

Universidade do Vale do Paraíba  
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

RAQUEL FONSECA GUEDES

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA  
PRELIMINAR DE SEIS GENES NUCLEARES DE PROVÁVEL  
FUNÇÃO MITOCONDRIAL EM *Saccharomyces cerevisiae*

São José dos Campos, SP  
2006

RAQUEL FONSECA GUEDES

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA  
PRELIMINAR DE SEIS GENES NUCLEARES DE PROVÁVEL  
FUNÇÃO MITOCONDRIAL EM *Saccharomyces cerevisiae*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas – Biologia celular, molecular e da conservação.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Gorgônio da Nóbrega

Co-orientador: Prof. Dr. Mário Henrique de Barros

São José dos Campos, SP  
2006

G959c

Guedes, Raquel Fonseca

Caracterização fenotípica e genotípica preliminar de seis genes nucleares de provável função mitocondrial em *Saccharomyces cerevisiae*. Raquel Fonseca Guedes. São José dos Campos: UniVap, 2006.

107f.: il.; 31cm.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2006.

1. Leveduras 2. *Saccharomyces cerevisiae* 3. Biologia Molecular  
I. Nóbrega, Francisco Gorgônio, Orient. II. Barros, Mário Henrique, Co-Orient. III. Título

CDU: 582.282.23

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processo fotocopiador ou transmissão eletrônica.

Assinatura: Raquel Fonseca Guedes

Data: 30 de junho de 2006

**“CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA PRELIMINAR DE SEIS GENES NUCLEARES DE PROVÁVEL FUNÇÃO MITOCONDRIAL EM *Saccharomyces cerevisiae*”**

Raquel Fonseca Guedes

Banca Examinadora:

Prof<sup>ª</sup>. Dra. **JOSANE MITTMANN** (UNIVAP)

Prof. Dr. **FRNACISCO G. NÓBREGA** (UNIVAP)

Prof. Dr. **GONÇALO A. GUIMARÃES PEREIRA** (UNICAMP)

Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco  
Diretor do IP&D - UniVap

*Dedico*

*ao meu avô João, um homem trabalhador, honesto e guerreiro.*

*Sua ausência trouxe uma saudade apertada...*

*Seu exemplo levarei para sempre!*

“A gratidão desbloqueia a abundância da vida. Ela torna o que temos em suficiente, e mais. Ela torna a negação em aceitação, caos em ordem, confusão em clareza. Ela pode transformar uma refeição em um banquete, uma casa em um lar, um estranho em um amigo. A gratidão dá sentido ao nosso passado, traz paz para o hoje e cria uma visão para o amanhã.”

*Melody Beattie*

*Ao meu orientador Prof. Dr. Francisco G. Nóbrega, por ter me acolhido num período de total desconhecimento científico. Por me mostrar, direta e indiretamente, o quão fascinante é o mundo da pesquisa. Obrigada sempre!*

*A Dra. Marina Nóbrega, pelo seu exemplo de determinação.*

*Ao Dr. Mário Henrique de Barros, pela co-orientação deste trabalho e pelas importantes informações compartilhadas.*

*À Dra. Cláudia Campos, pelo incomensurável apoio técnico, pelas conversas esclarecedoras, pelos conselhos sempre bem-vindos, pela amizade e pelo carinho.*

*Aos colegas do Laboratório de Genética Molecular e Genomas, por tantos anos de convivência e trocas de informações.*

*Aos meus pais, por suportarem e - principalmente - entenderem a minha ausência. Por torcerem por mim, sempre. Pelo amor incondicional. Pelo exemplo de honestidade e integridade.*

*Ao meu irmão, por confiar em mim.*

*À Vó Ny, por ter certeza que a sua neta é a pessoa mais talentosa DESSE MUNDO!*

*À Vó Wanda e ao Vó João, por acreditarem no meu trabalho, mesmo não entendendo muito bem do que se trata!*

*À Amanda, Carol, Kátia, Milena e Tati pela companhia na alegria e na tristeza, na saúde e na doença.*

*Ao Adonis, pela ajuda com o Excel, pela confiança, pela paciência e principalmente pelo o amor ;o)*

*Ao Dr. Humberto, por ouvir minhas reclamações, pelo ombro amigo, por vibrar com as minhas conquistas, enfim, pela fiel amizade.*

*Ao Adam e ao Chico, grandes amigos.*

*À Xan, por continuar sendo uma grande amiga!*

*À Kika, leal companheira.*

*À FAPESP e ao CNPq pelo essencial apoio financeiro.*

*Quanto maior a dificuldade,  
tanto maior o mérito em superá-la.*

(H.W.Beecher)

## RESUMO

A função mais proeminente da mitocôndria é a produção de energia através da fosforilação oxidativa. Para a manutenção de uma organela funcional se faz necessária a total coordenação entre os genomas nuclear e mitocondrial. *Saccharomyces cerevisiae* é um eucarioto que possui várias propriedades adequadas aos estudos biológicos, inclusive aqueles relacionados à respiração celular, pois é um organismo aeróbio facultativo. Teve o genoma sequenciado em 1996, mas ainda há diversas proteínas sem função estabelecida. Com o objetivo de contribuir para o conhecimento da composição protéica funcional da mitocôndria deste levedo, foram realizadas caracterizações fenotípicas e genotípicas prévias dos mutantes nulos de seis ORFs: YDL119C, YDR115W, YDR332W, YER077C, YHR009C e YOR022C. Os estudos *in silico* permitiram sugerir a provável função para as proteínas codificadas pelas ORFs YDL119C – um carreador mitocondrial, YDR115W – componente da subunidade maior do ribossomo mitocondrial e YDR332W – helicase mitocondrial. A análise fenotípica das linhagens mutantes revelou crescimento em meios com carbono não fermentáveis, o que contrariou o esperado, visto que estas foram classificadas no estudo global como deficientes respiratórias. O mutante para a ORF YDR115W apresentou alta instabilidade no DNA mitocondrial, comprovada experimentalmente. Foi realizada complementação homóloga de três linhagens mutantes com as respectivas ORFs, levando à restauração da capacidade respiratória, confirmando a autenticidade dos mutantes adquiridos. Foram realizados experimentos relacionados ao consumo de oxigênio em dois meios de cultura distintos. Visto que as linhagens mutantes – com exceção da mutante para YDR115W - responderam à presença tanto de um desacoplador quanto de um inibidor da fosforilação oxidativa, foi possível caracterizar esse aspecto da capacidade respiratória das mesmas. Este trabalho revelou os cuidados que se deve ter com as indicações derivadas de estudos que avaliam a função gênica de maneira global e indireta.

**Palavras-chave:** *Saccharomyces cerevisiae*, ORF, deficiente respiratório

## ABSTRACT

The most prominent function of the mitochondrion is the production of energy through oxidative phosphorylation. Maintenance of a functional organelle requires the coordination of nuclear and mitochondrial genomes. *Saccharomyces cerevisiae* is an eukaryote particularly suitable for biological studies related to respiration since it is able to survive the loss of respiratory ability. Its genome was sequenced in 1996, but there is still a plenty of proteins with unknown function. With the purpose to contribute to the knowledge of the mitochondrial proteins of this yeast, a preliminary characterization of six null mutants was undertaken: YDL119C, YDR115W, YDR332W, YER077C, YHR009C e YOR022C. *In silico* studies suggested the probable function for the proteins codified by YDL119C – a mitochondrial carrier, YDR115W – a mitochondrial ribosomal protein of the large subunit and YDR332W – a mitochondrial helicase. Phenotype analysis of the mutant strains showed growth in media with not fermentable carbon sources, what was not expected, since those strains were classified as respiratory deficient in a global survey. ORF YDR115W, presented high instability in mitochondrial DNA, which we confirmed experimentally. Homologous complementation of three mutant strains with the respective ORFs was done, leading to restoration of the respiratory capacity, confirming the authenticity of the acquired mutants. Experiments of oxygen consumption in two distinct media were performed. Since the mutant strains - with exception of mutant YDR115W – exhibited the expected response in the presence of an uncoupling agent and an inhibitor of oxidative phosphorylation, their respiratory capacity was confirmed. This work suggests that one has to be careful with the phenotypic profile indicated by global and indirect studies.

**Key-Words:** *Saccharomyces cerevisiae*, ORF, respiratory deficient

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema geral da cadeia transportadora de elétrons	3
Figura 2: Esquema geral da via de importação de proteínas para a mitocôndria	6
Figura 3: Esquema geral do ciclo de vida de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8
Figura 4: Fermentação da glicose	10
Figura 5: Mecanismo de repressão por glicose	11
Figura 6: Via de degradação do glicerol	12
Figura 7: Gliconeogênese	14
Figura 8: Seleção das ORFs.	22
Figura 9: Domínios protéicos presentes na ORF YDL119C, segundo o NCBI Conserved Domain Search.	43
Figura 10: Domínios protéicos presentes na ORF YDR115W, segundo o NCBI Conserved Domain Search	44
Figura 11: Domínios protéicos presentes na ORF YDR332W, segundo o NCBI Conserved Domain Search	44
Figura 12: Domínio protéico presente na ORF YHR009C, segundo o NCBI Conserved Domain Search	45
Figura 13: Domínio protéico presente na ORF YOR022C, segundo o NCBI Conserved Domain Search	46
Figura 14: Ausência de crescimento do mutante $\Delta$ YDR115W em alguns meios com fonte de carbono não-fermentáveis.	47
Figura 15: Geração de petites na inativação da ORF YDR115W.	48
Figura 16: Resultado da análise dos ascospóros viáveis após dissecação da linhagem $\Delta$ YDR115W diplóide.	52
Figura 17: Resultado da dissecação de tétrades de segregantes provenientes do cruzamento de $\Delta$ YDR115W com W303-1B.	54
Figura 18: Análise da resistência a geneticina de quatro grupos de tétrades provenientes do cruzamento do segregante do mutante $\Delta$ YDL119C após cruzamento com W303-1B ( $\Delta$ YDL119C*).	55
Figura 19: Análise do crescimento por série de diluição de um ascóporo proveniente do cruzamento do segregante do mutante $\Delta$ YDL119C após cruzamento com W303-1B ( $\Delta$ YDL119C*).	56
Figura 20: Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% referente às amplificações por PCR das ORFs YDL119C, YDR115W e YOR022C.	59
Figura 21: Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% referente à preparação de DNA total dos mutantes $\Delta$ YDL119C e $\Delta$ YOR022C (haplóide), respectivamente.	60
Figura 22: Esquema representativo da região amplificada no cassete de KanMX4.	61
Figura 23: Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% referente às amplificações diagnósticas do segmento ORF/KanMX4.	61
Figura 24: Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% referente às amplificações diagnósticas do segmento ORF/KanMX4 de $\Delta$ YDR115W diplóide.	62
Figura 25: Análise eletroforética em gel de agarose 1% referente às digestões enzimáticas de dois clones da construção YOR022C/YCplac111.	63
Figura 26: Análise da expressão fenotípica de quatro clones provenientes da transformação da linhagem mutante $\Delta$ YOR022C com a construção YOR022C/YCplac111.	64

Figura 27: Análise da expressão fenotípica de quatro clones provenientes da transformação da linhagem mutante $\Delta YDL119C^*$ .	65
Figura 28: Resultado da dissecação de tétrades da linhagem $\Delta YDR115W$ diplóide transformada com a construção $YDR115W/YCplac33$ .	66
Figura 29: Consumo de oxigênio pela linhagem $\Delta YOR022C$ , em YPD e YPEG.	70
Figura 30: Consumo de oxigênio pelas linhagens $BY4741$ e $\Delta YDR115W$ (haplóide) em YPEG.	71

## LISTA DE TABELAS

Tabela I: Linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Escherichia coli</i> utilizadas neste trabalho	26
Tabela II: Lista de 06 ORFs selecionadas para este estudo	37
Tabela III: Análise da seqüência de endereçamento das ORFs selecionadas	39
Tabela IV: Análise computacional das supostas seqüências de endereçamento mitocondrial das ORFs selecionadas e de 03 proteínas sabidamente mitocondriais com a utilização dos programas TargetP e Mitoprot.	41
Tabela V: Temperaturas de anelamento ( $T_m$ ) fornecidas pelo fabricante e calculadas com a fórmula disponível no “site” da empresa Promega	58
Tabela VI: Tamanhos esperados para os fragmentos provenientes de reação de PCR das ORFs estudadas.	59

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Curva de crescimento das linhagens mutantes e controle em YPEG 30°C.	50
Gráfico 2: Curva de crescimento das linhagens mutantes e controle em YPEG 37°C.	51
Gráfico 3: Curva de crescimento em YPEG 30°C do controle BY4741, do mutante $\Delta$ YDL119C e do segregante do mutante $\Delta$ YDL119C após cruzamento com W303-1B ( $\Delta$ YDL119C*).	56
Gráfico 4: Curva de crescimento YPEG 37°C do controle BY4741, do mutante $\Delta$ YDL119C e do segregante do mutante $\Delta$ YDL119C após cruzamento com W303-1B ( $\Delta$ YDL119C*).	57
Gráfico 5: Variação do consumo de oxigênio das linhagens BY4741, $\Delta$ YDL119C, $\Delta$ YER077C e $\Delta$ YOR022C, em YPD, 30°C.	67
Gráfico 6: Variação do consumo de oxigênio das linhagens BY4741, $\Delta$ YDL119C, $\Delta$ YDR332W, $\Delta$ YER077C, $\Delta$ YHR009C e $\Delta$ YOR022C, em YPEG, 37°C.	68
Gráfico 7: Consumo de oxigênio em <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> .	69

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – antimicina A

AMP – adenosina monofosfato

ADP – Adenosina difosfato

ATP – adenosina trifosfato

BSA – albumina bovina

CaCl<sub>2</sub> – cloreto de cálcio

DNA – ácido desoxirribonucléico

EDTA – ácido etilenodiamino tetracético

FCCP - carbonyl cyanide p-(trifluoro-methoxy) phenylhydrazone

glicerol 3-P – glicerol 3-fosfato

Kb – mil pares de base

L – litro

μL – microlitro

μg - micrograma

mg – miligrama

mL – mililitro

mM - milimolar

M – molar

MAT – tipo de acasalamento (“mating type”)

mt – mitocondrial

NaCl – cloreto de sódio

NaOH – hidróxido de sódio

ng – nanograma

OD – densidade óptica

oligo – oligomicina

ORF – fase aberta de leitura (“open reading frame”); região potencialmente codificante

Ortólogo - um par de genes em duas espécies são ortólogos quando suas respectivas proteínas codificadas apresentam-se 60-80% idênticas em um alinhamento.

°C – graus Célcius

pb: pares de base

PCR - reação em cadeia da polimerase

pH – potencial hidrogeniônico

pet – linhagem de levedura com mutação em genes nucleares envolvidos na respiração celular

PMSF – phenyl methyl sulfonyl fluoride (Gibco BRL)

petites – linhagem de levedura que sofreu uma grande deleção no genoma mitocondrial ( $\rho^-$ )  
ou que não possui DNA mitocondrial ( $\rho^0$ )

RNAse - ribonuclease

rpm – rotações por minuto

SDS – dodecil sulfato de sódio

## Sumário

<b>Sumário .....</b>	<b>1</b>
<b>1- INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1- Mitocôndria .....	1
1.1.1 Complexos respiratórios e a fosforilação oxidativa .....	1
1.1.2 Genoma mitocondrial .....	4
1.1.3 Importação de proteínas .....	4
1.2- <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : eucarioto modelo .....	6
1.3- Utilização de fontes de carbono pela levedura <i>S. cerevisiae</i> .....	8
1.3.1 Utilização da glicose.....	8
1.3.2 Utilização de fontes de carbono não-fermentáveis.....	11
1.3.3 Gliconeogênese.....	12
1.4- Estudos globais envolvendo o genoma de levedura .....	15
1.5- Histórico deste trabalho .....	15
1.6- Análise do genoma mitocondrial do fungo <i>Epidermophyton floccosum</i> .....	19
<b>2- OBJETIVOS .....</b>	<b>20</b>
2.1- Geral.....	20
2.2- Específicos .....	20
<b>3- MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>21</b>
3.1- Análise <i>in silico</i> .....	21
3.1.1- Seleção das ORFs.....	21
3.1.2- Sequências de endereçamento protéico.....	23
3.1.3- Comparação entre as seqüências das ORFs com o banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) e análise dos domínios protéicos.....	23
3.2- Experimentos práticos .....	24
3.2.1- Meios de cultura .....	24
3.2.2- Linhagens .....	25
3.2.3- Análise do fenótipo das linhagens mutantes .....	27
3.2.4- Indução de esporulação em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	28
3.2.5- Análise fenotípica por curva de crescimento .....	29
3.2.6- Extração em pequena escala de DNA de levedura.....	30
3.2.7- Elaboração dos iniciadores para a amplificação das ORFs.....	30
3.2.8- Reações de amplificação .....	32
3.2.9- Eletroeluição, purificação, precipitação e digestão enzimática dos produtos de PCR.....	32
3.2.10- Reação de ligação.....	33
3.2.11- Preparação de células competentes e transformação bacteriana .....	33
3.2.12- Mini-preparação plasmidial por lise alcalina .....	34
3.2.13- Digestão enzimática para confirmação da ligação do inserto no vetor .....	35
3.2.14- Transformação de levedura – Complementação homóloga .....	35
3.2.15- Consumo de oxigênio.....	36
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>37</b>
4.1- Análise <i>in silico</i> .....	37
4.1.1- ORFs selecionadas .....	37
4.1.2- Análise das seqüências de endereçamento protéico.....	37
4.1.3- Domínios protéicos e comparação de seqüências .....	42
4.2 Experimentos realizados.....	46
4.2.1- Fenótipo das linhagens mutantes .....	46

4.2.2- Curva de crescimento .....	49
4.2.3- Experimentos envolvendo dissecção de tétrades .....	51
4.2.4- Análise das ampliações .....	57
4.2.5- Confirmação das construções nos vetores por digestão enzimática.....	62
4.2.6 - Transformação homóloga em levedura .....	63
4.2.6- Consumo de Oxigênio .....	66
<b>5- DISCUSSÃO .....</b>	<b>72</b>
5.1- Análises in silico: .....	74
5.1.1- YDL119C .....	74
5.1.2- YDR115W .....	75
5.1.3- YDR332W .....	77
5.1.4- YER077C .....	79
5.1.5- YHR009C .....	79
5.1.6- YOR022C .....	80
5.2 – Análise fenotípica .....	81
5.2.2- Transformação homóloga.....	83
5.2.3- Mutante YDR115W .....	84
<b>6- CONCLUSÕES.....</b>	<b>89</b>
<b>7- GENOMA MITOCONDRIAL DE <i>Epidermophyton floccosum</i> .....</b>	<b>90</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>93</b>
<b>Anexo 1 – Comitê de Ética em Pesquisa .....</b>	<b>102</b>

## 1- INTRODUÇÃO

### 1.1- Mitocôndria

A mitocôndria é uma organela complexa presente nas células eucarióticas. Possui membrana externa e interna, espaço intermembranar e matriz. Diferente das demais organelas - com exceção dos cloroplastos em células vegetais e dos hidrogenossomos em *Nyctotherus ovalis* (BOXMA *et al.*, 2005) - possui seu próprio genoma.

