder; STUART, Rosemary A. MrpL35, a mitospecific component of mitoribosomes, plays a key role in cytochrome c oxidase assembly. **Molecular biology of the cell**, v. 28, n. 24, p. 3489-3499, 2017.

BROWN, Alan et al. Structure of the large ribosomal subunit from human mitochondria. **Science**, v. 346, n. 6210, p. 718-722, 2014.

DALMAS, Olivier et al. Molecular mechanism of Mg²⁺-dependent gating in CorA. **Nature communications**, v. 5, p. 3590, 2014.

DATTA K, FUENTES JL, MADDOCK JR. (2005) The yeast GTPase Mtg2p is required for mitochondrial translation and partially suppresses an rRNA methyltransferase mutant, mrm2. **Mol Biol Cell.** 16(2):954-63.

DE SILVA, D., Fontanesi, F., Barrientos, A.. (2013) The DEAD box protein Mrh4 functions in the assembly of the mitochondrial large ribosomal subunit. **Cell Metab.** 18: 712-725.

DE SILVA, D., Poliquin, S., Zeng, R., Zamudio-Ochoa, A., Marrero, N., Perez-Martinez, X., Fontanesi, F., Barrientos, A. (2017) The DEAD-box helicase Mss116 plays distinct roles in mitochondrial ribogenesis and mRNA-specific translation. **Nucleic Acids Res.** 45:6628-6643

DE SILVA, Dasmanthie et al. Mitochondrial ribosome assembly in health and disease. **Cell Cycle**, v. 14, n. 14, p. 2226-2250, 2015.

DE SILVA, Dasmanthie; FONTANESI, Flavia; BARRIENTOS, Antoni. The DEAD box protein Mrh4 functions in the assembly of the mitochondrial large ribosomal subunit. **Cell metabolism**, v. 18, n. 5, p. 712-725, 2013.

DENNERLEIN S, ROZANSKA A, WYDRO M, CHRZANOWSKA-LIGHTOWLERS ZM, LIGHTOWLERS RN. Human ERAL1 is a mitochondrial RNA chaperone involved in the assembly of the 28S small mitochondrial ribosomal subunit. **Biochem. J.** 2010;430:551-558.

DESAI, Nirupa et al. The structure of the yeast mitochondrial ribosome. **Science**, v. 355, n. 6324, p. 528-531, 2017.

DRYGIN, DENIS; ZIMMERMANN, ROBERT A. Magnesium ions mediate contacts

between phosphoryl oxygens at positions 2122 and 2176 of the 23S rRNA and ribosomal protein L1. **Rna**, v. 6, n. 12, p. 1714-1726, 2000.

FAYE, Gérard; KUJAWA, Chantal; FUKUHARA, Hiroshi. Physical and genetic organization of petite and grande yeast mitochondrial DNA: IV. In vivo Transcription Products of Mitochondrial DNA and Localization of 23 S Ribosomal RNA in Petite Mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of molecular biology**, v. 88, n. 1, p. 185-203, 1974.

FONSECA-JÚNIOR, Néli J. et al. PFstats: A Network-Based Open Tool for Protein Family Analysis. **Journal of Computational Biology**, v. 25, n. 5, p. 480-486, 2018.

FOURY, Françoise et al. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS letters**, v. 440, n. 3, p. 325-331, 1998.

FRANCO LVR, MODA BS, SOARES MAKM, BARROS MH. Msc6p is required for mitochondrial translation initiation in the absence of formylated Met-tRNA^{fMet}. **FEBS J**. 2019 Apr;286(7):1407-1419.

FRANCO LVR, SU CH, TZAGOLOFF A. Modular assembly of yeast mitochondrial ATP synthase and cytochrome oxidase. **Biol Chem**. 2020;401(6-7):835-853. doi:10.1515/hsz-2020-0112

Graack HR, Wittmann-Liebold B. Mitochondrial ribosomal proteins (MRPs) of yeast. **Biochem J**. 1998 Feb 1;329 (Pt 3)(Pt 3):433-48.doi: 10.1093/nar/23.18.3673.

GREBER, Basil J. et al. The complete structure of the 55S mammalian mitochondrial ribosome. **Science**, v. 348, n. 6232, p. 303-308, 2015.

GREGAN, Juraj; KOLISEK, Martin; SCHWEYEN, Rudolf J. Mitochondrial Mg²⁺ homeostasis is critical for group II intron splicing in vivo. **Genes & development**, v. 15, n. 17, p. 2229-2237, 2001.

GUEDES-MONTEIRO, Raquel Fonseca et al. Mitochondrial ribosome bL34 mutants present diminished translation of cytochrome c oxidase subunits. **Cell biology international**, v. 42, n. 6, p. 630-642, 2018.

HANAHAN, Douglas. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of molecular biology**, v. 166, n. 4, p. 557-580, 1983.

HE J, COOPER HM, REYES A, DI Re M, KAZAK L, WOOD SR, MAO CC, FEARNLEY IM, WALKER JE, HOLT IJ. Human C4orf14 interacts with the mitochondrial nucleoid and is involved in the biogenesis of the small mitochondrial ribosomal subunit. **Nucleic Acids Res**. 2012;40:6097-6108.

- HENTSCHEL, Jendrik et al. The complete structure of the Mycobacterium smegmatis 70S ribosome. **Cell reports**, v. 20, n. 1, p. 149-160, 2017.
- HILLMAN, G.A., and HENRY, M.F. (2019). The yeast protein Mam33 functions in the assembly of the mitochondrial ribosome. **J Biol Chem** 294, 9813-9829.
- HIROKAWA, Go et al. Binding of ribosome recycling factor to ribosomes, comparison with tRNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 39, p. 35847-35852, 2002.
- HOLZENBERGER, Martin et al. IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. **Nature**, v. 421, n. 6919, p. 182, 2003.
- JONES, Christie N. et al. Antibiotic effects on mitochondrial translation and in patients with mitochondrial translational defects. **Mitochondrion**, v. 9, n. 6, p. 429-437, 2009.
- JORNAYVAZ, François R.; SHULMAN, Gerald I. Regulation of mitochondrial biogenesis. **Essays in biochemistry**, v. 47, p. 69-84, 2010.
- KIM, Hyun-Jung; MAITI, Priyanka; BARRIENTOS, Antoni. Mitochondrial ribosomes in cancer. In: **Seminars in cancer biology**. Academic Press, 2017. p. 67-81.
- KIMURA, Motoo. **The neutral theory of molecular evolution**. Cambridge University Press, 1983.
- KIRILLOV, S. V.; SEMENKOV, Yu P. Non-exclusion principle of Ac-Phe-tRNA^{Phe} interaction with the donor and acceptor sites of Escherichia coli ribosomes. **FEBS letters**, v. 148, n. 2, p. 235-238, 1982.
- KLEIN, Daniel J.; MOORE, Peter B.; STEITZ, Thomas A. The contribution of metal ions to the structural stability of the large ribosomal subunit. **Rna**, v. 10, n. 9, p. 1366-1379, 2004.
- KOLISEK, Martin et al. Mrs2p is an essential component of the major electrophoretic Mg²⁺ influx system in mitochondria. **The EMBO journal**, v. 22, n. 6, p. 1235-1244, 2003.
- KOTANI T, AKABANE S, TAKEYASU K, UEDA T, TAKEUCHI N. Human G-proteins, ObgH1 and Mtg1, associate with the large mitochondrial ribosome subunit and are involved in translation and assembly of respiratory complexes. **Nucleic Acids Res.** 2013.
- KURLAND, C. G.; ANDERSSON, S. G. E. Origin and evolution of the mitochondrial proteome. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 64, n. 4, p. 786-820, 2000.