Para a formação e manutenção de uma organela funcional é necessário que haja a expressão coordenada do genoma nuclear e mitocondrial, que por sua vez envolve a síntese dos polipeptídeos no citoplasma da célula o endereçamento e a importação dos produtos gênicos nucleares e finalmente a montagem destes em complexos protéicos ao longo da membrana interna da mitocôndria, juntamente com os polipeptídeos sintetizados na organela. (TRUSCOTT; BRANDER; PFANNER, 2003).

#### 1.1.1 Complexos respiratórios e a fosforilação oxidativa

A mitocôndria é responsável por diversos processos metabólicos na célula como, por exemplo, o metabolismo dos ácidos tricarbóxicos pelas enzimas do ciclo de Krebs, a montagem dos centros ferro/enxofre, a degradação oxidativa dos ácidos graxos, a biossíntese de certas moléculas, como o grupo heme. Esta organela também está intimamente associada ao controle da morte celular (NEWMAYER; FERGUSON-MILLER, 2003), porém, a função mais estudada é a de produtora da maior parte de energia da célula, através da fosforilação oxidativa.

Neste processo, elétrons são transportados através de moléculas carregadoras distribuídas pelos quatro complexos respiratórios, localizados na membrana interna da mitocôndria. A passagem dos elétrons por estes complexos libera energia que é armazenada como um gradiente de prótons através da membrana, posteriormente utilizado pela ATP

sintase para produzir ATP a partir de ADP, (SARASTE, 1999), como pode ser observado na Figura 1.

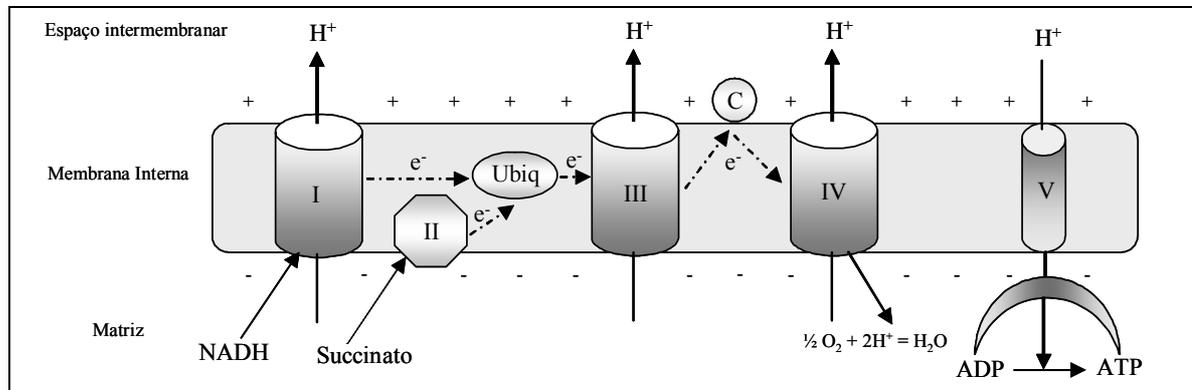
O complexo I – NADH: ubiquinona oxirredutase, em mamíferos, é o maior dos complexos, porém, em *Saccharomyces cerevisiae* pode ser considerado ausente, onde uma NADH: ubiquinona oxirredutase alternativa é a única enzima que oxida o NADH intramitocondrial, sendo incapaz de translocar prótons (LUTTIK *et al.*, 1998; KERSCHER, 2000). O complexo II – succinato: ubiquinona redutase, é o único componente do ciclo de Krebs presente na membrana e não na matriz mitocondrial; participa da cadeia transportadora de elétrons transferindo elétrons do succinato para a ubiquinona e não contribui para a formação do gradiente de prótons. As características hidrofóbicas da ubiquinona permitem sua mobilidade na fase lipídica da membrana, ao contrário dos outros componentes da cadeia, que têm posições relativamente estáveis.

O complexo III – citocromo *bc<sub>1</sub>* entrega elétrons da ubiquinona para o citocromo *c*. A transferência de elétrons da ubiquinona para os componentes do complexo III e deste para o citocromo *c* são acompanhadas de liberação de prótons para o espaço intermembranar. O citocromo *c*, por sua vez é localizado na face externa da membrana interna e transporta os elétrons recebidos do complexo III para a citocromo *c* oxidase.

O complexo IV – citocromo oxidase é responsável pela doação de quatro elétrons para a molécula de oxigênio ( $O_2$ ), que, ligando-se a prótons do meio, converte-se em duas moléculas de água ( $H_2O$ ). A retirada de prótons da matriz mitocondrial contribui para o estabelecimento do gradiente de prótons; além dessa retirada, o complexo IV bombeia prótons ativamente para o meio intermembranar.

O bombeamento de  $H^+$  para fora da matriz gera uma diferença de potencial eletroquímico e produção de energia estocada. Como a membrana interna da mitocôndria é

impermeável a prótons, a passagem deles pela ATP sintase (complexo V), libera energia que é a força próton motriz para sintetizar ATP (SARASTE, 1999).



**Figura 1: Esquema geral da cadeia transportadora de elétrons**

(Adaptado de SARASTE, 1999). Complexos enzimáticos da membrana interna da mitocôndria envolvidos na fosforilação oxidativa. Em *S. cerevisiae*, não ocorre translocação de prótons pelo Complexo I.

Para promover o ajuste da produção de ATP ao seu gasto, o transporte de elétrons e a síntese de ATP são processos intimamente acoplados. Existem três classes de bloqueadores capazes de cessar a síntese de ATP pela mitocôndria: os desacopladores, os inibidores e os ionóforos (transportadores de íons) (TZAGOLOFF, 1982).

Desacopladores são compostos lipofílicos, portanto capazes de atravessar as membranas e que possuem propriedades de ácidos fracos, associando-se a prótons no exterior da mitocôndria e liberando-os na matriz, desfazendo o gradiente de prótons necessário à síntese de ATP, levando a dissipação de energia sob a forma de calor. Dentre os diferentes tipos de desacopladores, um dos mais usados é o “carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone” – CCCP – ou o “carbonyl cyanide p-(trifluoro-methoxy) phenylhydrazone” – FCCP – (TZAGOLOFF, 1982).

Os inibidores da fosforilação oxidativa também cessam a síntese de ATP, porém agem de maneira distinta dos desacopladores. Um dos inibidores mais conhecidos é a oligomicina, que inibe o componente  $F_0$  da ATP sintase. Os demais inibidores podem atuar sobre

complexos específicos da cadeia transportadora de elétrons, como a antimicina A, inibidora do complexo III e a rotenona, inibidora do complexo I (TZAGOLOFF, 1982).

### 1.1.2 Genoma mitocondrial

Enquanto em vertebrados, de um modo geral, o DNA mitocondrial possui cerca de 16kb, no reino fungi, o genoma mitocondrial varia em média de 20Kb a 80Kb (BULLERWELL; LANG, 2005) sendo estas diferenças resultado da presença de longas regiões intergênicas e de um número variado de íntrons. O genoma mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae* possui em torno de 85.8Kb. Codifica o apocitocromo b (*COB*), as subunidades 1, 2 e 3 do complexo IV, subunidades 6, 8 e 9 do complexo V além de uma proteína associada ao ribossomo (*VARI*), as subunidade maior e menor do RNA ribossomal e 24 tRNAs (LANGKJØR *et al.*, 2003).

### 1.1.3 Importação de proteínas

Há aproximadamente 1000 proteínas mitocondriais (TRUSCOTT; BRANDER; PFANNER, 2003) sendo que a maioria é codificada por genes nucleares, sintetizadas nos ribossomos citoplasmáticos, como pré-proteínas e assim transportadas para a organela. As pré-proteínas possuem uma seqüência de endereçamento, a qual é localizada geralmente na sua porção amino-terminal, contendo entre 10-80 resíduos, com praticamente nenhum consenso. Observa-se a predominância de aminoácidos básicos e hidrofóbicos, e a formação de uma  $\alpha$ -hélice anfipática, importante no reconhecimento pelo complexo de importação. Porém muitas proteínas podem conter a sinalização difundida ao longo da seqüência (TRUSCOTT; BRANDER; PFANNER, 2003).

Depois da síntese do precursor no citosol, chaperonas Hsp70 (proteína de choque térmico de 70 kDa) e MSF (fator de estimulação de importação mitocondrial) são capazes de

reconhecer, proteger e fazer com que o dobramento deste seja passível de importação. Ao atingir a maquinaria de importação, entram em contato com o complexo TOM (translocase da membrana externa), o qual é composto por receptores e pelo poro geral de importação (GIP).

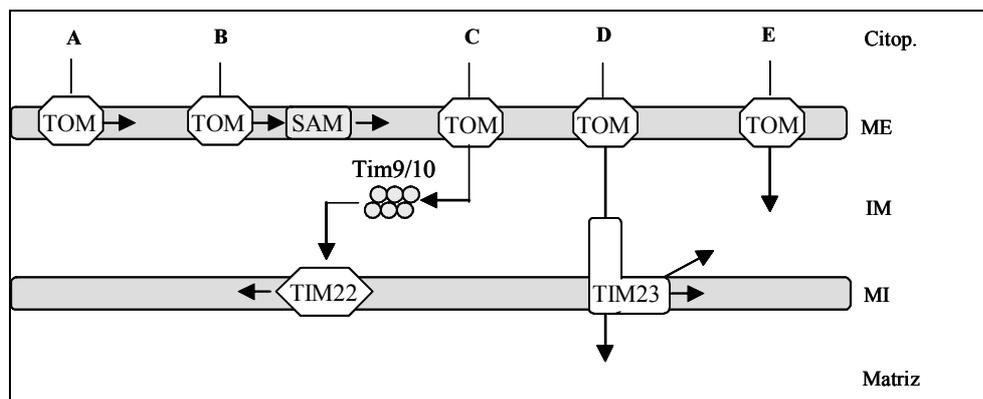
Tom20p e Tom70p são os receptores primários (TRUSCOTT; BRANDER; PFANNER, 2003), sendo que Tom20p para casos de endereçamento N-terminal e Tom70p para endereçamento disperso ao longo do precursor, como ocorre nos membros da família de carreadores mitocondriais. Outro exemplo de seqüência de localização dispersa está na proteína Bcs1p (NÓBREGA; NÓBREGA; TZAGOLOFF, 1992), a qual possui função de uma chaperona ATP-dependente atuante na montagem do complexo citocromo  $bc_1$ .

O complexo TOM está envolvido na inserção de proteínas na membrana externa com segmento transmembrana único, assim, aquelas que possuem uma topologia mais complexa, são transferidas para uma maquinaria especial chamada SAM (maquinaria de seleção e montagem da membrana externa), como pode ser observado na Figura 2.

As proteínas da membrana interna também são transportadas via TOM. Um exemplo são os carreadores mitocondriais, os quais possuem múltiplos segmentos transmembranas (Figura 2). Assim que o precursor é exposto no espaço intermembranar, é reconhecido pelas proteínas solúveis Tim9p e Tim10p, as quais o direcionam para o complexo TIM22 (CHACINSKA; REHLING, 2004). Este complexo recebe a pré-proteína com sinalização ao longo da seqüência e catalisa sua inserção na membrana interna, processo dependente do potencial da membrana interna (KOEHLER, 2004).

As proteínas destinadas à matriz mitocondrial possuem endereçamento N-terminal, são importadas via GIP, sendo recebidas pela proteína Tim23p, que atravessa o espaço intermembranar servindo de guia para a pré-proteína chegar até o complexo TIM23, localizado na membrana interna, e desta forma chegar à matriz. Este complexo também é capaz de inserir algumas proteínas com sinalização N-terminal na membrana interna, assim

como selecionar aquelas destinadas ao espaço inter-membranas (TRUSCOTT; BRANDER; FANNER, 2003). Em outros casos a importação de algumas proteínas para o espaço intermembranar depende apenas do complexo TOM.



**Figura 2: Esquema geral da via de importação de proteínas para a mitocôndria**

(Adaptado de TRUSCOTT; BRANDER; PFANNER, 2003). A) Pré-proteínas com segmento transmembrana único são transportadas pelo complexo TOM e inseridas na membrana externa (ME). B) Precusores de proteínas complexas são translocados pelo complexo TOM; sua inserção e montagem na membrana externa requer o complexo SAM. C) Precusores com endereçamento disperso ao longo da sequência são transportados via TOM, guiados por proteínas Tim através do espaço inter-membranas (IM) até o complexo TIM22, o qual medeia sua inserção na membrana interna (MI). D) Proteínas mitocondriais que possuem endereçamento N-terminal utilizam TOM e TIM23 para serem transportadas até a matriz, ou para a membrana interna ou para o espaço intermembranas. E) A importação de algumas proteínas para o espaço intermembranar depende apenas do complexo TOM.

### 1.2- *Saccharomyces cerevisiae*: eucarioto modelo

*S. cerevisiae* possui, em sua forma haplóide, 16 cromossomos bem caracterizados, os quais variam de 200 a 2200 Kb. Seu genoma foi totalmente sequenciado em abril de 1996 com a identificação de 6183 ORFs – fase aberta de leitura, ou seja, regiões potencialmente codificantes. Contrastando com os organismos multicelulares, possui genoma altamente compactado, onde 72% do DNA é codificante e apenas 3,8% das ORFs contém íntrons (GOFFEAU *et al.*, 1996).

Algumas das propriedades que fazem de *S. cerevisiae* um organismo particularmente adequado aos estudos biológicos incluem:

- Ciclo de vida rápido, a cada 90 minutos uma cultura dobra sua massa celular (SHERMAN, 1998);
- Sendo um organismo não patogênico, pode ser manuseado com poucas precauções (SHERMAN, 1998);
- Durante a fase vegetativa, sua reprodução ocorre por brotamento, cada broto recebe uma cópia de todos os genes nucleares da célula mãe assim como parte do citoplasma da mesma, incluindo as mitocôndrias e demais organelas. (LOGAN, 2003). Células haplóides podem existir como dois tipos celulares no que diz respeito ao fator sexual ou tipo de acasalamento: são designadas “a” e “α” (Figura 3). O zigoto diplóide é resultado da fusão de células de tipos de acasalamento opostos. Em meio de cultura rico, os diplóides também se reproduzem por brotamento. Em condições de substrato limitante, com fonte de carbono pobre, a célula é induzida à esporulação, processo formador de quatro esporos haplóides (2 “a” e 2 “α”) , os quais, em meio rico, iniciarão um novo ciclo (TZAGOLOFF, 1982).
- Levedo de fácil manipulação genética, o que possibilita a geração e análise de mutantes tanto no genoma nuclear quanto mitocondrial;
- Plasmídeos podem ser introduzidos nas células da levedura como moléculas replicativas ou para integração no genoma;
- Em contraste com a maioria dos outros organismos, a recombinação integrativa do DNA transformante em *S. cerevisiae* procede exclusivamente via recombinação homóloga, assim, DNA exógeno que possui pelo menos um segmento homólogo ao DNA do levedo pode ser direcionado para uma região específica do genoma. Um uso muito importante desta técnica seria a conversão de genes selvagens em alelos “interrompidos”, com a perda da função original (SHERMAN, 1998).
- Organismo muito interessante para o estudo da mitocôndria, pois pode sobreviver a mutações que geram células que obtém energia de maneira independente da respiração, ou

seja, exclusivamente por fermentação de substratos apropriados como a glicose ou galactose (EPHRUSSI; SLONIMSKI, 1955). Fato de especial interesse para este laboratório, cujo enfoque de pesquisa são os genes relacionados à respiração celular.

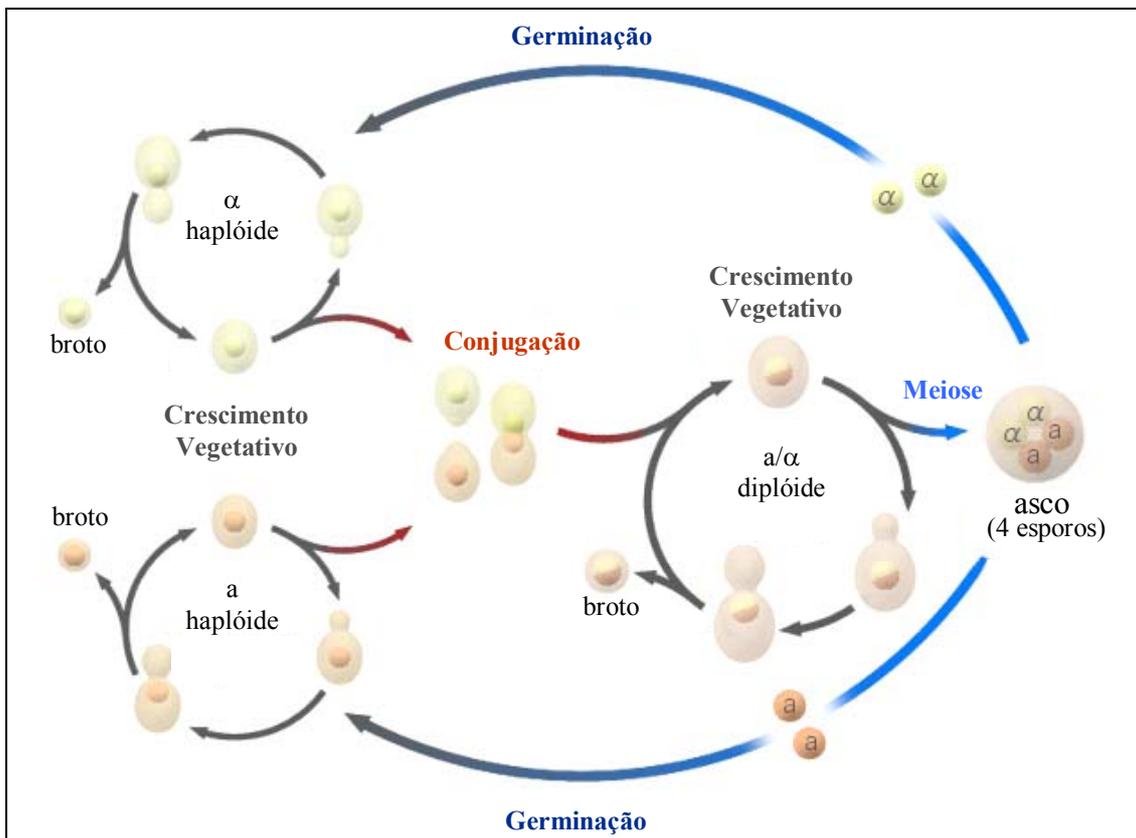


Figura 3: Esquema geral do ciclo de vida de *Saccharomyces cerevisiae*

### 1.3- Utilização de fontes de carbono pela levedura *S. cerevisiae*

#### 1.3.1 Utilização da glicose

*S. cerevisiae* é capaz de utilizar diversas fontes de carbono, porém os açúcares são os substratos preferidos, principalmente os monossacarídeos facilmente fermentáveis, como glicose e frutose. Substratos não fermentáveis como etanol, glicerol, lactato e acetato também podem ser utilizados (SCHÜLLER, 2003).