LILLEORG, Silva et al. The intersubunit bridge B1b of the bacterial ribosome facilitates initiation of protein synthesis and maintenance of translational fidelity. **Journal of molecular biology**, v. 429, n. 7, p. 1067-1080, 2017.

LIU, Xuesong et al. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. **Cell**, v. 86, n. 1, p. 147-157, 1996.

MARGULIS, Lynn. Symbiosis in cell evolution: Life and its environment on the early earth. 1981.

MEARS, Jason A. et al. A structural model for the large subunit of the mammalian mitochondrial ribosome. **Journal of molecular biology**, v. 358, n. 1, p. 193-212, 2006.

MERZ, Sandra; WESTERMANN, Benedikt. Genome-wide deletion mutant analysis reveals genes required for respiratory growth, mitochondrial genome maintenance and mitochondrial protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genome biology**, v. 10, n. 9, p. R95, 2009.

MUMBERG D, MÜLLER R, FUNK M. Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. **Gene**. 1995;156(1):119-122. doi:10.1016/0378-1119(95)00037-7

MYERS AM, PAPE LK, TZAGOLOFF A. Mitochondrial protein synthesis is required for maintenance of intact mitochondrial genomes in *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO J**. 1985 Aug;4(8):2087-92.

PAN C, MASON TL. Identification of the yeast nuclear gene for the mitochondrial homologue of bacterial ribosomal protein L16. **Nucleic Acids Res**. 1995 Sep 25;23(18):3673-7.

PAUL MF, ALUSHIN GM, BARROS MH, RAK M, TZAGOLOFF A. (2012) The putative GTPase encoded by MTG3 functions in a novel pathway for regulating assembly of the small subunit of yeast mitochondrial ribosomes. **J Biol Chem**. 287(29):24346-55

PETROV, Anton S. et al. RNA–magnesium–protein interactions in large ribosomal subunit. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 116, n. 28, p. 8113-8120, 2012.

PFEFFER S, WOELLHAF MW, HERRMANN JM, FÖRSTER F. Organization of the mitochondrial translation machinery studied in situ by cryoelectron tomography. **Nat Commun**. 2015;6:6019.

RORBACH J, GAMMAGE PA, MINCZUK M. C7orf30 is necessary for biogenesis of the large subunit of the mitochondrial ribosome. **Nucleic Acids Res**. 2012 May;40(9):4097-

109.

ROTHSTEIN, Rodney J. [12] One-step gene disruption in yeast. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 1983. p. 202-211.

RÖTIG, Agnès. Human diseases with impaired mitochondrial protein synthesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1807, n. 9, p. 1198-1205, 2011.

SAMBROOK, Joseph et al. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold spring harbor laboratory press, 1989.

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

SESHADRI SR, BANARJEE C, BARROS MH, FONTANESI F. The translational activator Sov1 coordinates mitochondrial gene expression with mitoribosome biogenesis. **Nucleic Acids Res.** 2020 Jul 9;48(12):6759-6774.

SHAJANI Z, SYKES MT, WILLIAMSON JR. (2011) Assembly of bacterial ribosomes. *Annu Rev Biochem.* 80: 501-526.

SINGH, Rochika; SRIPADA, Lakshmi; SINGH, Rajesh. Side effects of antibiotics during bacterial infection: mitochondria, the main target in host cell. **Mitochondrion**, v. 16, p. 50-54, 2014.

SKULACHEV, Vladimir P. Mitochondrial physiology and pathology; concepts of programmed death of organelles, cells and organisms. **Molecular aspects of medicine**, v. 20, n. 3, p. 139-184, 1999.

SMITS, Paulien; SMEITINK, Jan; VAN DEN HEUVEL, Lambert. Mitochondrial translation and beyond: processes implicated in combined oxidative phosphorylation deficiencies. **Journal of BioMed Research**, v. 2010, 2010.

SUHM, Tamara. **Mitochondrial translation and its impact on protein homeostasis and aging**. 2019. Tese de Doutorado. Department of Biochemistry and Biophysics, Stockholm University.

SUSIN, Santos A. et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. **Nature**, v. 397, n. 6718, p. 441, 1999.

TOWBIN, Harry; STAEBELIN, Theophil; GORDON, Julian. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 9, p. 4350-

4354, 1979.

TZAGOLOFF, ALEXANDER; AKAI, A. N. N. A.; NEEDLEMAN, RICHARD B. Assembly of the mitochondrial membrane system. Characterization of nuclear mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with defects in mitochondrial ATPase and respiratory enzymes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 20, p. 8228-8235, 1975.

TZAGOLOFF, Alexander; MYERS, Alan M. Genetics of mitochondrial biogenesis. **Annual review of biochemistry**, v. 55, n. 1, p. 249-285, 1986.

WILLIAMSON, JAMES R. After the ribosome structures: How are the subunits assembled?. **Rna**, v. 9, n. 2, p. 165-167, 2003.