É um fungo que tende fermentar a oxidar glicose, mesmo na presença de oxigênio (o processo de fermentação da glicose pode ser observado na Figura 4). Para que isto ocorra, esta

dispõe de dois mecanismos: 1) reprime a síntese de várias enzimas que são necessárias para a oxidação da glicose, como os componentes da cadeia transportadora de elétrons, as enzimas necessárias para a utilização de fontes de carbono alternativas e enzimas da gliconeogênese e; 2) induz a expressão dos genes necessários para a utilização da glicose, incluindo genes codificadores das enzimas glicolíticas e transportadores de glicose (SCHÜLLER, 2003).

Os componentes centrais da principal via de repressão de genes por glicose são: Mig1p, um repressor transcricional (ÖSTLING; CARLBERG; RONNE, 1996) e o complexo SNF1 cinase (JOHNSTON, 1999).

Mig1p se liga ao promotor de vários genes reprimidos por glicose, impedindo a transcrição. A localização celular de Mig1p é regulada por glicose. Essa regulação está associada à atividade do complexo SNF1, que por sua vez está relacionada à presença ou ausência de glicose. Este açúcar inibe a atividade de SNF1, sendo assim Mig1p permanece desfosforilado. Uma vez desfosforilado, Mig1p migra para o núcleo, reprimindo a expressão dos genes alvo. Havendo remoção da glicose, SNF1 é ativado, o que gera a fosforilação de Mig1p, o qual deixa o núcleo, resultando na desrepressão dos genes alvo (JOHNSTON, 1999). Este processo está esquematizado na Figura 5.

A disponibilidade de AMP é diminuída durante o crescimento da célula na presença de glicose, devido à geração de ATP pela glicólise. A atividade do complexo SNF1 cinase é correlacionada com a razão AMP:ATP e ADP:ATP, a qual aumenta rapidamente cerca de 200 quando a disponibilidade de glicose é esgotada (JOHNSTON, 1999).

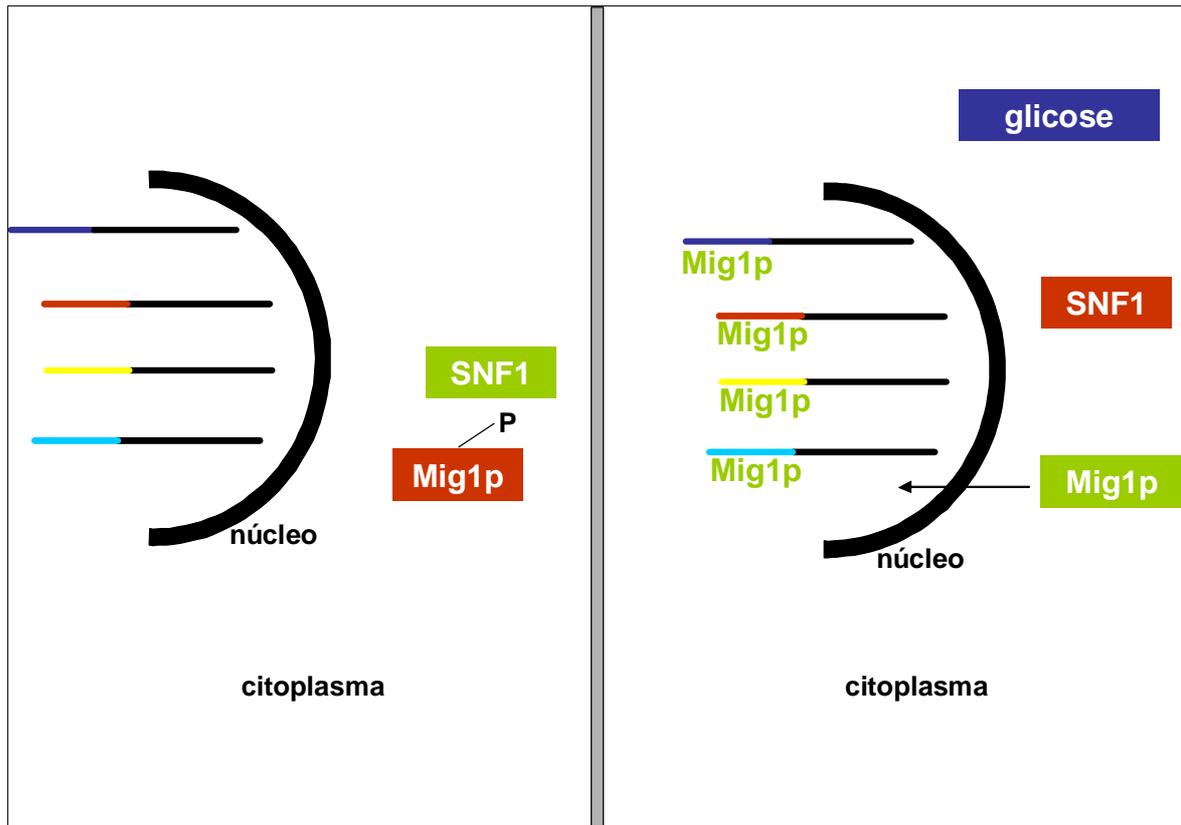
Isso sugere que em células que acabaram de entrar em contato com glicose, a concentração de AMP é alta, levando à inativação do complexo SNF1, permitindo que Mig1p desempenhe seu papel de repressor transcricional. Ao longo do tempo, com o processo de fermentação e conseqüente geração de ATP, a disponibilidade de AMP é reduzida,

ocasionando a ativação de SNF1, liberando a transcrição dos genes alvos (JOHNSTON, 1999).



**Figura 4: Fermentação da glicose**

(Adaptado do Saccharomyces Genome Database). É importante notar que são formadas duas moléculas de gliceraldeído 3-P. As reações irreversíveis são indicadas pelas setas vermelhas.

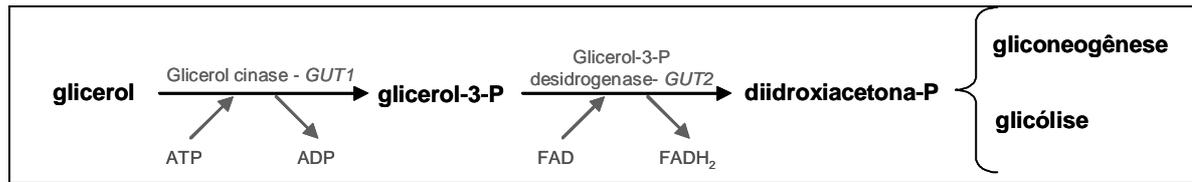


**Figura 5: Mecanismo de repressão por glicose**  
(Adaptado de JOHNSTON, 1999)

### 1.3.2 Utilização de fontes de carbono não-fermentáveis

Entre as principais fontes de carbono não fermentáveis estão o glicerol, o etanol, o acetato, o lactato e o oleato.

Em células crescidas em glicerol, o transporte se dá através do produto gênico de *GUP1* (proteína da membrana plasmática – “glycerol uptake”). Dentro da célula é convertido em glicerol 3-P pela enzima Gut1p (glicerol cinase) e em DHAP (diidroxiacetona fosfato) pela Gut2p (glicerol 3-p desidrogenase), a qual segue na via glicolítica ou na gliconeogênese (Figura 6). *GUT1* e *GUT2* são ambos regulados transcricionalmente pela fonte de carbono.



**Figura 6: Via de degradação do glicerol**

(Adaptado do Saccharomyces Genome Database). Processo mediado pelos produtos gênicos de GUT1 e GUT2. Gut1p codifica uma glicerol cinase que converte glicerol em glicerol 3-P, no citoplasma. Este segue para a mitocôndria, onde é convertido à DHAP, por Gut2p, uma glicerol 3-p desidrogenase. DHAP retorna ao citoplasma, entrando na via glicolítica ou na gliconeogênese.

Como já foi dito, leveduras crescendo em meios ricos em açúcar irão fermentar, com produção de etanol. Quando o açúcar se esgota, as células começam a utilizar o etanol como fonte de carbono, em condições aeróbicas. Essa transição entre o crescimento anaeróbico para o aeróbico, devido ao esgotamento da fonte de carbono fermentável é chamada transição diauxica (etanol e acetato também podem entrar na célula por difusão passiva) (SCHÜLLER, 2000).

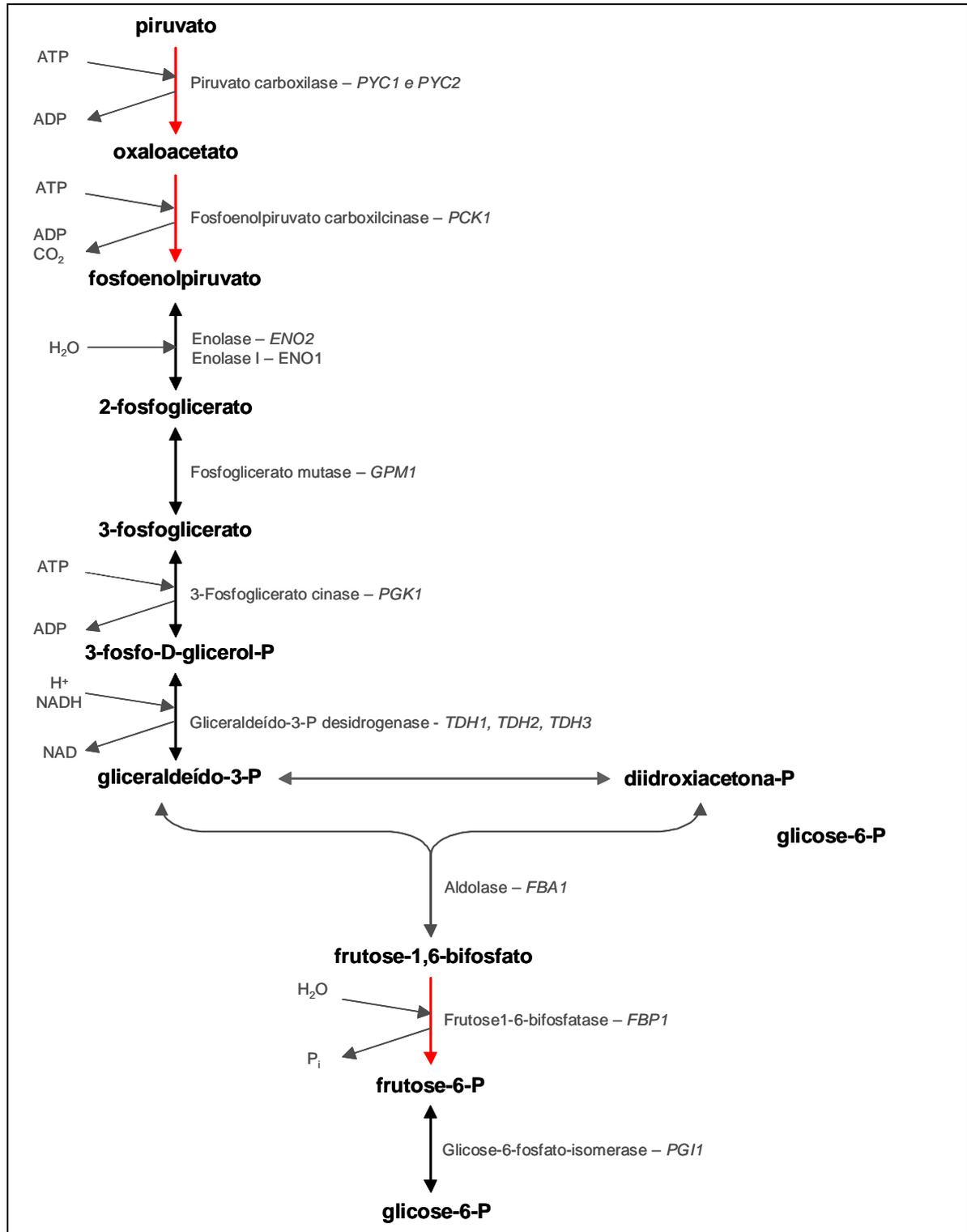
Depois da mudança de uma alta concentração de açúcar para o crescimento em fonte de carbono não fermentável, muitos genes que codificam enzimas relevantes para o metabolismo da glicose e etanol sofrem mudanças significativas nos níveis de expressão. A expressão de genes relacionados ao metabolismo oxidativo aumenta enquanto os genes relacionados ao metabolismo fermentativo têm sua expressão diminuída (De RISI; IYER; BROWN, 1997).

### 1.3.3 Gliconeogênese

Gliconeogênese é nome dado ao processo de produção celular de glicose a partir de fontes de carbono não fermentáveis como piruvato, aminoácidos e glicerol (o processo de gliconeogênese pode ser observado na Figura 7 (RANDEZ, *et al.*, 1997).

Diversos produtos gênicos são envolvidos neste processo, mas o gene *CAT8* possui importante destaque na ativação de genes da gliconeogênese (RANDEZ, *et al.*, 1997).

O gene *CAT8* codifica uma proteína que medeia a expressão de um número de genes diante da transição diauxica. Estudos genômicos mostram que ao menos 30 genes que codificam enzimas para a gliconeogênese, para a utilização de etanol e para o ciclo do glioxilato são reguladas por Cat8p. Com abundância de glicose a expressão de *CAT8* é reprimida pela proteína Mig1p, quando a disponibilidade de glicose cai, Mig1p é fosforilado pelo complexo protéico SNF1 cinase e transportado para o citoplasma, liberando a expressão de Cat8p (RANDEZ, *et al.*, 1997).



**Figura 7: Gliconeogênese**  
(Adaptado do Saccharomyces Genome Database).

#### 1.4- Estudos globais envolvendo o genoma de levedura

Apesar do genoma de *S. cerevisiae* ter sido seqüenciado há 10 anos, seu proteoma ainda está longe de ser completado. Segundo Prokisch *et al* (2004), cerca de 30 a 40% das proteínas previstas para a constituição da mitocôndria ainda são consideradas desconhecidas mesmo com os inúmeros trabalhos globais que vem sendo realizados com essa finalidade, como o de identificação sistemática de proteínas mitocondriais por análise da expressão do mRNA em diferentes condições (De RISI; IYER; BROWN, 1997; LASCARIS *et al.*, 2003 *apud* PROKISCH *et al.*, 2004), estudos de localização em larga escala (KUMAR *et al.*, 2002 *apud* PROKISCH *et al.*, 2004) e classificação de ORFs por análise fenotípica (DIMMER *et al.*, 2002; STEINMETZ *et al.*, 2002).

Trabalhos como o de Steinmetz *et al.* (2002) vem ratificar a importância da total compreensão do genoma deste levedo. No trabalho de Steinmetz *et al.* (2002) foram analisados mutantes homocigotos e heterocigotos de levedura, em 9 diferentes meios de cultura, com o intuito de rastrear aqueles relacionados à atividade respiratória mitocondrial. Depois desta análise, buscou-se os genes mitocondriais humanos ortólogos aos de *S. cerevisiae*, com o objetivo de identificar novos genes mitocondriais humanos envolvidos em doenças genéticas e conseguiram selecionar 11 novos candidatos possivelmente associados à mitocondriopatias.

#### 1.5- Histórico deste trabalho

O grupo de pesquisa do qual esta dissertação faz parte vem contribuindo para a compreensão do genoma mitocondrial (MACINO, *et al.*, 1979; BONJARDIM; NÓBREGA, 1984; BONJARDIM; PEREIRA; NÓBREGA, 1996;) e para a determinação da função de

genes nucleares envolvidos na respiração celular (NÓBREGA; NÓBREGA; TZAGOLOFF, 1990; NÓBREGA; NÓBREGA; TZAGOLOFF, 1992; SOUZA *et al.*, 2000).

De acordo com esta linha de pesquisa e seguindo alguns critérios que serão explicados adiante em Material em Métodos, foram previamente selecionadas oito ORFs de *S. cerevisiae*, sendo elas: YCR024C, YDL119C, YDR115W, YDR316W, YDR332W, YGR257C, YHR009C e YOR022C, cujos fenótipos estão possivelmente relacionados à atividade mitocondrial, segundo Steinmetz *et al.* (2002).

Posteriormente verificou-se que, apesar da ausência de informação no portal SGD – “*Saccharomyces* Genome Database” (na época da confecção deste projeto), a ORF YCR024C já havia sido caracterizada por Landrieu *et al.* (1997) como um gene estrutural de uma asparaginil t-RNA sintetase em mitocôndrias de levedura. Atualmente está descrita como “ORF verificada” no mesmo portal e recebeu o nome de *SLM5*.

A ORF *MTM1/YGR257C*, segundo Luk *et al.* (2003), é um membro da família de carreadores mitocondriais (**M**anganese **t**raffickind factor for **m**itochondrial *SOD2* – um fator carreador de íon magnésio que compões uma superóxido dismutase que desempenha papel fundamental contra o estresse oxidativo mitocondrial); quando o projeto foi proposto a ORF em questão apresentava-se como “não identificada”.