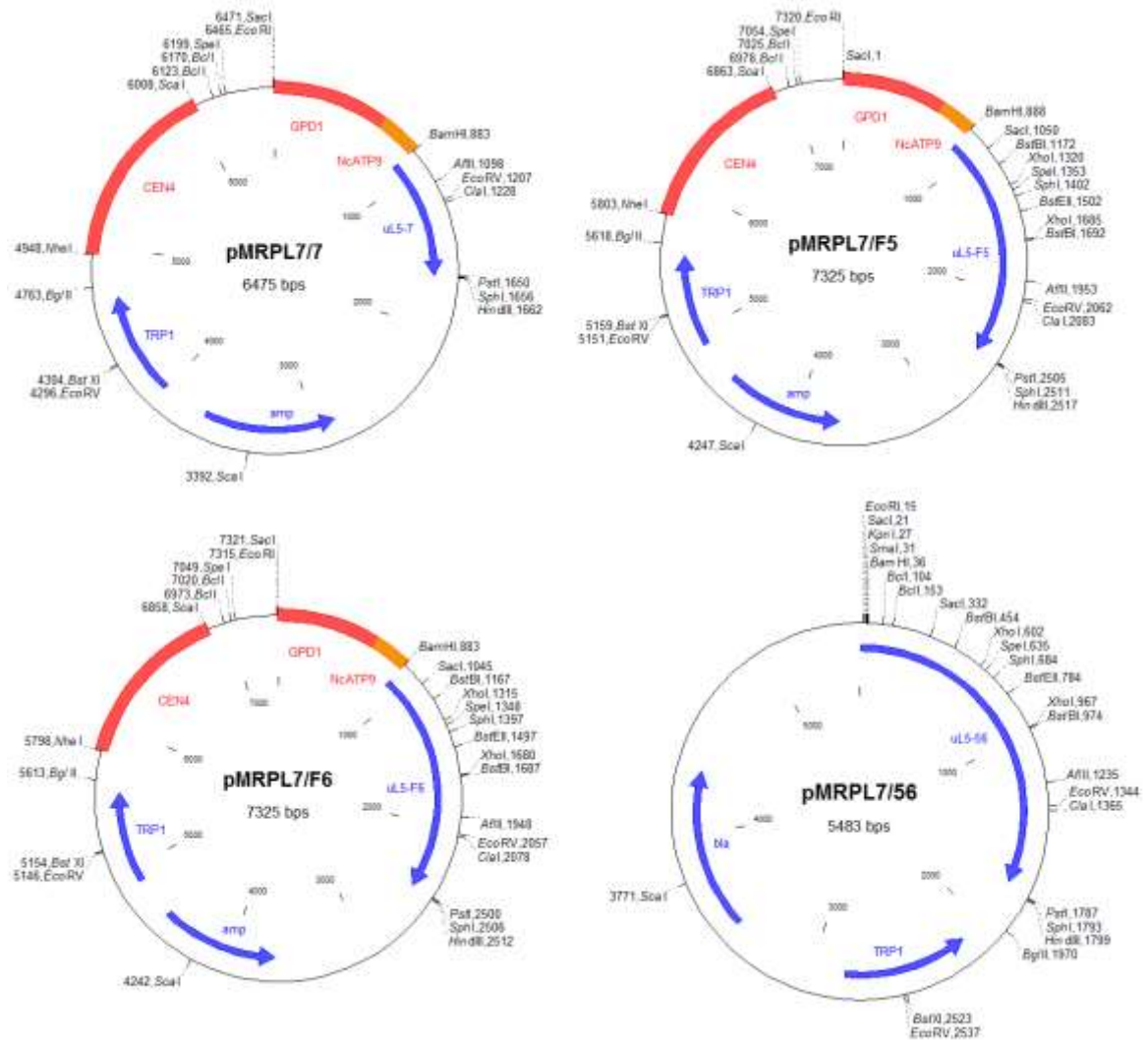
ZENG, Rui; SMITH, Erin; BARRIENTOS, Antoni. Yeast mitoribosome large subunit assembly proceeds by hierarchical incorporation of protein clusters and modules on the inner membrane. **Cell metabolism**, v. 27, n. 3, p. 645-656. e7, 2018.

ANEXOS

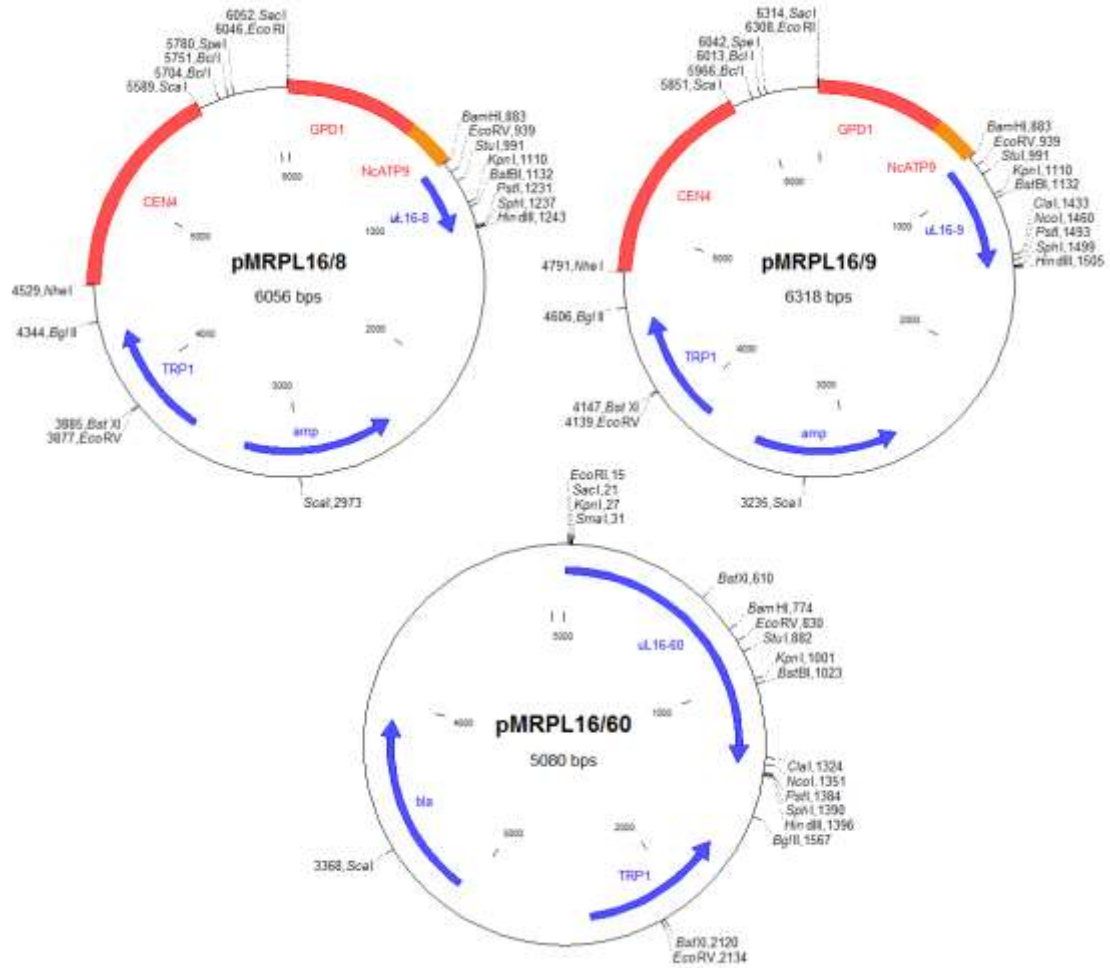
Anexo 1: sequência de iniciadores utilizados para construir as variantes alélicas.

Enzima	Nome	Sequência (5' - 3')
<i>Bam</i> H1	MRPL7-F0	GGCGGATCCTGCATAAAGGACTAC
<i>Bam</i> H1	MRPL7-F	GGCGGATCCGGGCTAGAAAGTGTTGTA
<i>Pst</i> I	MRPL7-R	GGCCTGCAGCGTAGGAATCTTTGTTCTC
<i>Bam</i> H1	MRPL7-Fo551	GGCGGATCCTCTTGAGTGTGATTCG
<i>Mfe</i> I	MRPL7-F5	GGCCAATTGGCACAAATTACTGGATGTAAACCTC
<i>Mfe</i> I	MRPL7-F6	GGCCAATTGGCAGCAATTACTGGATGTAAACCTC
<i>Pst</i> I	MRPL7-R5	GGCCAATTGTAACGCAGCGGTGAT
<i>Bcl</i> I	MRPL16-F0	GGCTGATCATTAGCATAACCAGTTG
<i>Bcl</i> I	MRPL16-F	GGCTGATCACGTTTCAAATCGTACAG
<i>Pst</i> I	MRPL16-R1	GGCCTGCAGTCAGGATACAAATTCATATACC
<i>Pst</i> I	MRPL16-R2	GGCCTGCAGTGCATACTAGAATTA
<i>Bcl</i> I	MRP7-F0	GGCTGATCACCTCCCTTATCAATG
<i>Bcl</i> I	MRP7-F1	GGCTGATCAGCCACCAAAGGGCTGCG
<i>Nsi</i> I	MRP7-R1	GGCATGCATTCAAACACCAATGAATTTTCT
<i>Nsi</i> I	MRP7-R2	CGCGATGCATATCATCAATGA
<i>Bcl</i> I	MRPL36-F0	GGCTGATCAAATGTCCTCAAATGCC
<i>Bcl</i> I	MRPL36-F1	GGCTGATCATATCCTGGTTCTACAAGA
<i>Bcl</i> I	MRPL36-F2	GGCTGATCAATTTATCACCAATTCAATGTC
<i>Pst</i> I	MRPL36-R1	GGCCTGCAGTCACAAAGAGCTATACCTCTTG
<i>Pst</i> I	MRPL36-R2	GGCCTGCAGAATCTTCGTTGTCA

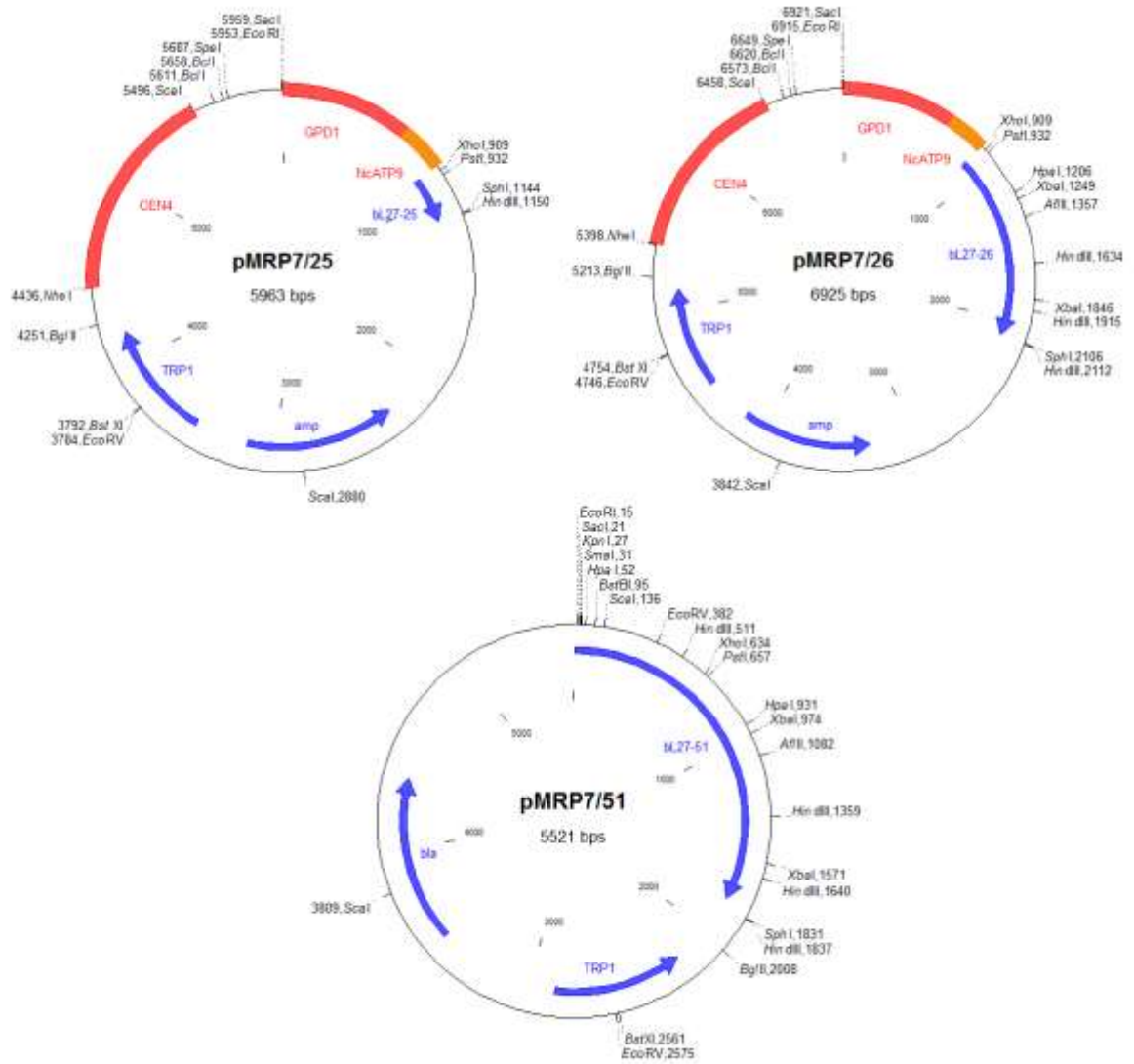
Anexo 2: plasmídeos criados e utilizados para construir as linhagens mutantes de uL5.