Lemaire *et al* (2004), estudaram a ORF YDR316W e descobriram que seu produto gênico é uma proteína integral da membrana interna mitocondrial, possuindo um domínio conservado de metiltransferase.

Estas descobertas fizeram com que essas três ORFs fossem excluídas do trabalho. No decorrer do estudo, a ORF YER077 foi incluída.

Assim, neste trabalho de mestrado pretendeu-se realizar caracterizações fenotípicas e genotípicas prévias de seis ORFs de *S. cerevisiae*, sendo elas: YDL119C, YDR115W,

YDR332W, YER077C, YHR009C e YOR022C, a fim de contribuir para a ampliação do entendimento da composição protéica funcional da mitocôndria.

Os mutantes para estas ORFs selecionadas são viáveis sendo que este parâmetro tem como referência o trabalho de global de Giaever *et al.* (2002), e exibem falha de crescimento em meios contendo carbono não fermentáveis, segundo o trabalho de Steinmetz *et al.* (2002).

Abaixo seguem descrições do que é conhecido sobre cada uma das ORFs.

#### **YDL119C (cromossomo IV)**

Um dos trabalhos que referencia a ORF YDL119C é o de Belenkiy *et al.* (2000), o qual estuda as proteínas transportadoras mitocondriais, analisando novas seqüências e verificando a presença de consensos. Nesta pesquisa é relatada a existência de 35 genes cujas proteínas são prováveis transportadores mitocondriais, onde YDL119C está incluída.

Na revisão realizada por Arco; Satrústegui (2005), com base no trabalho de El Moulaj *et al.* (1997), foram listadas 34 ORFs cujos produtos protéicos ou foram confirmados como carreadores mitocondriais ou são potenciais candidatos a esta função. Estas foram separadas por categorias de acordo com os metabólitos que transportam, sendo que a ORF YDL119C (designada para esta função por similaridade de seqüência) está contida no grupo de transportadores de cofatores mitocondriais, citrato e metabólitos relacionados.

#### **YDR115W (cromossomo IV)**

Gan *et al.* (2002) classificaram a ORF YDR115W como uma proteína ribossomal mitocondrial, de acordo com sua similaridade à proteína ribossomais bacteriana L34. Porém, o produto gênico não foi testado experimentalmente como tal, nem o seu crescimento em meios de cultura distintos. Askree *et al.* (2004) fizeram uma ampla classificação das ORFs de *S. cerevisiae* relacionadas ao metabolismo dos telômeros, através da análise de mutantes para estas ORFs. Determinaram que 173 genes - responsáveis por diversas funções - estão

envolvidos neste processo. A deleção na ORF YDR115W é responsável por uma leve diminuição no comprimento do telômero.

#### **YDR332W (cromossomo IV)**

Shiratori *et al.* (1999) realizaram um estudo de identificação, classificação e caracterização sistemática de ORFs relacionadas à atividade de DNA helicase e RNA helicase em *Saccharomyces cerevisiae*. Segundo os autores, a ORF YDR332W deve estar envolvida no processamento de ácidos nucleicos na mitocôndria.

Luban *et al.* (2005) realizaram uma análise sistemática de proteínas nucleares envolvidas no processamento de íntrons do Grupo II, na mitocôndria de levedura e classificaram a ORF YDR332W como possivelmente envolvida neste processo. Segundo eles, YDR332W apresenta baixa similaridade com o gene MSS116, que codifica para uma proteína DEAD-box requerida para o processamento de íntrons mitocondriais.

#### **YER077C (cromossomo V)**

As informações referentes à ORF YER077C são bastante escassas, constando apenas os trabalhos globais citados anteriormente, Giaever *et al.* (2002) e Steinmetz *et al.* (2002). Há registro de outros porém são pouco informativos para esta ORF.

#### **YHR009C (cromossomo VIII)**

Rout *et al.* (2000) em seu trabalho global, definiram sistematicamente os componentes do complexo do poro nuclear de levedura, onde a ORF YHR009C foi referenciada, porém não há nenhum trabalho individual relacionado a esta ORF.

**YOR022C (cromossomo X)**

A ORF YOR022C, segundo Higgs *et al.* (1998), apresenta similaridade com uma fosfolipase que catalisa a hidrólise de ácidos fosfatídicos em testículos de bovinos. Os demais trabalhos referentes a esta ORF são os globais de Giaever *et al.* (2002) e Steinmetz *et al.* (2002).

**1.6- Análise do genoma mitocondrial do fungo *Epidermophyton floccosum***

Durante este mestrado surgiu a possibilidade de colaboração com o aluno, agora Doutor José Humberto Machado Tambor. A proposta consistia em seqüenciar por completo o genoma mitocondrial do fungo *Epidermophyton floccosum*, realizar as respectivas anotações dos genes e estabelecer considerações filogenéticas a respeito deste organismo.

*E. floccosum* é um dermatófito de distribuição mundial, que causa infecções na pele (*tinea pedis*, *tinea cruris* e *tinea corporis*) e unhas (onicomicose) de humanos. Dermatófitos são fungos que causam infecção superficial em tecidos queratinizados, sendo constituídos pelos gêneros *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton*, que possuem características morfológicas, fisiológicas e antigênicas que permitem o seu relacionamento.

Com exceção de *T. rubrum* (parcialmente sequenciado), nenhum outro dermatófito havia tido seu mtDNA seqüenciado. Além de haver pouca informação sobre o *E. floccosum*, foi um estudo valioso para o laboratório, de acordo com o interesse de pesquisa.

O DNA mitocondrial traz regiões conservadas e outras variadas que podem ser utilizadas como marcadores para o estudo populacional e diversidade destes organismos de importância médica.

Visto que este trabalho já foi publicado, o material e métodos encontram-se no manuscrito em anexo e este assunto será tratado como trabalho complementar.

## 2- OBJETIVOS

### 2.1- Geral

Ampliar o conhecimento sobre genes nucleares de *Saccharomyces cerevisiae* importantes para a respiração celular e função mitocondrial.

### 2.2- Específicos

Caracterizar preliminarmente as ORFs YDL119C, YDR115W, YDR332W, YER077C, YHR009C e YOR022C de *Saccharomyces cerevisiae*, através de:

- 1) Recursos computacionais de análise de bancos de dados para buscar proteínas semelhantes de levedura similares à de outros organismos, bem como identificar domínios funcionais e possíveis indícios de seqüências de endereçamento organelar;
- 2) Análise fenotípica do crescimento em meios fermentáveis e não fermentáveis;
- 3) Complementação homóloga em levedura;

### **3- MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1- Análise *in silico***

##### **3.1.1- Seleção das ORFs**

Com base nos resultados do trabalho de Steinmetz *et al.* (2002), encontrava-se disponível no portal SGD (Saccharomyces Genome Database, acesso em maio de 2003), uma tabela contendo 498 ORFs relacionadas com deficiência respiratória. Destas, 96 não haviam sido definidas, segundo o SGD, ou seja, várias ORFs já foram minuciosamente estudadas, porém muitas outras foram analisadas apenas em estudos sistemáticos globais, como este em questão, necessitando assim de análises qualitativas para que a função do produto gênico fosse realmente estabelecida.

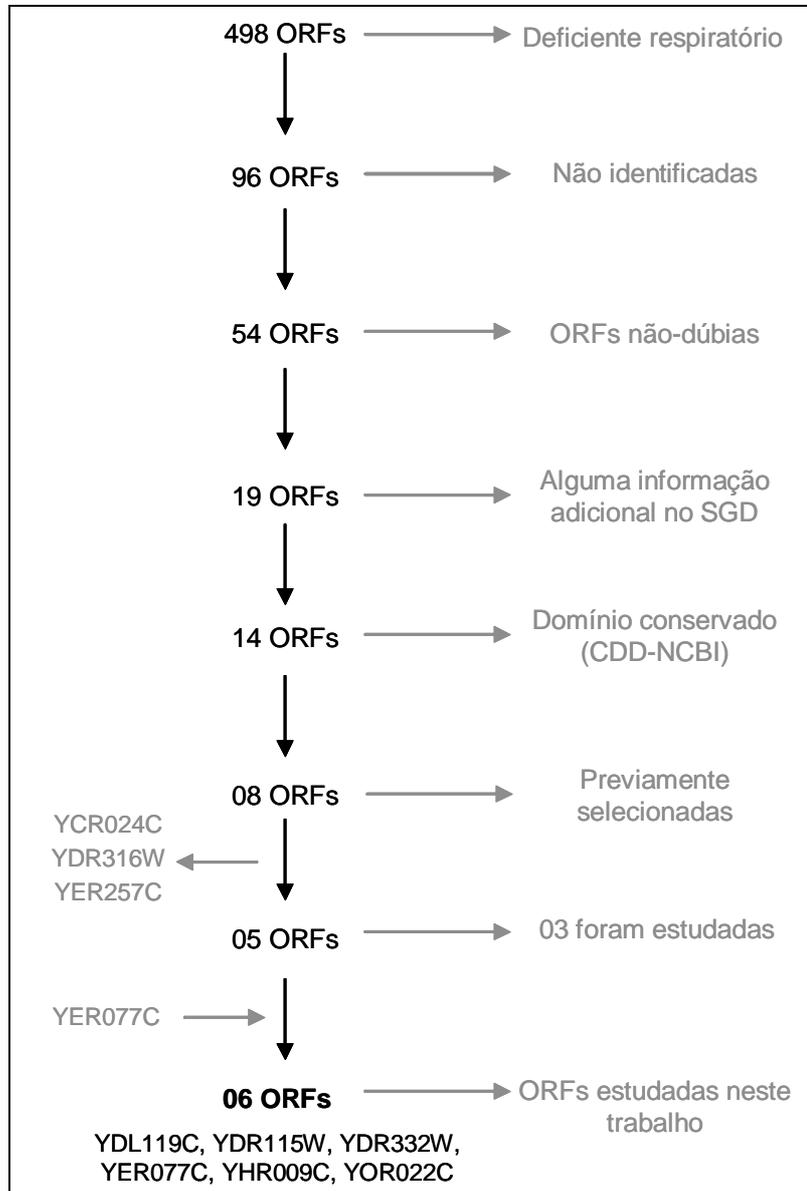
Estes genes putativos foram examinados um a um. As ORFs dúbias - que apresentam sobreposição com ORFs vizinhas – foram retiradas, restando 54 não caracterizadas.

Fazendo-se uma análise mais detalhada de cada uma delas, ainda de acordo com o portal do SGD, levando em conta os parâmetros função molecular, processo biológico, compartimento celular e fenótipo, foi possível verificar que 35 ORFs apresentavam apenas a característica "desconhecido" para os três primeiros parâmetros citados acima, sendo que o fenótipo era o geral: deficiente respiratório e alelo nulo viável em YPD.

Restaram então 19 ORFs, as quais foram analisadas quanto aos domínios protéicos existentes e identificáveis, através da ferramenta CDD ("Conserved Domain Database"), disponível no portal do "National Center for Biotechnology Information" (NCBI - acesso em 12/09/2003). Destas, apenas 14 apresentaram domínios conservados.

Confrontando as ORFs pré-selecionadas para este trabalho com aquelas que seriam estudadas pelo Dr. Mário Henrique de Barros (UNESP- Botucatu, comunicação pessoal), optou-se por excluir desta lista 06 ORFs, restando as 08 descritas no item 1.5 da Introdução.

Lembrando que YCR024C, YDR316W e YGR257C foram caracterizadas no decorrer deste trabalho, portanto também excluídas, e a ORF YER077C incluída posteriormente. Um resumo da seleção das ORFs pode ser observado na Figura 8.



**Figura 8: Seleção das ORFs.**

Resumo esquemático dos critérios adotados para a escolha das ORFs deste estudo.

### 3.1.2- Seqüências de endereçamento protéico

As seqüências, tanto em nucleotídeos quanto em aminoácidos, das 06 ORFs selecionadas foram obtidas através do portal SGD. A análise das seqüências de endereçamento foi realizada utilizando-se ferramentas distintas, com o intuito de se comparar a fidelidade das informações fornecidas. As ferramentas utilizadas (último acesso em Março de 2006) estão disponíveis nos seguintes bancos de dados: SGD (<http://www.yeastgenome.org/>), TARGET P v1.01 (EMANUELSSON, *et al.*, 2000 <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>), MITOPRED v.16.0 (GUDA *et al.*, 2004; GUDA *et al.*, 2004 <http://mitopred.sdsc.edu/>), MITOPROT (CLAROS; VINCENS, 1996 <http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>) e PSORT (NAKAI; HORTON, 1999 <http://psort.nibb.ac.jp/form2.html>).

### 3.1.3- Comparação entre as seqüências das ORFs com o banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) e análise dos domínios protéicos

As seqüências de aminoácidos das ORFs foram obtidas através do portal SGD. Em seguida, estas foram confrontadas contra o banco de dados do NCBI, através da ferramenta BLASTP (comparação proteína-proteína). Também foi realizada uma busca de similaridade com outras proteínas utilizando-se a ferramenta de análise de seqüência Washington University BLAST (WU BLAST) versão 2.0, disponível no portal SGD, pelo a qual é possível realizar diversas comparações restritas aos dados de *S. cerevisiae*. As últimas análises foram realizadas em Fevereiro de 2006.

Em seguida foram buscados os motivos protéicos das seqüências de aminoácidos previstas para cada ORF, pelo “site” NCBI Conserved Domain Search.

### 3.2- Experimentos práticos

#### 3.2.1- Meios de cultura

Para levedura

- **YPD (meio completo com dextrose):** 1% Extrato de Levedo, 2% Bacto Peptona e 2% Dextrose.
- **WO (meio mínimo com dextrose):** 0,17g% Yeast Nitrogen Base, 0,50g% Sulfato de amônio, 2% Dextrose, pH 6,0.
- **YPEG - (meio completo com etanol e glicerol):** 1% Extrato de Levedo, 2% Bacto Peptona, 2% Etanol, 2% Glicerol.
- **YPEG mínimo (meio mínimo com etanol e glicerol):** 0,17g% Yeast Nitrogen Base, 0,50g% Sulfato de amônio, 2% Etanol, 2% Glicerol, pH 6,0.
- **YPE – (meio completo com etanol):** 1% Extrato de Levedo, 2% Bacto Peptona, 2% Etanol.
- **YPG – (meio completo com glicerol):** 1% Extrato de Levedo, 2% Bacto Peptona, 2% Glicerol.
- **YPG 1/2 concentração original (meio completo com glicerol):** 0,5% Extrato de Levedo, 1% Bacto Peptona e 2,0% Glicerol.
- **YPG 1/3 concentração original (meio completo com glicerol):** 0,33% Extrato de Levedo, 0,66% Bacto Peptona e 2,0% Glicerol.
- **YPE 1/2 concentração original (meio completo com etanol):** 0,5% Extrato de Levedo, 1% Bacto Peptona e 2,0% Etanol.
- **YPL (meio completo com lactato):** 1% Extrato de Levedo, 2% Peptona, 3,5% de Ácido L-lático pH 5.5.
- **YPA (meio completo com acetato):** 1% Extrato de Levedo, 2% Peptona, 2% Acetato
- **GNA (meio de pré-esporulação):** 5% dextrose, 3% Difco Nutrient Broth, 1% Extrato de Levedo.
- **Meio líquido para esporulação:** 1% Acetato de Potássio, 0,005% Acetato de Zinco.

De acordo com a necessidade, as placas de meio mínimo foram suplementadas com aminoácidos e bases nitrogenadas apropriadas.

### Para bactéria

- **LB:** 1% Triptona, 0,5 % Extrato de levedo, 5% NaCL, 0,1% Dextrose, pH 7,0.
- **LA:** Mesma composição do meio LB, exceto pela adição de ampicilina (50mg/L).

Após o acerto do volume desejado com água destilada, em se tratando de meios sólidos, adicionou-se 2% de ágar. A esterilização foi conduzida em autoclave (Tomy SD-320: Speed AutoClave with Dryer). Os meios líquidos foram estocados em frascos estéreis devidamente tampados, enquanto os sólidos foram distribuídos em placas de Petri.

#### 3.2.2- Linhagens

As linhagens de *Escherichia coli* assim como de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas neste trabalho estão descritas na Tabela I.

Tabela I: Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e *Escherichia coli* utilizadas neste trabalho

<i>Escherichia coli</i>		
Linhagem	Genótipo	Referência
DH <sub>10</sub> B	F mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 oraD139 Δ(ora,leu) 7697 galU galK λ <sup>-</sup> rpsL nupG	Hanahan, 1983
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
Linhagem	Genótipo	Referência
BY4741	MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0	EUROSCARF
BY4743	MATa/MATα; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; met15Δ0/MET15;LYS2/lys2Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0	EUROSCARF
BY4741-ΔYDL119C	MAT a; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YDL119c::kanMX4	EUROSCARF
ΔYDL119C* segregante de ΔYDL119C x W303-1B	MAT α; his3; leu2; ura3; met15Δ0; ade2-1; YDL119c::kanMX4	Este estudo
BY4741-ΔYDR115W	MAT a; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YDR115w::kanMX4	EUROSCARF
BY4743-ΔYDR115W	MAT a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; YDR115w::kanMX4/YDR115w	EUROSCARF
BY4741-Δ YHR009C	MAT a; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YHR009c::kanMX4	EUROSCARF
BY4741-Δ YOR022C	MAT a; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YOR022c::kanMX4	EUROSCARF
BY4743-Δ YOR022C	MAT a/α; his3Δ1/his3Δ1; leu2Δ0/leu2Δ0; lys2Δ0/LYS2; MET15/met15Δ0; ura3Δ0/ura3Δ0; YOR022c::kanMX4/YOR022c	EUROSCARF
BY4741-Δ YDR332W	MAT a; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YDR332w::kanMX4	EUROSCARF
BY4741ΔYER077C	BY4741; Mat a; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YER077c::kanMX4	EUROSCARF
W303-1A	MAT a ade2-1, trp1-1, his3-115, leu2-3, ura3-52, 112 ρ <sup>+</sup> , can <sup>R</sup>	Rotchstein, R. Columbia University
W303-1B	MAT α ade2-1, trp1-1, his3-115, leu2-3, ura3-52, 112 ρ <sup>+</sup> , can <sup>R</sup>	Rotchstein, R. Columbia University
KL14	MAT α, rho <sup>0</sup> , auxotófica	Tzagoloff <i>et al.</i> , 1975
CB11	MAT a, rho <sup>0</sup> , adel	Tzagoloff <i>et al.</i> , 1975
D27310B/A1	MAT α; met 6, ρ <sup>+</sup> .	Coruzzi <i>et al.</i> , 1979

### 3.2.3- Análise do fenótipo das linhagens mutantes

As linhagens mutantes  $\Delta$ YDL119C,  $\Delta$ YDR115W (haplóide e diplóide),  $\Delta$ YDR332W,  $\Delta$ YHR009C e  $\Delta$ YOR022C e as linhagens controle BY4741, BY4743, W303-1A e CB11, ao serem retiradas do congelador  $-80^{\circ}\text{C}$ , foram inoculadas em placas de YPD.