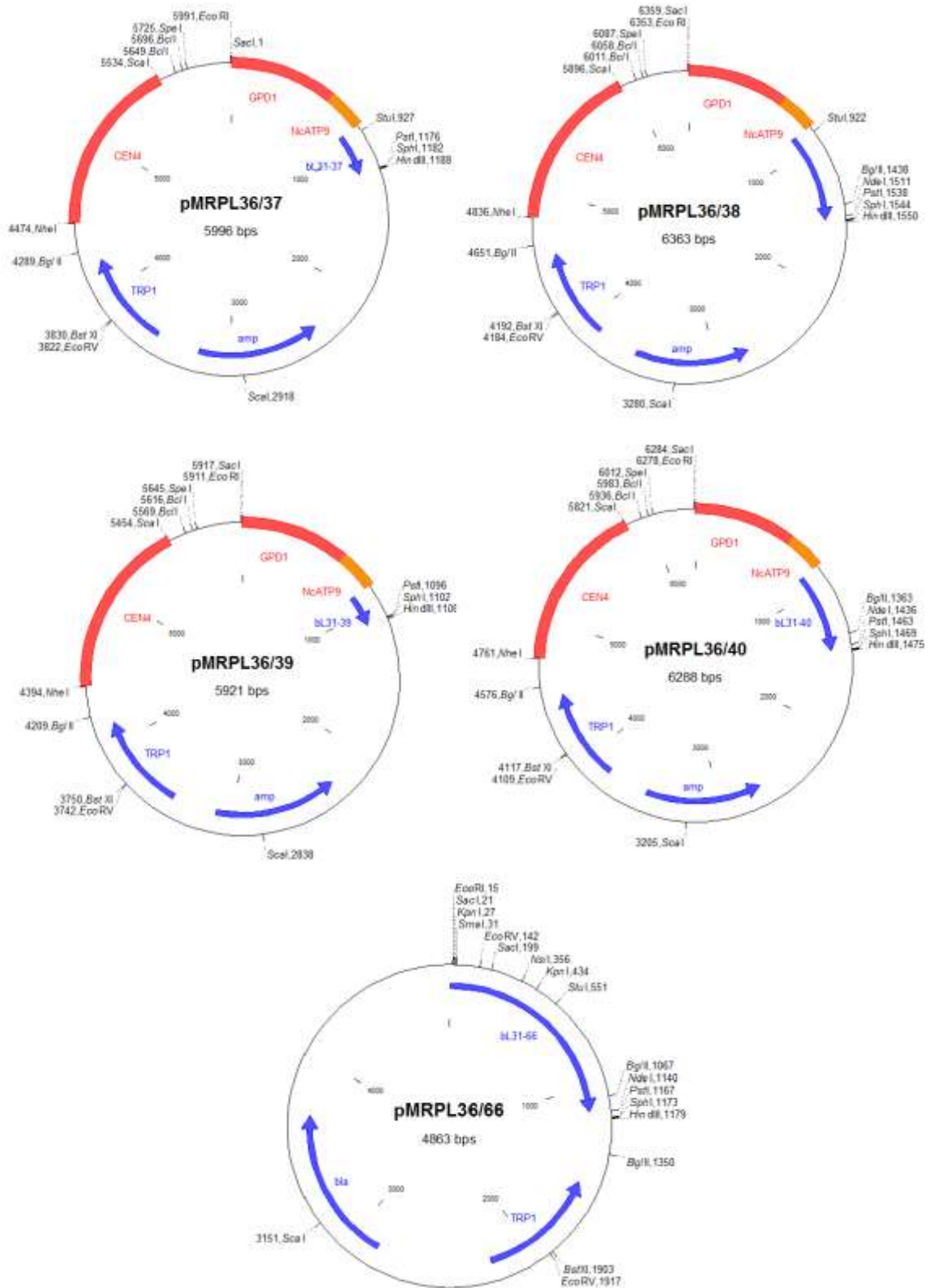
Anexo 3: plasmídeos criados e utilizados para construir as linhagens mutantes de uL16.



Anexo 4: plasmídeos criados e utilizados para construir as linhagens mutantes de bL27.



Anexo 5: plasmídeos criados e utilizados para construir as linhagens mutantes de bL31.



Anexo 6: Matriz de autocorrelação criada pelo *software* PFstats da proteína uL5 (PF00281). “All” indica a conservação no alinhamento completo, enquanto os valores expressos nas demais colunas são as frequências observadas no subalinhamento quando o resíduo que aparece na linha é fixado.

	All	A131	S129	K134	G117	G39	F133	K20	G46	M12	Q118	I108	K128	I130	K74	P16
A131	61,77	0	76,79	68,92	64,19	65,72	64,02	62,49	63,67	62,25	65,08	67,65	68,29	64,59	74,48	66,67
S129	67,67	84,14	0	75,54	69,96	72,2	70,76	68,42	69	68,09	71,18	72,83	74,94	71,73	77,04	72,43
K134	78,07	87,1	87,14	0	81,49	83,66	80,77	79,45	78,54	77,92	82,07	84,91	88,75	85,27	93,39	83,87
G117	93,73	97,41	96,89	97,83	0	95,88	95,24	94,27	93,85	93,45	95,55	96,12	96,16	95,81	97,87	95,92
G39	85,49	90,96	91,2	91,61	87,44	0	88,75	88,44	90,62	89,52	88,86	89	90,98	90,44	95,24	87,85
F133	92,4	95,77	96,62	95,6	93,89	95,93	0	94,75	95,2	94,5	96,5	93,53	96,29	96,66	97,73	93,93
K20	94,23	95,33	95,26	95,89	94,77	97,48	96,63	0	97,36	98,1	97,15	94,12	95,97	96,73	97,51	93,87
G46	84,94	87,55	86,6	85,45	85,05	90,04	87,51	87,76	0	92,14	88,01	84,04	87,02	86,39	90,83	84,12
M12	69,87	70,42	70,3	69,74	69,66	73,17	71,46	72,74	75,8	0	72,03	67,82	71,04	69,76	75,27	69,07
Q118	91,67	96,59	96,41	96,36	93,45	95,29	95,74	94,51	94,99	94,5	0	93,58	95,91	96,92	98,86	93,98
I108	84,94	93,03	91,41	92,38	87,1	88,43	85,98	84,84	84,04	82,44	86,71	0	90,28	87,3	93,03	89,89
K128	71,61	79,17	79,3	81,41	73,47	76,22	74,63	72,93	73,37	72,8	74,93	76,12	0	78,47	84,36	75,5
I130	69,96	73,17	74,15	76,42	71,52	74,02	73,19	71,82	71,16	69,86	73,98	71,91	76,66	0	77,68	71,87
K74	64,42	77,69	73,34	77,07	67,27	71,77	68,14	66,67	68,89	69,4	69,48	70,57	75,9	71,53	0	69,17
P16	89,7	96,81	96,01	96,36	91,79	92,18	91,18	89,36	88,84	88,66	91,96	94,93	94,57	92,15	96,3	0

Anexo 7: Códigos UniProt das proteínas agrupadas nas classes de organismos analisados na figura 10A.