Inicialmente o fenótipo foi analisado através de colônias isoladas, com cerca de 25 clones de cada amostra nos meios YPD, YPD com geneticina (concentração final  $160\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ), YPEG, YPE, YPG, WO, WO suplementado, WO com tapete de KL14 (a linhagem foi crescida “overnight” em 5mL de YPD, plaqueou-se de 3 a 5 gotas da cultura e espalhou-se com alça de vidro) e YPEG mínimo suplementado, a temperatura de  $30^{\circ}\text{C}$ .

O próximo teste consistiu em analisar as linhagens mutantes acima e os controles nos meios de cultura já listados, a  $30$  e  $37^{\circ}\text{C}$ , porém não se trabalhou com colônias isoladas, mas sim com diluições sucessivas (100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12% e 1,6%).

Mais um teste foi realizado a fim de se selecionar um meio de cultura adequado onde o fenótipo das linhagens mutantes fosse claro: uma pequena quantidade de células foi suspensa em 5 mL de água destilada deionizada (MilliQ) estéril. Cada amostra teve sua densidade óptica mensurada pelo espectrofotômetro Hitachi U-1100 (600nm), em seguida foram diluídas até que as concentrações alcançassem densidades ópticas (DO) entre 0,500 e 0,600. As amostras foram diluídas por diluição seriada de 10X (MASUMOTO *et al.*, 2005) e foram plaqueadas apenas em YPD, YPEG, YPG 1/2 e YPG 1/3, a  $30^{\circ}\text{C}$  e a  $37^{\circ}\text{C}$ . Também foram testados os meios YPE 1/2, YPL e YPA. Nesta fase do trabalho a ORF  $\Delta$ YER077C foi introduzida nos estudos.

É importante ressaltar que este teste, mesmo depois de padronizado, foi repetido algumas vezes, com intuito de verificar o comportamento fenotípico das linhagens mutantes.

### 3.2.4- Indução de esporulação em *Saccharomyces cerevisiae*

As linhagens da série BY4743, segundo o *Saccharomyces* Genome Deletion Project ([http://www-sequence.stanford.edu/group/yeast\\_deletion\\_project/spo.html](http://www-sequence.stanford.edu/group/yeast_deletion_project/spo.html)), requerem uma metodologia especial para a esporulação, diferente da tradicional (ROCKMILL; LAMBIE; ROEDER, 1991).

Células frescas provenientes de YPD foram plaqueadas no meio de pré-esporulação GNA, onde cresceram por 16 horas, 30°C. Em seguida estas foram transferidas para o meio líquido de esporulação (que foi preparado no momento do uso), adicionado dos suplementos necessários, rotação de 220 rpm, 25°C, 5 dias.

Após este período, as células foram observadas no microscópio DMLB Leica, e verificou-se a presença de tétrades. Vale ressaltar que este método tem um rendimento de 20-30%, porém é mais elevado que o tradicional.

As seguintes linhagens foram induzidas à esporulação:

- Mutante diplóide  $\Delta$ YDR115W.

O objetivo ao esporular o mutante  $\Delta$ YDR115W era verificar a velocidade de geração de petites, ou seja, quão instável apresenta-se o DNA mitocondrial. Observando-se a presença de tétrades através microscópio DMLB Leica, estas passaram por tratamento adequado (adaptado de ADAMS *et al.*, 1997) para posterior dissecação em micromanipulador Singer Instruments MSM Manual. O procedimento consistiu em tratar, gentilmente, uma pequena quantidade de células, suspensas em 150 $\mu$ L de água MilliQ estéril com 50 $\mu$ L zymoliase (0,5 mg/mL em 1M sorbitol), à 37°C, por 5 minutos. Em seguida adicionou-se 800 $\mu$ L de água MilliQ estéril e colocou-se no gelo. Foram testadas algumas temperaturas e tempos de incubação distintos, e esta condição (37°C, 5 minutos) foi a selecionada, pois o asco mantinha-se intacto, conservando os ascósporos no seu interior, porém sua ruptura com a

microagulha mostrou-se fácil e rápida. A dissecação foi realizada em placas com fina camada de YPD, seguindo as orientações do fabricante.

O próximo passo consistiu em plaquear as tétrades dissecadas em meios de cultura YPD e YPEG, logo que crescessem na placa com fina camada de YPD.

- Mutantes haplóides  $\Delta$ YDL119C e  $\Delta$ YDR115W

Estas linhagens foram cruzadas com W303-1B, com o objetivo de testar a expressão fenotípica das linhagens mutantes em outro “background” genético. A confirmação do cruzamento foi realizada plaqueando-se os diplóides gerados em WO suplementado com HLU. Após confirmação da formação dos diplóides, estes foram induzidos à esporulação. As tétrades foram testadas quanto à resistência a geneticina, quanto a auxotrofia e quanto ao fenótipo deficiente respiratório, em meio YPG 1/2, de acordo com os padrões de diluição e inoculação descritos acima.

### 3.2.5- Análise fenotípica por curva de crescimento

Diversas abordagens metodológicas foram testadas antes de se padronizar os experimentos relacionados às curvas de crescimento. Por fim, optou-se por proceder da seguinte maneira:

Os experimentos foram realizados com as linhagens haplóides de  $\Delta$ YDL119C,  $\Delta$ YDR115W,  $\Delta$ YDR332W,  $\Delta$ YER077C,  $\Delta$ YHR009C,  $\Delta$ YOR022C, com o controle BY4741 e com a linhagem  $\Delta$ YDL119C\*, segregante de  $\Delta$ YDL119C x W303-1B. Colônias retiradas de placa de YPD foram pré-inoculadas no meio em que seriam testadas, sendo eles YPD e YPEG e na temperatura de 30°C ou 37°C, 220 rpm, por 15 horas.

As células crescidas foram centrifugadas e resuspensas em meio de cultura adequado para o experimento (ou YPD ou PEEG). O inóculo foi das células foi feito quando atingiram a

DO de aproximadamente 0.110, sempre em duplicatas. O crescimento foi acompanhado por medidas de DO da cultura até 144 horas após o inóculo (tempo zero hora), como no caso do crescimento em YPG a 37°C. Nas primeiras 24 horas foram realizadas medições de 3 em 3 horas e após esse período, de 24 em 24 horas. Vale ressaltar que, além das amostras estarem em duplicatas, a cada medição eram realizadas 3 leituras de cada, a fim de diminuir o erro de leitura do aparelho.

Para a apresentação das curvas de crescimento foram calculados a média e erro padrão das amostras pelo programa Excel.

### 3.2.6- Extração em pequena escala de DNA de levedura

A extração de DNA das linhagens mutantes, dos controles BY4741 e W303-1A e de D273-10B/A1 foi realizada segundo Adams *et al.* (1997). Por fim o DNA foi suspenso em 300 µL de TE (10 mM Tris-Cl 1 mM EDTA). A concentração das amostras foi estabelecida por medição no Fluorímetro Quantech™.

### 3.2.7- Elaboração dos iniciadores para a amplificação das ORFs

Inicialmente, através do site SGD, foi observada a posição das ORFs estudadas em relação às ORFs vizinhas. Fez-se a opção de amplificar não somente a ORF, mas sim sua região promotora como também a terminadora. Assim, como garantia, os iniciadores foram desenhados - sempre que possível - cerca de 400 nucleotídeos antes do ATG inicial e 400 nucleotídeos após a trinca de terminação, pois foi respeitado o início ou término das ORFs vizinhas.

Ainda antes da real elaboração dos oligonucleotídeos, foi necessário buscar nas seqüências estudadas de cada ORF, sítios para enzimas de restrição possivelmente presentes, o que foi realizado com o auxílio do programa BioEdit Sequence Alignment Editor (HALL,

1999). Após confrontar os sítios ausentes nas seqüências das ORFs com os presentes no múltiplo sítio de clonagem dos vetores YCplac33 e YCplac111 (GIETZ; SUGINO, 1988) (ANEXO F) foi possível determinar duas enzimas que seriam interessantes para um futura clonagem: *XmaI* (C/CCGGG) e *SacI* (GAGCT/C).

Os iniciadores foram elaborados com o auxílio do programa OLIGO Primer Analysis Software (Molecular Biology Insights, Inc). Todos os iniciadores possuíam 26 nucleotídeos, sendo que o senso continha o sítio para a enzima *XmaI* (C/CCGGG) e dois nucleotídeos (CA) após o terminal 5'. O iniciador anti-senso continha o sítio para *SacI* (GAGCT/C) e dois nucleotídeos (GG) após o terminal 5'. Os iniciadores foram confeccionados pela empresa W-Med oligos:

**YDL119C**

494- 5' CACCCGGGGGTACGCTGAATGGATAC 3'  
495- 5' GGGAGCTCAACAGCCTCCAAATAAGC 3'

**YDR115W**

496- 5' CACCCGGGTACACGAGTTTTTTGACG 3'  
497- 5' GGGAGCTCGTCGGCAAATGCTACTTC 3'

**YDR332W**

500- 5' CACCCGGGTTTATCCATTTTTTTTCG 3'  
501- 5' GGGAGCTCGTTTGACGTATTACCACC 3'

**YHR009C**

502- 5' CACCCGGGCGTGAAAAATATTCCTG 3'  
503- 5' GGGAGCTCTAGCTTCTTCATCAGGGG 3'

**YOR022C**

504- 5' CACCCGGGTCTGTTGGTTTTCTGACC 3'  
505- 5' GGGAGCTCTCCACAGCTGTATCAATC 3'

Também foram utilizados dois iniciadores previamente confeccionados, que anelam na região do cassete de kanMX4, utilizado na interrupção dos mutantes estudados. O objetivo desta amplificação é a confirmação das linhagens fornecidas pela EUROSCARF com o respectivo mutante solicitado. São eles:

**KAN-5**

5'GTTTCGGATGTGATGTGAG 3'

**KAN-3**

5'TCTCTCGGTGAGTTTTCTC 3'

**3.2.8- Reações de amplificação**

Foram utilizados quatro “kits” diferentes para a reação de amplificação, sendo eles: PCR Super Mix (Invitrogen), Taq DNA Polymerase (Invitrogen), Go Taq DNA Polymerase (Promega) e Platinum *Pfx* DNA Polymerase (Invitrogen). O DNA molde utilizado foi o DNA extraído de W303-1A, ou de D27310B/A1, ou o DNA dos próprios mutantes, no caso da amplificação para a confirmação das amostras.

Os termocicladores utilizados foram GeneAmp PCR system 2.400 da Applied Biosystems ou PCR Expresses Gradient da Hybaid.

A ciclagem utilizada consistiu basicamente em:

- 96°C por 2 minutos, para uma desnaturação inicial,
- 96°C por 45 segundos – desnaturação,
- temperaturas variadas (dependete do iniciador em questão) por 45 segundos – anelamento dos iniciadores,
- 72°C por 2/3minutos – extensão, ciclagem repetida 35 vezes.

**3.2.9- Eletroeluição, purificação, precipitação e digestão enzimática dos produtos de PCR**

O DNA amplificado foi recuperado do gel de agarose (0,8%) por eletroeluição, de acordo com Sambrook; Fritsch; Maniatis (1989). Em seguida foi purificado com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico, na proporção 24:24:1 e precipitado com 1 µL de carreador glicogênio 1mg/mL, 1/20 do volume de NaCl 5M e 3 volumes de etanol absoluto. Ao final do procedimento o DNA foi diluído em 20µL de TE (1 mM TRIS-Cl, 10 mM EDTA).

O DNA obtido foi submetido a digestão enzimática (volume final de 10 µL), tanto com as ORFs amplificadas quanto com os vetores YCplac33 e YCplac111. As enzimas

utilizadas foram *Xma*I (BioLabs, 10u/ $\mu$ L) e *Sac*I (Fermentas, 10u/ $\mu$ L), com Buffer 4 da Biolabs e adição de 1  $\mu$ L de BSA 10X.

Foram utilizados 4 $\mu$ L do DNA da amplificação das ORFs, o que equivale à ~ 158ng para YDL119C; ~81ng para YDR115W; ~122ng para YOR022C; ~167ng para YCplac33 e ~111ng para YCplac111. As amostras foram novamente eletroeluídas, purificadas e precipitadas e diluídas em 5  $\mu$ L de TE.

### 3.2.10- Reação de ligação

A reação de ligação foi realizada com o “kit” T4 DNA Ligase da Promega, seguindo atentamente as recomendações do fabricante.

### 3.2.11- Preparação de células competentes e transformação bacteriana

Após o crescimento da cepa de *E. coli* DH10B em placa de LB, esta foi inoculada em 50 mL de LB, sendo cultivada sob agitação de 220 rpm, a 37°C, até que atingisse a fase exponencial de crescimento. O frasco foi imediatamente colocado em gelo para cessar o crescimento das células e o conteúdo transferido para um tubo cônico de 50 mL. A cultura foi centrifugada a 5000 rpm, 4°C por 5 minutos (centrífuga Sorvall RC5B). O sobrenadante foi desprezado e em seguida o precipitado foi cuidadosamente suspenso em 15 mL de solução de CaCl<sub>2</sub> 10 mM, 10 mM TRIS-Cl pH 8,0, gelada. Repetiu-se a centrifugação. O precipitado foi suspenso em solução CaCl<sub>2</sub> 50 mM, 10 mM TRIS-Cl pH 8,0 e deixado no gelo por 30 minutos. Fez-se novamente a centrifugação descrita acima e as células foram suspensas em 3 mL de 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM TRIS-Cl pH 8,0, estando prontas para a transformação.

Foram utilizados 100  $\mu$ L de célula competente para cerca de 10 ng de DNA. A mistura foi deixada no gelo por 20 minutos e em seguida aplicou-se um choque térmico de 42°C, por 2 minutos. Retornou-se a amostra ao gelo e logo depois esta foi transferida para um tubo cônico de 15 mL contendo 1 mL de LB. Após a incubação por 1 hora a 37°C e agitação de

220 rpm, fez-se uma nova centrifugação de 5 minutos, 2000 rpm à temperatura ambiente. Após desprezar o sobrenadante, as células foram suspensas no líquido residual e plaqueadas em LA.

### 3.2.12- Mini-preparação plasmidial por lise alcalina

Células foram coletadas com uma espátula estéril após crescimento por 16 horas em placa de LA e suspensas em 200µL de solução GET/RNase (GET: 90 g/L de dextrose, 25 mM de Tris-Cl pH 8,0, 10 mM EDTA, 0,15 µg RNase por µL de solução). Adicionou-se a solução de lise (SDS 1%, NaOH 0,2M), cuja reação se estendeu por cerca de 3 minutos e logo foi adicionada a solução de neutralização (acetato de potássio 3 M e ácido acético 5 M). Homogeneizou-se por inversão e as amostras foram deixadas no gelo por 20 minutos. Os lisados foram centrifugados por 15 minutos a 14000 rpm (Microcentrífuga Eppendorf 5415C) e os sobrenadantes coletados em novos microtubos já contendo 600 µL de isopropanol. Novamente fez-se a homogeneização por inversão e centrifugou-se por 10 minutos. O precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 70%. O DNA plasmidial foi dissolvido em 100 µL de TE.

O volume de 1 µL de solução de DNA plasmidial foi adicionado a 01 volume de Stop-A (35% Ficoll 400, 0,1% Bromofenol blue, 0,1% Xylene cyanol, 0,5% SDS, 5 mM Tris-Cl pH 7,5) diluído (1:4 TBE 1X), o qual confere densidade à solução que contém a amostra de DNA, para a análise em gel de agarose 0,8% contendo 0,75 µL de brometo de etídio 10 mg/mL/40mL de gel.

Os plasmídeos foram visualizados colocando-se o gel de agarose no transluminador de ultravioleta (UV 26 da Fotodyne) e o registro da imagem realizado com câmera digital KODAK DC290 Zoon, programa KODAK Scientific Imaging Systems.

### 3.2.13- Digestão enzimática para confirmação da ligação do inserto no vetor

Os clones selecionados após a preparação alcalina foram submetidos à digestão com as enzimas *SmaI* (BioLabs, 10u/μL) que apresenta o mesmo sítio de restrição de *XmaI*, porém gera uma terminação cega e *SacI* (Fermentas, 10u/μL). Utilizaram-se 0,25μL de cada enzima, ~ 100ng de DNA dos clones, tampão 4 da Biolabs e BSA (1μL, sendo a solução de BSA 10x concentrada).

### 3.2.14- Transformação de levedura – Complementação homóloga

Após confirmação dos clones que possuíam a construção correta, foi realizada transformação de levedura pelo método do acetato de lítio (adaptado de SCHIESTL; GIETZ, 1989), no qual uma alçada de levedura retirada de placa foi suspensa em 10 mL de YPD e colocado para crescer por 16 horas. Em seguida foram repassados 200 μL para um novo erlenmeyer de 50 mL, contendo 10 mL de YPD e deixou-se crescer em agitador por 4 horas a 220 rpm. As células em suspensão foram transferidas para tubo cônico de 15 mL e centrifugadas por 10 minutos a 3000 rpm. Desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se as células em 1 mL de TEL estéril (10 mM Tris pH 7,5; 0,1 M LioAc; 1 mM EDTA), homogeneizando-se cuidadosamente. Esta suspensão foi transferida para microtubo de 1,5 mL e centrifugada por 2 minutos a 8000 rpm, desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se em 100 μL de TEL, homogeneizando com a própria pipeta. Deixou-se 5 minutos à temperatura ambiente. Adicionou-se 5 μL de carreador DNA de salmão (10 mg/mL) e 3 μL do DNA desejado (concentração ideal de 1-10 μg). Deixou-se 10 minutos à temperatura ambiente e adicionou-se 800 μL de PEG 40% estéril (40% polietilenoglicol em TEL) e deixou-se 15 minutos à temperatura ambiente. As células foram transferidas para 42°C (choque térmico) por 12 minutos. Centrifugou-se por 5 minutos a 8000 rpm e desprezou-se o sobrenadante. As células foram lavadas com 500 μL de TE estéril (10 mM Tris pH 7,5; 1 mM EDTA). Após

centrifugar por 2 minutos a 8000 rpm, retirou-se sobrenadante com pipeta e ressuspendeu-se o precipitado em 150  $\mu$ L de TE. Plaqueou-se em meio de cultura WO complementado com os devidos suplementos.