• RK5	RL11_DROME	RL5_ACIET	RL5_BACC7	RL5_BREBN
RK5_ARATH	RL11_ENCCU	RL5_ACISJ	RL5_BACCN	RL5_BRUA1
RK5_BIGNA	RL11_HUMAN	RL5_ACTP2	RL5_BACCQ	RL5_BRUA2
RK5_CHAGL	RL11_ICTPU	RL5_ACTP7	RL5_BACCR	RL5_BRUAB
RK5_CHAVU	RL11_LEICH	RL5_ACTPJ	RL5_BACCZ	RL5_BRUC2
RK5_CHLAT	RL11_LEIMA	RL5_ACTSZ	RL5_BACFN	RL5_BRUMB
RK5_CHLRE	RL11_MEDSA	RL5_AERHH	RL5_BACFR	RL5_BRUME
RK5_CHLVU	RL11_MOUSE	RL5_AERPE	RL5_BACHD	RL5_BRUO2
RK5_CYACA	RL11_NEUCR	RL5_AERS4	RL5_BACHK	RL5_BRUSI
RK5_CYAM1	RL11_ORYSI	RL5_AGARV	RL5_BACLD	RL5_BRUSU
RK5_CYAPA	RL11_ORYSJ	RL5_AGRFC	RL5_BACP2	RL5_BUCA5
RK5_EMIHU	RL11_PIG	RL5_AGRRK	RL5_BACSK	RL5_BUCAI
RK5_EUGGR	RL11_PONAB	RL5_AGRVS	RL5_BACSU	RL5_BUCAK
RK5_EUGLO	RL11_RAT	RL5_ALCBS	RL5_BACTN	RL5_BUCAP
RK5_GRATL	RL11_SPOFR	RL5_ALISL	RL5_BACV8	RL5_BUCAT
RK5_GUITH	RL11_TETTH	RL5_ALKEH	RL5_BACVZ	RL5_BUCBP
RK5_HEL SJ	RL11_TOXCA	RL5_ALKMQ	RL5_BACWK	RL5_BUCC
RK5_HETA2		RL5_ALKOO	RL5_BARBK	RL5_BURA4
RK5_HETA4	• RL111	RL5_ALTMD	RL5_BARHE	RL5_BURCA
RK5_MESVI	RL111_ARATH	RL5_ANAD2	RL5_BARQU	RL5_BURCC
RK5_NEPOL	RL111_CAEBR	RL5_ANADE	RL5_BART1	RL5_BURCH
RK5_OEDCA	RL111_CAEEL	RL5_ANADF	RL5_BAUCH	RL5_BURCJ
RK5_OLTVI		RL5_ANAMF	RL5_BDEBA	RL5_BURCM
RK5_ORYSJ	• RL112	RL5_ANAMM	RL5_BIFAA	RL5_BURL3
RK5_OSTTA	RL112_ARATH	RL5_ANAPZ	RL5_BIFLD	RL5_BURM1
RK5_PAUCH	RL112_CAEBR	RL5_ANASK	RL5_BIFLO	RL5_BURM7
RK5_PHATC	RL112_CAEEL	RL5_ANAVT	RL5_BIFLS	RL5_BURM9
RK5_PLETE		RL5_ANOFW	RL5_BLOFL	RL5_BURMA
RK5_PORPU	• RL11A_B	RL5_AQUAE	RL5_BLOPB	RL5_BURMS
RK5_PYRYE	RL11A_SCHPO	RL5_AQUPY	RL5_BORA1	RL5_BURP0
RK5_RHDSA	RL11A_YEAST	RL5_ARCFU	RL5_BORAP	RL5_BURP1
RK5_SPIOL	RL11B_SCHPO	RL5_AROAE	RL5_BORBP	RL5_BURP6
RK5_STIHE	RL11B_YEAST	RL5_ARTS2	RL5_BORBR	RL5_BURPS
RK5_TETOB		RL5_AYWBP	RL5_BORBU	RL5_BURTA
RK5_THAPS	• RL5	RL5_AZOC5	RL5_BORBZ	RL5_BURVG
RK5_TRICV	RL5_ACAM1	RL5_AZOSB	RL5_BORDL	RL5_CALMQ
RK5_TUPAK	RL5_ACHLI	RL5_AZOVD	RL5_BORHD	RL5_CALS4
RK5_ZYGCR	RL5_ACIAC	RL5_BACAA	RL5_BORPA	RL5_CAMC1
	RL5_ACIAD	RL5_BACAC	RL5_BORPD	RL5_CAMC5
• RL11	RL5_ACIB3	RL5_BACAH	RL5_BORPE	RL5_CAMHC
RL11_ASHGO	RL5_ACIB5	RL5_BACAN	RL5_BORRA	RL5_CAMJ8
RL11_BOVIN	RL5_ACIBS	RL5_BACC0	RL5_BORT9	RL5_CAMJD
RL11_CANGA	RL5_ACIBT	RL5_BACC1	RL5_BRADU	RL5_CAMJE
RL11_CHILA	RL5_ACIBY	RL5_BACC2	RL5_BRAHW	RL5_CAMJJ
RL11_CHLRE	RL5_ACIC1	RL5_BACC3	RL5_BRASB	RL5_CAMJR
RL11_DICDI	RL5_ACIC5	RL5_BACC4	RL5_BRASO	RL5_CAMLR