Posteriormente os clones foram testados fenotipicamente quanto à restauração da capacidade respiratória.

### 3.2.15- Consumo de oxigênio

Para os experimentos de consumo de oxigênio foi utilizado o oxígrafo Oxygraph Versão 1.01, Hansatech Instruments.

Foram realizados testes com as linhagens  $\Delta$ YDL119C,  $\Delta$ YDR115W haplóide,  $\Delta$ YDR332W,  $\Delta$ YER077C,  $\Delta$ YHR009C,  $\Delta$ YOR022C, BY4741 e W303-1B, em YPD a temperatura de 30°C e YPEG a temperatura de 37°C.

Após diversas padronizações, procedeu-se da seguinte maneira: as células foram pré-inoculadas em YPD ou YPEG, por 16 horas. Depois de crescidas, foram centrifugadas e suspensas em 100 mL do meio de cultura correspondente ao do pré-inóculo (DO 0,2 aproximadamente). Após crescimento durante 2 horas, foram novamente centrifugadas e suspensas em 1 mL de meio. Fez-se contagem de células em câmara de Neubauer, no microscópio DMLB Leica.

As medidas de consumo de oxigênio foram feitas em 1 mL de meio fresco e cerca de  $1,16 \times 10^7$  células/mL, sendo que as células foram adicionadas somente após a estabilização do traçado.

Para observar o consumo de oxigênio na presença de bloqueadores da respiração, utilizou-se FCCP (Sigma), oligomicina (Sigma) e antimicina A (Sigma), em diferentes concentrações.

## 4. RESULTADOS

### 4.1- Análise *in silico*

#### 4.1.1- ORFs selecionadas

Através da metodologia descrita no item 3.1.1, são apresentadas, na Tabela II, as 06 ORFs selecionadas para este trabalho e algumas informações disponíveis no SGD. A ORF YDR115W é a única descrita como verificada, porém não há estudos individuais realizados com a mesma.

**Tabela II: Lista de 06 ORFs selecionadas para este estudo**

	<b>Tamanho (aminoácidos)</b>	<b>Característica (SGD)</b>	<b>Descrição (SGD)</b>
YDL119C	307	Não caracterizada	Proteína hipotética
YDR115W	105	Verificada	Proteína ribossomal mitocondrial hipotética
YDR332W	689	Não caracterizada	Proteína hipotética
YER077C	688	Não caracterizada	Proteína hipotética
YHR009C	523	Não caracterizada	Proteína hipotética de função desconhecida
YOR022C	715	Não caracterizada	Proteína hipotética

#### 4.1.2- Análise das seqüências de endereçamento protéico

Os precursores das proteínas mitocondriais possuem uma seqüência de endereçamento localizada geralmente na sua porção amino-terminal, a qual varia entre 10-80 resíduos, sendo que praticamente nenhum consenso é observado. Nestas seqüências há uma tendência da presença de aminoácidos básicos e hidrofóbicos, e a formação de uma  $\alpha$ -hélice anfipática, sendo que muitas proteínas contêm a sinalização difundida ao longo da seqüência.

Diversos programas para análise da seqüência de endereçamento estão disponíveis *on line*. Neste trabalho foram utilizados os programas TargetP, Mitopred, Mitoprot e Psort.

Todos detectam apenas seqüências de endereçamento N-terminal, mas apresentam resultados muitas vezes contrastantes entre si dada as diferenças na maneira que esses algoritmos foram programados para a predição das hélices anfipáticas das seqüências de endereçamento em diferentes organismos.

O programa TargetP oferece fidelidade de cerca de 90% e informa se a proteína possui características de endereçamento para a mitocôndria, cloroplasto (no caso de plantas) e/ou via secretora, assim como o ponto de clivagem para a proteína madura, informação importante para testes de endereçamento protéico.

Mitopred prediz o endereçamento protéico apenas mitocondrial, para todos os organismos. Segundo os autores, a performance desta ferramenta é claramente superior em relação às duas mais populares: TargetP e PSORT.

O programa Mitoprot também analisa as seqüências com direcionamento apenas mitocondrial, assim como o sítio de clivagem, sendo a ferramenta mais antiga.

Segundo seus autores, a exatidão do programa PSORTII é baseada em seqüências de proteínas nucleares de *Saccharomyces cerevisiae*.

A Tabela III mostra o resultado da análise da seqüência de endereçamento das ORFs YDI119C, YDR115W, YDR332W, YER077C e YOR022C, através dos programas descritos acima.

**Tabela III: Análise da seqüência de endereçamento das ORFs selecionadas**

	SGD	Target P	MITOPRED	MITOPROT	PSORT II
YDL119C	Membrana interna mitocondrial	89.8% - mTP 5.7% SP 5.3% - outro RC:1	Mitochondrial 99.00%	Chance de ser exportada pra mitocôndria: 9.13%	47.8 %: citoplasma
YDR115W	Subunidade maior do ribossomo mitocondrial	37.8% - mTP 3.3% SP 67.4% - outro RC:4	Mitochondrial 99.00%	Chance de ser exportada pra mitocôndria: 99.97%	60.9 %: mitocondrial
YDR332W	Mitocondrial	54.6% - mTP 2.5% SP 53.6% - outro RC:5	Não-mitocondrial	Chance de ser exportada pra mitocôndria: 99.60%	65.2 %: mitocondrial
YER077C	Mitocondrial	17.2% - mTP 4.5% SP 86.4% - outro RC:2	Não-mitocondrial	Chance de ser exportada pra mitocôndria: 90.03%	52.2 %: nuclear
YHR009C	Citoplasmático	12.7% - mTP 15.4% SP 65.1% - outro RC:3	Mitochondrial 84.60%	Chance de ser exportada pra mitocôndria: 6.13%	52.2 %: nuclear
YOR022C	Mitocondrial	19.6% - mTP 6.6% SP 78.9% - outro RC:3	Não-mitocondrial	Chance de ser exportada pra mitocôndria: 91.90%	56.5 %: mitocondrial

SGD: Localização celular

TargetP: Localização subcelular

- mTP: peptídeo com sinalização mitocondrial
- SP: peptídeo sinal com sinalização para via secretora
- outro : outra localização qualquer
- RC: valor de confiabilidade; varia de 1 à 5, em ordem decrescente de confiabilidade

Em relação à ORF YDL119C, o Mitopred fornece uma porcentagem de 99% de que esta proteína seja direcionada para a mitocôndria, condizendo com dados do SGD (BELENKIY *et al.*, 2000) e TargetP (cujo índice de confiabilidade é maior), porém Mitoprot sugere possibilidade de apenas 9,13% de endereçamento mitocondrial e o PSORT sugere direcionamento para o citoplasma.

A ORF YDR115W, segundo a maioria dos ensaios computacionais - com exceção do TargetP (37.8%) - parece ter uma seqüência sinal de endereçamento para a mitocôndria. O

trabalho referência do SGD é o de Hughes *et al.* (2000), cujo resultado foi inferido por similaridade de seqüência.

Em relação ao endereçamento protéico da ORF YDR332W é possível observar a falta de congruência dos resultados. O SGD (HUH *et al.*, 2003), Mitoprot e Psort sugerem endereçamento mitocondrial, enquanto Mitopred, endereçamento não mitocondrial. O TargetP indica 54.6% de possibilidade de ser mitocondrial e 53.3% de ser direcionada para outro compartimento celular, assim o valor de confiabilidade dessa informação é 5, ou seja o mais baixo da escala.

O SGD (HUH *et al.*, 2003) e o programa Mitoprot sugerem que a ORF YER077C seja direcionada à mitocôndria, enquanto os demais indicam endereçamento não-mitocondrial.

Com exceção do MITOPRED, todos os demais programas indicam que a ORF YHR009C não deva ser direcionada para a mitocôndria. O SGD traz como referência o trabalho de Rout *et al.* (2000), cuja evidência da localização celular foi inferida por análise direta.

Por fim, para a ORF YOR022C também não há consenso nas informações em se tratando das seqüências de endereçamento. SGD (HUH *et al.*, 2003), Mitoprot e Psort indicam endereçamento mitocondrial, enquanto TargetP e Mitopred sugerem que esta proteína deva ser direcionada a outro compartimento celular.

Com o intuito de observar a existência de consenso na seqüência de endereçamento das ORFs que supostamente são direcionadas à mitocôndria, foi feito um levantamento dos aminoácidos presentes na porção correspondente ao endereçamento propriamente dito. Para isso, selecionou-se as ORFs que apresentaram endereçamento mitocondrial nos programas TargetP e Mitoprot, já que estas ferramentas fornecem o ponto de clivagem da proteína madura.

As ORFs YDL119C e YDR332W foram analisadas com o programa TargetP e as ORFs YDR115W, YDR332W, YER077C e YOR022C, com o programa Mitoprot, como pode ser observado na Tabela IV.

Também foram analisadas as sequências de endereçamento de proteínas sabidamente mitocondriais, sendo elas: Atp2p (subunidade beta do setor F1 da ATP sintase mitocondrial), Mas2p (enzima que cliva sequências de endereçamento N-terminal de proteínas importadas para a mitocôndria) e Cox4p (subunidade 4 do complexo citocromo c oxidase). O interessante é que o programa TargetP não identificou a sequência de endereçamento destas proteínas.

**Tabela IV: Análise computacional das supostas sequências de endereçamento mitocondrial das ORFs selecionadas e de 03 proteínas sabidamente mitocondriais com a utilização dos programas TargetP e Mitoprot.**

	TargetP	MITOPROT	Resíduos hidrofóbicos
YDL119C	85 resíduos	-	58.83%
YDR115W	-	85 resíduos	51.79%
YDR332W	39 resíduos	29 resíduos	48.7%/48.28%
YER077C	-	47 resíduos	44.70%
YHR009C	-	-	-
YOR022C	-	17 resíduos	35.28%
Atp2p	-	33 resíduos	57.57%
Mas2p	-	11 resíduos	54.54%
Cox4p	-	26 resíduos	50.02%

Após a obtenção do sítio de clivagem da sequência de endereçamento, foi feita uma análise com o auxílio do programa BioEdit Sequence Alignment Editor (HALL, 1999) para estabelecer quais aos tipos de aminoácidos presentes nas porções referentes ao endereçamento mitocondrial. Os resultados estão na Tabela IV. Verificou-se que as 03 proteínas sabidamente mitocondriais possuem maior porcentagem de resíduos hidrofóbicos, fato que condiz com a literatura. Em relação às ORFs, é possível verificar que as proteínas geradas por YDL119C e

YDR115W apresentam mais resíduos hidrofóbicos, enquanto as geradas por YDR332W, YER077C e YOR022C apresentam maior porcentagem de resíduos hidrofílicos.

#### 4.1.3- Domínios protéicos e comparação de sequências

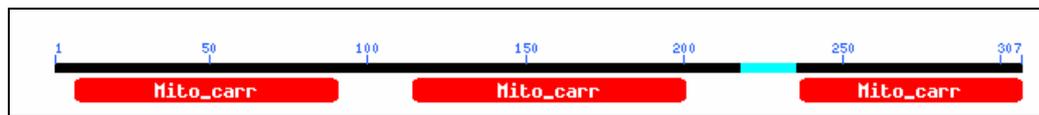
Em se tratando de proteínas, diferentes regiões de uma mesma sequência protéica podem atuar como unidades independentes, assim como regiões semelhantes em proteínas diferentes podem exercer a mesma função. Estas porções chamam-se domínios. Por exercerem atividades importantes nas proteínas (por exemplo domínios catalíticos ou domínios de ligação ao substrato), geralmente são regiões conservadas entre diferentes organismos (NCBI). Domínios conservados possuem uma sequência padrão, ou motivo, que permite a sua identificação na sequência protéica, embora motivos funcionais também possam estar presentes fora da estrutura conservada dos domínios.

Alguns programas computacionais são capazes de identificar esses domínios. Neste trabalho foi utilizado o “site” NCBI Conserved Domain Search, o qual importa informações do SMART (the Simple Modular Architecture Research Tool), Pfam (Protein families database of alignments and HMMs - Hidden Markov Model) e COGs (Clusters of Orthologous Groups of proteins).

#### **YDL119C**

O BLASTP da ORF YDL119C, realizado em dezembro de 2005, mostrou similaridade com proteínas não nomeadas ou hipotéticas de diversos fungos do filo ascomiceto, como, por exemplo, de *Candida glabrata* (7e-105) e *Kluyveromyces lactis* (1e-92), mas também trouxe alta similaridade com uma proteína carreadora mitocondrial do fungo filamentoso *Aspergillus fumigatus* (e-value 2e-61) e de *Candida albicans* (e-value 2e-60), fato que condiz com o domínio protéico presente nesta, conforme mostrado na Figura 9.

Também houve similaridade com proteínas hipotéticas de outros organismos, como *Apis mellifera* (e-value  $2e-33$ ), mas os 17 primeiros resultados foram relacionados a ascomicetos.



**Figura 9: Domínios protéicos presentes na ORF YDL119C, segundo o NCBI Conserved Domain Search.**

Analisando o resultado fornecido pelo WU BLAST é possível verificar que as 34 primeiras proteínas são transportadoras mitocondriais, sendo que a de maior probabilidade de similaridade (e-value  $2.2e-17$ ) é a proteína codificada pela ORF YPR021C/*AGC1* (transportador aspartato-glutamato).

#### **YDR115W**

Os 06 primeiros resultados provenientes do BLASTP são relacionados a proteínas hipotéticas, não nomeadas ou desconhecidas de fungos do filo ascomiceto. O primeiro resultado informativo é em relação à similaridade da ORF YDR115W com uma proteína ribossomal hipotética de *Cryptococcus neoformans var. neoformans* ( $3e-07$ ). Abaixo da similaridade com *Cryptococcus neoformans var. neoformans* consta similaridade da ORF YDR115W com proteínas ribossomais de diversos organismos, incluindo mamíferos, peixes e bactérias.

Com a análise dos motivos protéicos presentes ao longo da seqüência, foi possível verificar que o polipeptídeo em questão faz parte da família de proteína L34 ribossomais (Figura 10).



Figura 10: Domínios proteicos presentes na ORF YDR115W, segundo o NCBI Conserved Domain Search

O WU BLAST não forneceu informações muito relevantes. A maior similaridade (e-value 0.020) foi com a ORF YNL163C, uma GTPase citoplasmática envolvida na biogêneses do ribossomo 60s.

#### YDR332W

No BLASTP realizado em Janeiro de 2006, com um e-value de  $5e-93$ , veio a similaridade a proteína DEAD/DEAH-box helicase de *Aspergillus fumigatus*. Similaridades maiores foram obtidas com proteínas hipotéticas de 04 outros ascomicetos. Também foi obtida similaridade da proteína codificada por esta ORF com helicases de diversas bactérias, porém não foi observada similaridade com proteínas de outros organismos. Utilizando-se o WU BLAST foi possível verificar similaridade com a ORF YGL078C ( $8.0e-09$ ) uma putativa RNA helicase dependente de ATP, entre outras com menor e-value.

A Figura 11 refere-se aos domínios proteicos da ORF YDR332W, os quais estão relacionados a uma suposta função de helicase.

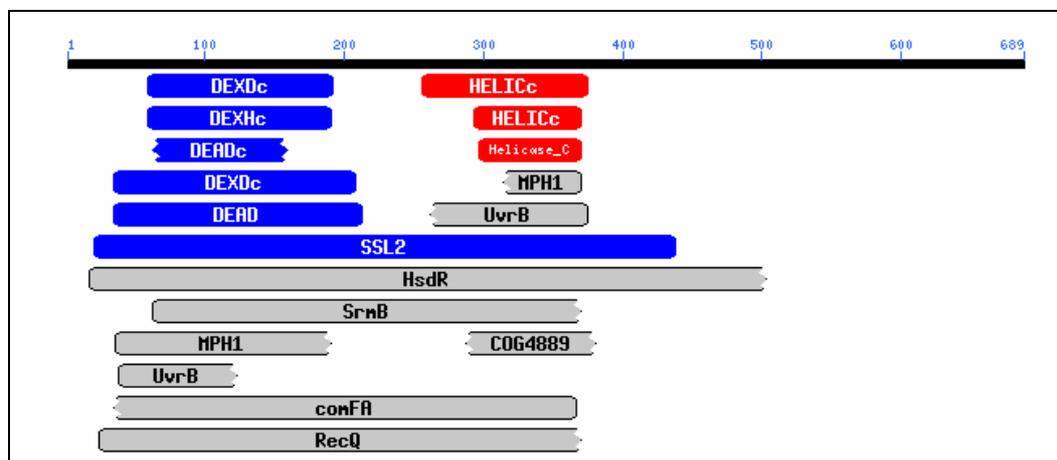


Figura 11: Domínios proteicos presentes na ORF YDR332W, segundo o NCBI Conserved Domain Search

**YER077C**

Os resultados do BLASTP mostram similaridade apenas com proteínas não nomeadas: *Candida glabrata*, e-value 2e-85; *Kluyveromyces lactis*, e-value 1e-83, *Ashbya gossypii*, e-value 1e-79. Depois destes três organismos, o e-value cai consideravelmente, mostrando similaridade com uma proteína não nomeada de *Debaryomyces hansenii*, e-value 3e-15. Já no WU BLAST os resultados encontrados apresentam e-values nada significativos: similaridade com a ORF YGL147C e-value 0.21, uma proteína pertencente à subunidade ribossomal 60S.

A busca por domínios protéicos pelo NCBI trouxe como resposta a não detecção de domínios conservados.

**YHR009C**

O BLASTP para a ORF YHR009C resultou em alta similaridade com proteínas hipotéticas ou não nomeadas de diversos fungos. Com um e-value 3e-28 veio a similaridade com uma proteína citoplasmática putativa de *Cryptococcus neoformans var. neoformans*. Há similaridades menos significativas com uma hipotética oxirredutase FAD-dependente de *Oryza sativa* (e-value 9e-23). O motivo protéico DadA (Figura 12) está relacionado ao metabolismo e transporte de aminoácidos (NCBI). O WU BLAST resultou em similaridades pouco significativas.