RL5_CARHZ	RL5_CORA7	RL5_ECO45	RL5_GEOMG	RL5_LACBA
RL5_CAUSK	RL5_CORDI	RL5_ECO55	RL5_GEOSE	RL5_LACCB
RL5_CAUVC	RL5_COREF	RL5_ECO57	RL5_GEOSL	RL5_LACDA
RL5_CAUVN	RL5_CORGB	RL5_ECO5E	RL5_GEOSM	RL5_LACDB
RL5_CELJU	RL5_CORGL	RL5_ECO7I	RL5_GEOSW	RL5_LACF3
RL5_CENSY	RL5_CORJK	RL5_ECO81	RL5_GEOTN	RL5_LACGA
RL5_CHESB	RL5_CORK4	RL5_ECO8A	RL5_GEOUR	RL5_LACH4
RL5_	RL5_CORU7	RL5_ECOBW	RL5_GLOVI	RL5_LACJO
CHLAA	RL5_COXB1	RL5_ECODH	RL5_GLUOX	RL5_LACLA
RL5_CHLAB	RL5_COXB2	RL5_ECOHS	RL5_GRAFK	RL5_LACLM
RL5_CHLAD	RL5_COXBN	RL5_ECOK1	RL5_HAEDU	RL5_LACLS
RL5_CHLCH	RL5_COXBR	RL5_ECOL5	RL5_HAEI8	RL5_LACP3
RL5_CHLCV	RL5_COXBU	RL5_ECOL6	RL5_HAEIE	RL5_LACP7
RL5_CHLFF	RL5_CROS8	RL5_ECOLC	RL5_HAEIG	RL5_LACPL
RL5_CHLL2	RL5_CUPMC	RL5_ECOLI	RL5_HAEIN	RL5_LACRD
RL5_CHLL7	RL5_CUPNH	RL5_ECOLU	RL5_HAEPS	RL5_LACRJ
RL5_CHLMU	RL5_CUPNJ	RL5_ECOSE	RL5_HAES1	RL5_LACS1
RL5_CHLPB	RL5_CUPTR	RL5_ECOSM	RL5_HAHCH	RL5_LACSS
RL5_CHLPD	RL5_CUTAK	RL5_ECOUT	RL5_HALHL	RL5_LAWIP
RL5_CHLPM	RL5_CYAP4	RL5_EDWI9	RL5_HALLT	RL5_LEGPA
RL5_CHLPN	RL5_CYAP7	RL5_EHRCJ	RL5_HALMA	RL5_LEGPC
RL5_CHLSY	RL5_CYAP8	RL5_EHRCR	RL5_HALMT	RL5_LEGPH
RL5_CHLT2	RL5_DECAR	RL5_EHRRG	RL5_HALOH	RL5_LEGPL
RL5_CHLTA	RL5_DEHM1	RL5_EHRRW	RL5_HALS3	RL5_LEIXX
RL5_CHLTB	RL5_DEHMB	RL5_ENT38	RL5_HALSA	RL5_LEPBA
RL5_CHLTE	RL5_DEHMC	RL5_ENTFA	RL5_HALVD	RL5_LEPBJ
RL5_CHLTR	RL5_DEIGD	RL5_ERWT9	RL5_HALWD	RL5_LEPBP
RL5_CHRSO	RL5_DEIRA	RL5_ESCF3	RL5_HAMD5	RL5_LEPIC
RL5_CHRVO	RL5_DELAS	RL5_EXIS2	RL5_HELAH	RL5_LEPIN
RL5_CITK8	RL5_DESAA	RL5_EXISA	RL5_HELHP	RL5_LEUCK
RL5_CLOAB	RL5_DESAD	RL5_FERNB	RL5_HELMI	RL5_LEUMM
RL5_CLOB1	RL5_DESAG	RL5_FLAJ1	RL5_HELP2	RL5_LISIN
RL5_CLOB6	RL5_DESAH	RL5_FLAPJ	RL5_HELPG	RL5_LISMC
RL5_CLOB8	RL5_DESAP	RL5_FRAAA	RL5_HELPH	RL5_LISMF
RL5_CLOBA	RL5_DESDA	RL5_FRACC	RL5_HELPJ	RL5_LISMH
RL5_CLOBB	RL5_DESHD	RL5_FRAP2	RL5_HELPSP	RL5_LISMO
RL5_CLOBH	RL5_DESHY	RL5_FRASN	RL5_HELPY	RL5_LISW6
RL5_CLOBJ	RL5_DESMR	RL5_FRAT1	RL5_HERA2	RL5_LYSSC
RL5_CLOBK	RL5_DESOH	RL5_FRATF	RL5_HERAR	RL5_MACCJ
RL5_CLOBL	RL5_DESPS	RL5_FRATH	RL5_HISS2	RL5_MAGMM
RL5_CLOBM	RL5_DESRM	RL5_FRATM	RL5_HYDCU	RL5_MAGSA
RL5_CLOCE	RL5_DESVH	RL5_FRATN	RL5_IDILO	RL5_MANSM
RL5_CLOK1	RL5_DESVM	RL5_FRATO	RL5_JANMA	RL5_MARHV
RL5_CLOK5	RL5_DESVV	RL5_FRATT	RL5_JANSC	RL5_MARMM
RL5_CLONN	RL5_DICNV	RL5_FRATW	RL5_KINRD	RL5_MARMS
RL5_CLOP1	RL5_DICT6	RL5_FUSNN	RL5_KLEP3	RL5_MESFL
RL5_CLOPE	RL5_DICTD	RL5_GEOBB	RL5_KLEP7	RL5_META3
RL5_CLOPS	RL5_DINSH	RL5_GEODF	RL5_KOCDR	RL5_METAC
RL5_CLOTE	RL5_ECO24	RL5_GEOKA	RL5_KOSOT	RL5_METB6
RL5_COLP3	RL5_ECO27	RL5_GEOLS	RL5_LACAC	RL5_METBF