**Figura 12:** Domínio protéico presente na ORF YHR009C, segundo o NCBI Conserved Domain Search

## YOR022C

De acordo com o BLASTP, a ORF YOR022C apresenta similaridade com proteínas não nomeadas de diversos ascomicetos, por exemplo, *Candida glabrata* (e-value  $1e-159$ ); *Kluyveromyces lactis* (e-value  $4e-134$ ); *Debaryomyces hansenii* (e-value  $2e-97$ ). O primeiro resultado informativo apresenta-se com e-value  $7e-42$ , relacionado à similaridade desta ORF com o motivo protéico DDHD de *Aspergillus fumigatus*. Com e-value  $5e-22$  veio a similaridade com uma fosfolipase que catalisa a hidrólise de ácidos fosfatídicos de *Neurospora crassa*, característica que condiz com a descrição da função de YOR022C no SGD.

O WU BLAST não mostrou resultados de similaridade consistentes. Houve similaridade com o domínio DDHD de *Homo sapiens*, como pode ser observado na Figura 13. Este domínio contém 04 resíduos conservados que formam um sítio de ligação com metal.

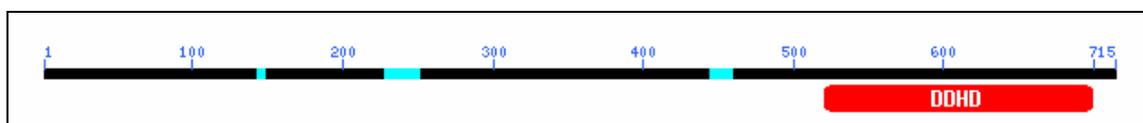
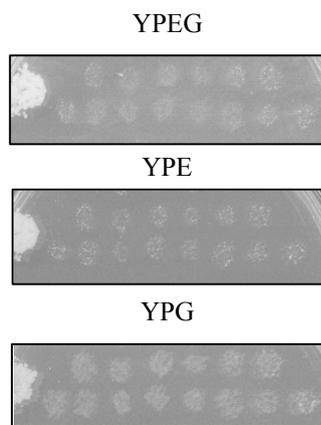


Figura 13: Domínio protéico presente na ORF YOR022C, segundo o NCBI Conserved Domain Search

## 4.2 Experimentos realizados

### 4.2.1- Fenótipo das linhagens mutantes

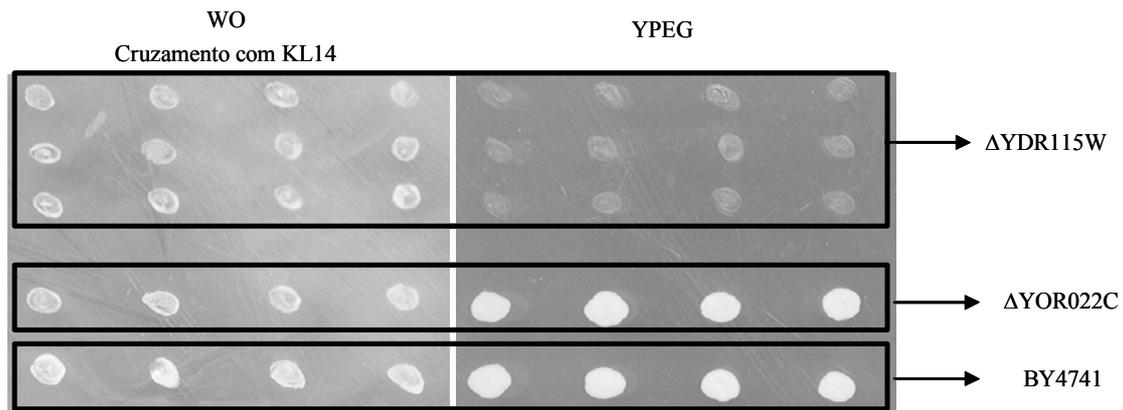
Ao realizar os primeiros testes fenotípicos com os mutantes recebidos, foi possível perceber que os fenótipos dos mesmos não condiziam com aquele descrito no trabalho de Steinmetz *et al* (2002) e de Dimmer *et al*, (2002), já que todos cresceram em meios com fonte de carbono não fermentável (YPEG, YPEG mínimo suplementado, YPE e YPG), com exceção do mutante  $\Delta YDR115W$  (Figura 14). Porém o não crescimento do  $\Delta YDR115W$  poderia ser decorrente de mutação no DNA mitocondrial, que é sabidamente instável.



**Figura 14: Ausência de crescimento do mutante  $\Delta$ YDR115W em alguns meios com fonte de carbono não-fermentáveis.**

A colônia maior da esquerda é a linhagem W303-1A, controle positivo. Os demais são clones isolados de  $\Delta$ YDR115W, plaqueados de modo ordenado, após 2 dias de incubação.

Os clones do mutante  $\Delta$ YDR115W e dos demais mutantes foram testados quanto à geração de petites (ANEXO G). Para isso, cruzou-se, em WO, as amostras com a linhagem KL14, uma  $\rho^0$ . Posteriormente os diplóides foram replaqueados em YPEG. Como era esperado, somente a linhagem  $\Delta$ YDR115W possui fenótipo deficiente respiratório devido a mutação no DNA mitocondrial, pois mostrou cruzamento com KL14 ( $\rho^0$ ) em WO (meio com dextrose) porém ausência de crescimento dos diplóides em YPEG. Os resultados mostrados na Figura 15 são de clones gerados por colônia isolada, cujos controles positivos utilizados foram a linhagem BY4741 e o mutante YOR022C (haplóide), que não apresentou geração de petites.



**Figura 15: Geração de petites na inativação da ORF YDR115W.**

**Painel da esquerda:** clones purificados das linhagens mutantes indicadas, acasalados com o KL14 (rho0), em meio mínimo com glicose (WO). **Painel da direita:** réplica da placa anterior em meio rico com glicerol e etanol como fonte de carbono (YPEG), após dois dias de incubação.

Os testes em WO suplementado mostraram resultados congruentes com o esperado, quanto às marcas auxotróficas das linhagens. A verificação de resistência à geneticina confirmou que as linhagens mutantes realmente possuem inativação do gene alvo com adição do gene de resistência a esse antibiótico.

A primeira análise realizada com diluições sucessivas (concentrações de 100% à 1,6%) foi importante para analisar a capacidade de crescimento em diversos meios, confirmando resultados já obtidos no primeiro teste.

Ao realizar o experimento com diluições sucessivas de 10X e partindo-se de concentrações por espectrometria a 600nm, foi possível chegar a alguns resultados:

- Não houve diferenças significativas de crescimento dos mutantes entre os meios YPG 1/2 e YPG 1/3.
- O crescimento à 37°C ocorre mais lentamente, de uma maneira geral, quando comparado ao crescimento à 30°C, em todos os meios de cultura.
- Inicialmente, observando o crescimento das linhagens mutantes em relação ao controle, foi possível designar o meio YPG 1/2, a temperatura 37°C, como sendo o mais apropriado para

diferenciar fenotipicamente as linhagens mutantes. Porém, como este teste foi repetido diversas vezes, observou-se que o comportamento fenotípico das amostras não é estável, sendo que por algumas vezes o meio YPG ½ não foi o melhor para diferenciar o crescimento.

- Em YPL, todas as amostras cresceram bem e de uma forma muito semelhante, enquanto em YPA todas cresceram muito pouco, inclusive os controles. Devido à semelhança da ORF YDL119C com a ORF YPR021C/*AGCI* (transportador mitocondrial), poderia ter ocorrido o não crescimento da linhagem  $\Delta$ YDL119C em YPA, já que YPR021C/*AGCI* é incapaz de crescer em meios que contenham acetato como fonte de carbono.

- Assim, a positividade dos testes de transformação homóloga sempre foi analisada nos meios YPEG e YPG ½. Os resultados mostrados são os referentes a expressão fenotípica mais condizente com deficiência respiratória.

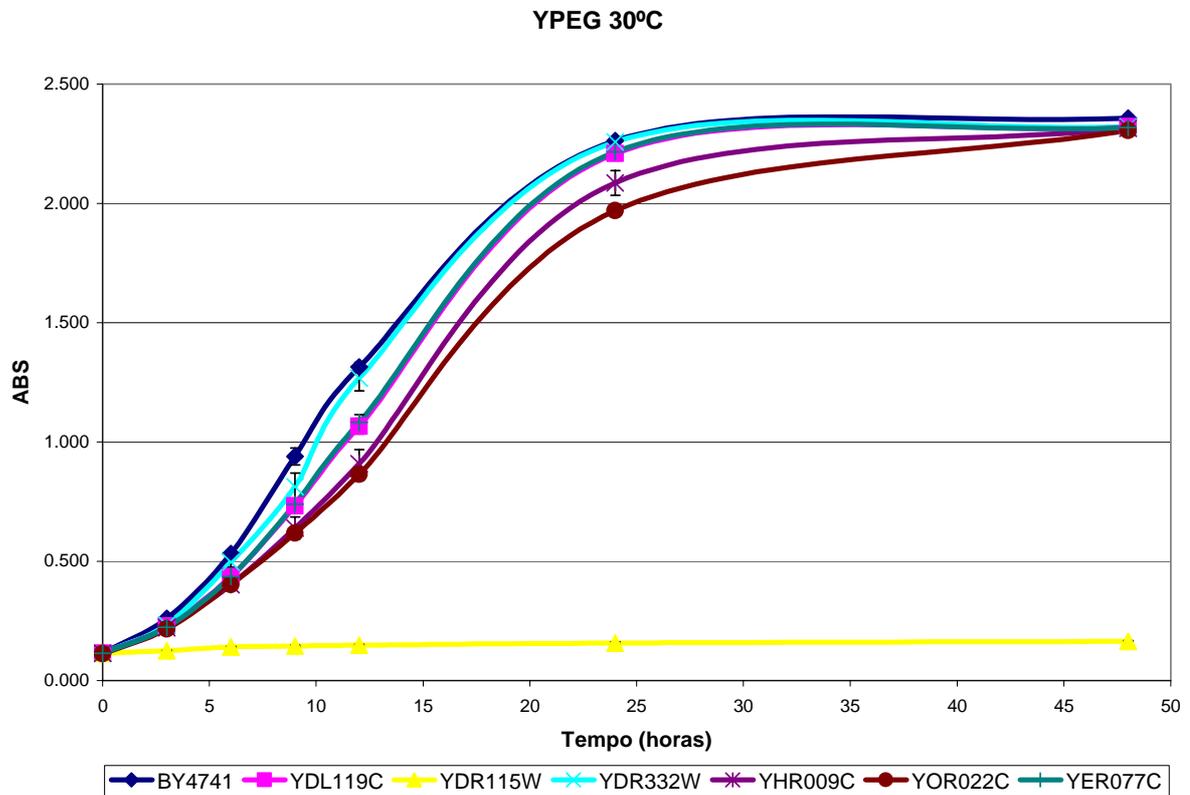
Também foram realizados experimentos de análise fenotípica através do acompanhamento do crescimento das linhagens mutantes e controle através de curva de crescimento, conforme descrito a seguir.

#### 4.2.2- Curva de crescimento

Foram realizadas análises fenotípicas através do acompanhamento da curva de crescimento em meio líquido das linhagens mutantes e do controle BY4741, nos meios YPD e YPEG, a 30°C e a 37°C.

No Gráfico 1 é possível observar o comportamento das linhagens no crescimento em YPEG a 30°C. Nota-se um leve atraso no crescimento de  $\Delta$ YOR022C e  $\Delta$ YHR009C, sendo que  $\Delta$ YDR115W realmente não cresce, condizendo com confirmação anterior de que é mutante mitocondrial. Com exceção de  $\Delta$ YDR115W, o crescimento dos demais se iguala ao do controle BY4741 com aproximadamente 40 horas de crescimento.

Considerando que a análise fenotípica por diluição seriada é registrada a partir de 48 horas de crescimento, percebe-se que a fase de maior diferenciação já foi perdida.

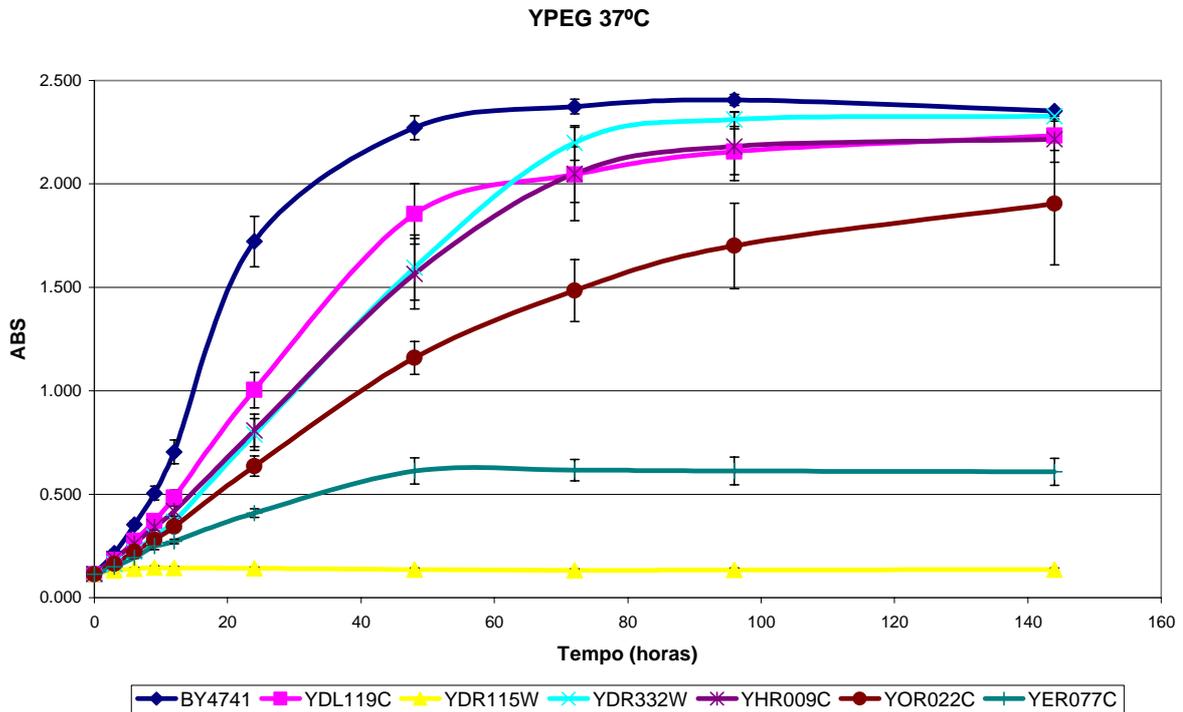


**Gráfico 1: Curva de crescimento das linhagens mutantes e controle em YPEG 30°C.**

O crescimento de cada uma das linhagens foi monitorado medindo-se os valores de absorbância (ABS) a 600nm ao longo de 48 horas.

No Gráfico 2 está representada a curva de crescimento dos mutantes e do controle em YPEG 37°C. Este experimento teve que ser realizado por um período de 144 horas, para que os mutantes atingissem a fase estacionária.  $\Delta$ YER077C mostrou uma diferença no crescimento muito significativa quando comparado à 30°C e aos demais mutantes em 37°C (Gráfico 1). A linhagem  $\Delta$ YOR022C, também apresentou crescimento mais lento. Mais uma vez foi confirmado o fenótipo de  $\Delta$ YDR115W.

É importante dizer que os dados são bastante consistentes visto que são resultado de uma média de valores, tendo sido calculado o erro das amostras.



**Gráfico 2: Curva de crescimento das linhagens mutantes e controle em YPEG 37°C.**

O crescimento de cada uma das linhagens foi monitorado medindo-se os valores de absorbância (ABS) a 600nm ao longo de 144 horas.

#### 4.2.3- Experimentos envolvendo dissecação de tétrades

O objetivo ao esporular o mutante diplóide heterozigoto  $\Delta$ YDR115W (EUROSCARF) era verificar a velocidade de geração de petites, ou seja, quão instável apresentava-se o DNA mitocondrial.

Foram dissecadas diversas tétrades deste mutante. Em nenhuma das tétrades analisadas observou-se o crescimento dos 4 ascósporos esperados, curiosamente, somente 2 ascósporos sobreviviam em YPD – meio rico.

Ao observar as tétrades no micromanipulador, após dois dias de crescimento em YPD, percebeu-se que os dois ascósporos que não se desenvolviam em cada uma das tétrades replicavam aparentemente duas ou três vezes, formando uma micro-colônia obviamente não visível a olho nú. Foram realizados testes em geneticina, em YPEG e em WO (auxotrofia e

cruzamento com KL14 e CB11) apenas com os 2 ascósporos viáveis (Figura 16), para que fosse possível caracterizá-los.

Observou-se que os ascósporos sobreviventes que eram resistentes à geneticina não cresceram em YPEG, ou seja, possuem o alelo interrompido e, conseqüentemente, a deficiência respiratória. Após o cruzamento destes com as linhagens testes CB11 e KL14 verificou-se perdas do DNA mitocondrial nesses ascósporos determinando que, de fato o produto gênico da ORF YDR115W afeta a estabilidade do DNA mitocondrial.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
YPD Kan	+	+	+			+		+	+
	+			+	+		+		+
YPEG				+	+		+	+	
		+	+			+			+

**Figura 16: Resultado da análise dos ascósporos viáveis após dissecação da linhagem  $\Delta$ YDR115W diplóide.** No primeiro quadro é possível verificar os ascósporos que cresceram em YPD com geneticina, indicando a presença do gene interrompido com cassete de KAN. Comparando com o segundo quadro é possível concluir que os ascósporos deficientes respiratórios (que não cresceram em YPEG) são resistentes à geneticina. Porém a deficiência respiratória é resultado de mutação no DNA mitocondrial.

Para confirmar que a colônia do mutante para YDR115W diplóide não estava contaminada com outra, foi feito teste de colônia isolada, testando-as em YPD com geneticina, em YPEG e em WO (auxotrofia), e os resultados realmente mostraram que os clones comportaram-se de maneira idêntica e esperada. Também foi feita a amplificação da região do cassete de KAN, como pode ser observado no item 4.2.4.