RL5_METBU	RL5_NANEQ	RL5_PORGI	RL5_RHILO	RL5_SALRD
RL5_METCA	RL5_NATPD	RL5_PROA2	RL5_RHILW	RL5_SALSV
RL5_METFK	RL5_NATTJ	RL5_PROM0	RL5_RHIME	RL5_SALTI
RL5_METHJ	RL5_NEIG1	RL5_PROM1	RL5_RHOBA	RL5_SALTO
RL5_METJA	RL5_NEIM0	RL5_PROM2	RL5_RHOFT	RL5_SALTY
RL5_METKA	RL5_NEIMA	RL5_PROM3	RL5_RHOP2	RL5_SERMA
RL5_METLZ	RL5_NEIMB	RL5_PROM4	RL5_RHOP5	RL5_SERP5
RL5_METM5	RL5_NEIMF	RL5_PROM5	RL5_RHOPA	RL5_SHEAM
RL5_METM6	RL5_NEOSM	RL5_PROM9	RL5_RHOPB	RL5_SHEB2
RL5_METM7	RL5_NITEC	RL5_PROMA	RL5_RHOPS	RL5_SHEB5
RL5_METMA	RL5_NITEU	RL5_PROMH	RL5_RHOPT	RL5_SHEB8
RL5_METMJ	RL5_NITHX	RL5_PROMM	RL5_RHORT	RL5_SHEB9
RL5_METMP	RL5_NITMS	RL5_PROMP	RL5_RHOS1	RL5_SHEDO
RL5_METS3	RL5_NITMU	RL5_PROMS	RL5_RHOS4	RL5_SHEFN
RL5_METST	RL5_NITOC	RL5_PROMT	RL5_RHOS5	RL5_SHEHH
RL5_METTH	RL5_NITWN	RL5_PROVU	RL5_RHOSK	RL5_SHELP
RL5_METVA	RL5_NOCFA	RL5_PSE14	RL5_RICAE	RL5_SHEON
RL5_METVS	RL5_NOSP7	RL5_PSEA7	RL5_RICAH	RL5_SHEPA
RL5_MICAN	RL5_NOSS1	RL5_PSEA8	RL5_RICB8	RL5_SHEPC
RL5_MICLC	RL5_NOVAD	RL5_PSEAB	RL5_RICBR	RL5_SHEPW
RL5_MICLU	RL5_OCEIH	RL5_PSEAE	RL5_RICCK	RL5_SHESA
RL5_MOOTA	RL5_OCHA4	RL5_PSECP	RL5_RICCN	RL5_SHESH
RL5_MYCA1	RL5_OENOB	RL5_PSEE4	RL5_RICFE	RL5_SHESM
RL5_MYCA9	RL5_OLICO	RL5_PSEF5	RL5_RICPR	RL5_SHESR
RL5_MYCAP	RL5_ONYPE	RL5_PSEFS	RL5_RICPU	RL5_SHESW
RL5_MYCBO	RL5_PAEAT	RL5_PSEHT	RL5_RICRO	RL5_SHEWM
RL5_MYCBP	RL5_PARD8	RL5_PSELT	RL5_RICRS	RL5_SHIB3
RL5_MYCBT	RL5_PARDP	RL5_PSEMY	RL5_RICTY	RL5_SHIBS
RL5_MYCCT	RL5_PARL1	RL5_PSEP1	RL5_ROSCS	RL5_SHIDS
RL5_MYCGA	RL5_PARP8	RL5_PSEPF	RL5_ROSDO	RL5_SHIF8
RL5_MYCGE	RL5_PARPJ	RL5_PSEPG	RL5_ROSS1	RL5_SHIFL
RL5_MYCH2	RL5_PARUW	RL5_PSEPK	RL5_RUBXD	RL5_SHISS
RL5_MYCH7	RL5_PARXL	RL5_PSEPW	RL5_RUEPO	RL5_SINFN
RL5_MYCHJ	RL5_PASMU	RL5_PSESM	RL5_RUEST	RL5_SINMW
RL5_MYCLB	RL5_PECAS	RL5_PSEU2	RL5_RUTMC	RL5_SODGM
RL5_MYCLE	RL5_PECCP	RL5_PSEU5	RL5_SACD2	RL5_SOLUE
RL5_MYCMO	RL5_PEDPA	RL5_PSYA2	RL5_SACEN	RL5_SPHAL
RL5_MYCMS	RL5_PELCD	RL5_PSYCK	RL5_SALA4	RL5_SPHWW
RL5_MYCPA	RL5_PELPB	RL5_PSYIN	RL5_SALAI	RL5_SPIKU
RL5_MYCPE	RL5_PELPD	RL5_PSYWF	RL5_SALAR	RL5_STAA1
RL5_MYCPN	RL5_PELUB	RL5_PYRAB	RL5_SALCH	RL5_STAA2
RL5_MYCPU	RL5_PHEZH	RL5_PYRAE	RL5_SALDC	RL5_STAA3
RL5_MYCS2	RL5_PHOLL	RL5_PYRFU	RL5_SALEP	RL5_STAA8
RL5_MYCS5	RL5_PHOPR	RL5_PYRHO	RL5_SALG2	RL5_STAA9
RL5_MYCSJ	RL5_PICTO	RL5_RALPJ	RL5_SALHS	RL5_STAAB
RL5_MYCSK	RL5_POLAQ	RL5_RALSO	RL5_SALNS	RL5_STAAC
RL5_MYCSS	RL5_POLNA	RL5_RENSM	RL5_SALPA	RL5_STAAE
RL5_MYCTA	RL5_POLNS	RL5_RHIE6	RL5_SALPB	RL5_STAAM
RL5_MYCTO	RL5_POLSJ	RL5_RHIEC	RL5_SALPC	RL5_STAAN
RL5_MYCTU	RL5_PORG3	RL5_RHIL3	RL5_SALPK	RL5_STAAR

RL5_STAAS	RL5_STRPF	RL5_SYNFM	RL5_THISH	RL5_XANAC
RL5_STAAT	RL5_STRPG	RL5_SYNJA	RL5_TOLAT	RL5_XANC5
RL5_STAAW	RL5_STRPI	RL5_SYNJB	RL5_TREDE	RL5_XANC8
RL5_STACT	RL5_STRPJ	RL5_SYNP2	RL5_TREPA	RL5_XANCB
RL5_STAEQ	RL5_STRPM	RL5_SYNP6	RL5_TREPS	RL5_XANCP
RL5_STAES	RL5_STRPN	RL5_SYNPW	RL5_TRIEI	RL5_XANOM
RL5_STAHJ	RL5_STRPQ	RL5_SYNPX	RL5_TROW8	RL5_XANOP
RL5_STAS1	RL5_STRPS	RL5_SYNR3	RL5_TROWT	RL5_XANOR
RL5_STRA1	RL5_STRPZ	RL5_SYNS3	RL5_UREP2	RL5_XANP2
RL5_STRA3	RL5_STRR6	RL5_SYNS9	RL5_UREPA	RL5_XYLF2
RL5_STRA5	RL5_STRS2	RL5_SYNSC	RL5_UREU1	RL5_XYLFA
RL5_STRAW	RL5_STRS7	RL5_SYNWW	RL5_VARPS	RL5_XYLFM
RL5_STRCO	RL5_STRSV	RL5_SYNY3	RL5_VEREI	RL5_XYLFT
RL5_STRE4	RL5_STRSY	RL5_TERTT	RL5_VESOH	RL5_YERE8
RL5_STREM	RL5_STRT1	RL5_THEAB	RL5_VIBC3	RL5_YERP3
RL5_STRGC	RL5_STRT2	RL5_THEAC	RL5_VIBCB	RL5_YERPA
RL5_STRGG	RL5_STRTD	RL5_THEAQ	RL5_VIBCH	RL5_YERPB
RL5_STRM5	RL5_STRU0	RL5_THEEB	RL5_VIBCM	RL5_YERPE
RL5_STRMK	RL5_STRZJ	RL5_THEFY	RL5_VIBF1	RL5_YERPG
RL5_STRMU	RL5_STRZP	RL5_THEKO	RL5_VIBFM	RL5_YERPN
RL5_STRP1	RL5_STRZT	RL5_THEM4	RL5_VIBPA	RL5_YERPP
RL5_STRP2	RL5_SULAC	RL5_THEMA	RL5_VIBTL	RL5_YERPS
RL5_STRP3	RL5_SULDN	RL5_THEP3	RL5_VIBVU	RL5_YERPY
RL5_STRP4	RL5_SULMW	RL5_THEPX	RL5_VIBVY	RL5_ZYMMO
RL5_STRP6	RL5_SULNB	RL5_THESQ	RL5_WIGBR	
RL5_STRP7	RL5_SULSO	RL5_THET2	RL5_WOLPM	• RM07
RL5_STRP8	RL5_SULTO	RL5_THET8	RL5_WOLPP	RM07_SCHPO
RL5_STRPB	RL5_SYMTH	RL5_THETH	RL5_WOLSU	RM07_YEAST
RL5_STRPC	RL5_SYNAS	RL5_THEVO	RL5_WOLTR	
RL5_STRPD	RL5_SYNE7	RL5_THIDA	RL5_WOLWR	