É importante ressaltar que estes testes foram realizados logo após o crescimento dos ascósporos em YPD. Objetivou-se caracterizar os ascósporos gerados, mas foi possível

concluir que o DNA mitocondrial desta linhagem é bastante instável, já que mostrou a presença de petites rapidamente.

A idéia de testar a expressão fenotípica das linhagens mutantes em outro “background” genético existia previamente, porém uma observação feita por Luban *et al.* (2005) sobre a expressão de fenótipos diferentes em relação ao nocaute de um mesmo gene reforçou nossa hipótese.

#### **Cruzamento de $\Delta$ YDR115W com W303-1B**

Neste caso, a expressão do fenótipo em outro “background” genético teve como objetivo analisar como seria o comportamento dos diplóides provenientes do cruzamento entre  $\Delta$ YDR115W e W303-1B, depois de dissecados.

O resultado pode ser observado na Figura 17. Praticamente o mesmo comportamento observado na dissecção da linhagem diplóide  $\Delta$ YDR115W da EUROSCARF foi observado para a diplóide resultante do cruzamento de  $\Delta$ YDR115W (também da EUROSCARF) com W303-1B: os ascósporos resistentes à geneticina não cresceram em YPEG, ou seja, possuem o alelo interrompido e a deficiência respiratória. Assim como no primeiro caso, foi comprovado experimentalmente que a deficiência respiratória foi devida à instabilidade no DNA mitocondrial. Um fato importante e que diferenciou os dois experimentos foi o crescimento em YPD dos 4 ascósporos de cada asco (com o diplóide  $\Delta$ YDR115W da EUROSCARF só houve o crescimento de 2 ascósporos).

YPD Kan					YPEG				
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
+	+			+			+	+	
		+	+		+	+			+
			+		+	+	+		+
+	+	+		+				+	

**Figura 17: Resultado da dissecação de tétrades de segregantes provenientes do cruzamento de  $\Delta$ YDR115W com W303-1B.**

No quadro da esquerda é possível verificar os ascósporos que cresceram em YPD com geneticina, indicando a presença do gene interrompido com cassete de KAN. Comparando com o quadro da direita é possível concluir que os ascósporos deficientes respiratórios (que não cresceram em YPEG) são resistentes à geneticina. Porém a deficiência respiratória é resultado de mutação no DNA mitocondrial.

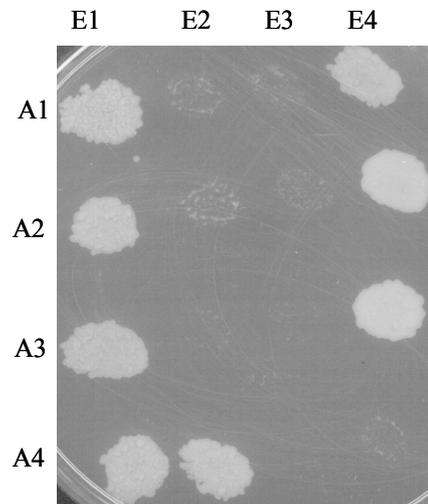
O mutante nulo para a ORF YDR115W é viável, ou seja cresce em meios com fonte de carbono fermentáveis. Este fato está comprovado pelo crescimento em YPD da linhagem haplóide  $\Delta$ YDR115W, adquirida da EUROSCARF. Uma possibilidade que explicaria o fato de apenas dois ascósporos provenientes da linhagem diplóide  $\Delta$ YDR115W (EUROSCARF) estarem crescendo em YPD seria a hipótese desta estar carregando uma mutação adicional letal, que impeça o crescimento em YPD.

#### **Cruzamento de $\Delta$ YDL119C com W303-1B:**

Primeiramente quatro conjuntos de tétrades foram testados quanto à resistência a geneticina (concentração final de 160  $\mu$ g/mL). Como pode ser observado na Figura 18, apenas dois ascósporos de cada tétrade possui resistência a geneticina, fato esperado, confirmando que as tétrades são provenientes da mesma meiose. Testes para verificar o tipo de acasalamento dos ascósporos também foram realizados e verificou-se que realmente dois são do tipo de acasalamento “a” e dois são “ $\alpha$ ”.

O próximo teste realizado visou descobrir a auxotrofia dos ascósporos. Para isso, plaqueou-se os mesmos em meio WO acrescido de todas as combinações de suplementos (his,

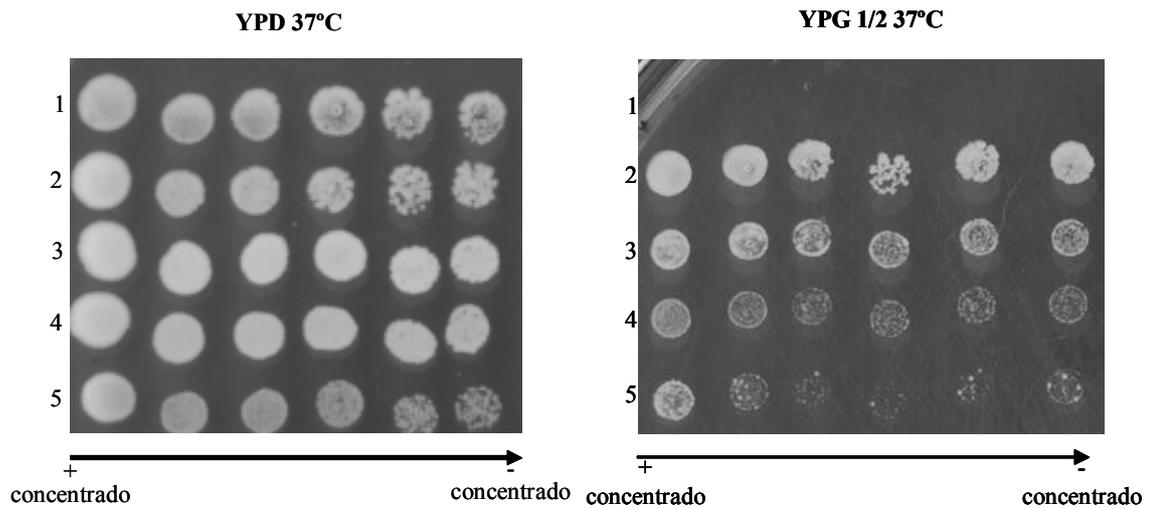
leu, ura, met, ade, trp). Esta análise sugere que houve um “mix” do “background” genético, já que os ascósporos apresentaram auxotrofias distintas.



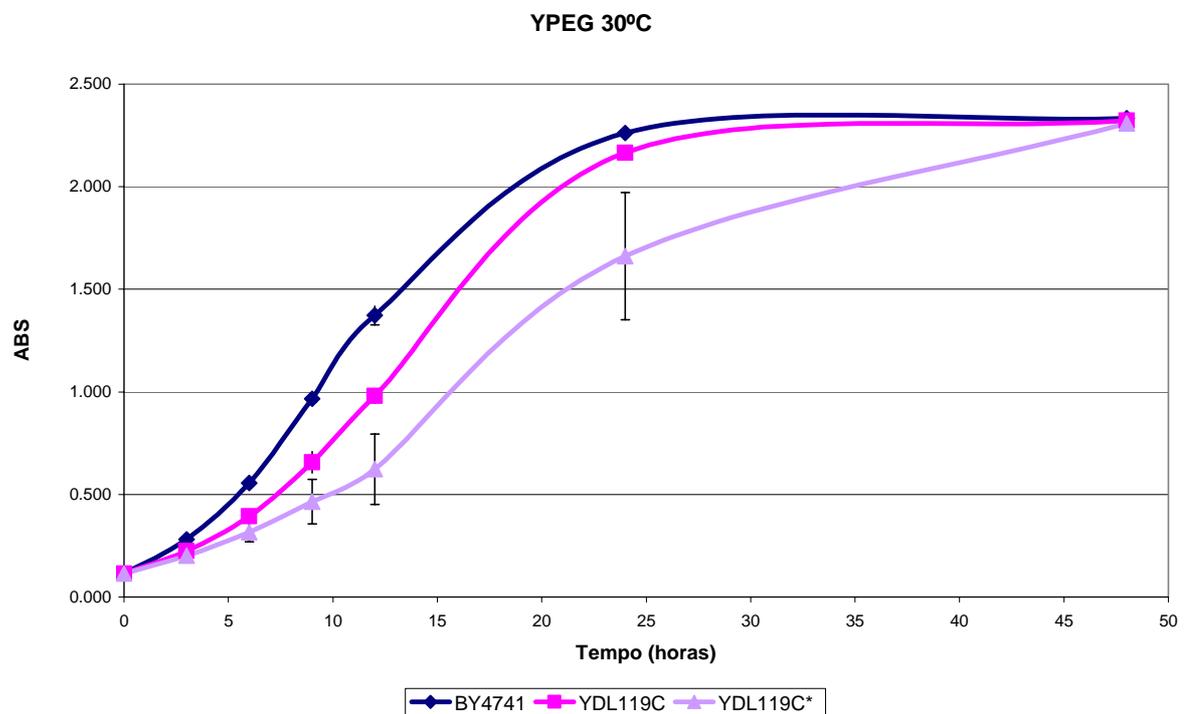
**Figura 18: Análise da resistência a geneticina de quatro grupos de tétrades provenientes do cruzamento do segregante do mutante  $\Delta YDL119C$  após cruzamento com W303-1B ( $\Delta YDL119C^*$ ).**

O crescimento de apenas dois ascósporos por asco confirma que os mesmos são provenientes de um mesmo asco. 2 dias de incubação à 30°C (E → esporo, ou ascósporo; A → asco).

Partiu-se então para a análise fenotípica por diluição seriada dos mesmos. O resultado pode ser observado na Figura 19. Foi obtido um ascósporo cujo fenótipo respiratório deficiente está mais evidente em relação à linhagem mutante  $\Delta YDL119C$ . Também foi feito o acompanhamento da curva de crescimento, o que está representado no Gráfico 3 e no Gráfico 4.

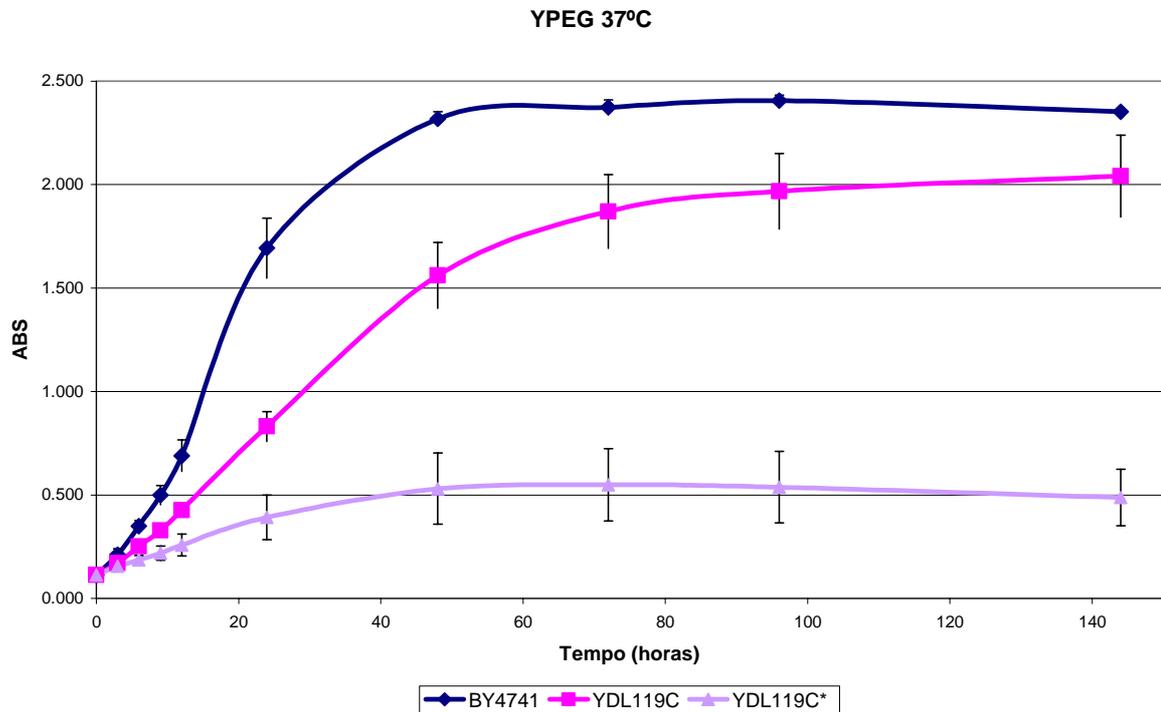


**Figura 19: Análise do crescimento por série de diluição de um ascósporo proveniente do cruzamento do segregante do mutante  $\Delta YDL119C$  após cruzamento com W303-1B ( $\Delta YDL119C^*$ ).** (1) CB11; (2) W303-1B; (3) BY4741; (4) mutante  $\Delta YDL119C$ ; (5) um ascósporo selecionado do cruzamento indicado. Observar que o fenótipo deficiente respiratório está mais evidente na tétrede do que no mutante correspondente



**Gráfico 3: Curva de crescimento em YPEG 30°C do controle BY4741, do mutante  $\Delta YDL119C$  e do segregante do mutante  $\Delta YDL119C$  após cruzamento com W303-1B ( $\Delta YDL119C^*$ ).**

O crescimento de cada uma das linhagens foi monitorado medindo-se os valores de absorvância (ABS) a 600nm ao longo de 48 horas.



**Gráfico 4:** Curva de crescimento YPEG 37°C do controle BY4741, do mutante  $\Delta$ YDL119C e do segregante do mutante  $\Delta$ YDL119C após cruzamento com W303-1B ( $\Delta$ YDL119C\*). O crescimento de cada uma das linhagens foi monitorado medindo-se os valores de absorbância (ABS) a 600nm ao longo de 144 horas.

#### 4.2.4- Análise das amplificações

Os iniciadores foram elaborados a fim de evitar possíveis erros, porém 02 deles (502 e 503) precisaram ser refeitos pela empresa fornecedora (W-Med oligos), ocasionando um atraso de 4 meses.

O DNA molde utilizado para as amplificações das ORFs foi a linhagem selvagem W303-1A.

Para a amplificação das ORFs YDL119C, YDR115W e YOR022C foi preciso alterar bastante a temperatura de anelamento ( $T_m$ ) dos iniciadores indicado pelo fabricante, como pode ser observado na Tabela V. Foi utilizada a ferramenta BioMath Calculators, disponível no “site” da PROMEGA (<http://www.promega.com/biomath/>). Nesta são oferecidos 03 tipos

de cálculos diferentes, porém decidiu-se pela utilização do “Salt-Adjusted  $T_m$  Calculations”, cuja fórmula é comumente usada e considera a concentração de sal na reação (50 mM de cátions monovalentes).

**Tabela V: Temperaturas de anelamento ( $T_m$ ) fornecidas pelo fabricante e calculadas com a fórmula disponível no “site” da empresa Promega**

ORF	Iniciador	$T_m$ Fabricante	“Salt-Adjusted $T_m$ ”
YDL119C	494	67°C	59°C
	495	63°C	56°C
YDR115W	496	65°C	56°C
	497	66°C	58°C
YDR332W	500	63°C	51°C
	501	62°C	56°C
YHR009C	502	65°C	54°C
	503	68°C	58°C
YOR022C	504	66°C	58°C
	505	60°C	56°C

Os tamanhos esperados para os fragmentos amplificados estão descritos na Tabela VI.

Após diversas tentativas, obteve-se sucesso (ver Figura 20) na amplificação das amostras referentes as ORFs YDL119C, YDR115W e YOR022C, com 57°C de temperatura de anelamento e uma extensão de 02 minutos.

Não foi possível amplificar as ORFs YDR332W e YHR009C, apesar das inúmeras tentativas realizadas. Podem ser citadas as diferentes temperaturas de anelamento utilizadas, que vão desde as fornecidas pelo fabricante até abaixo das indicadas pelo “site” da Promega. Também foi utilizado o DNA total da linhagem BY4741 e D273-10B, com o intuito de fornecer DNA molde diferente, podendo haver a amplificação da região desejada.

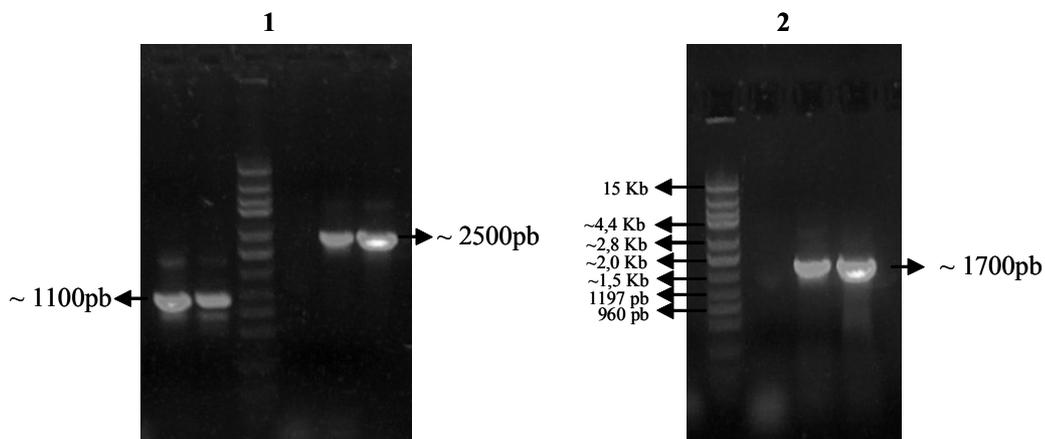
Com a ORF YHR009C foi feito um teste de ciclagem diferente, mas que infelizmente não deu certo: após uma desnaturação de 02 minutos a 95°C, iniciou-se a ciclagem propriamente dita com 95°C 45 segundos, 39°C por 45 segundos e 72°C por 2 minutos (39°C equivale a uma média dos  $T_{ms}$  dos iniciadores 502 e 503, considerando-se apenas a porção que realmente anela ao molde de DNA. Esta foi repetida por apenas 03 vezes, apenas para gerar

“template” para a seguinte reação, onde o iniciador anelaria por completo). Seguidamente foram realizados 32 ciclos com 95°C 45 segundos, 58°C 45 segundos e 72°C por 2 minutos. A reação terminou com uma extensão final de 72°C por 5 minutos.

Não há relatos sobre a tentativa de amplificação da ORF YER077C pois esta foi adicionada ao trabalho após a confecção dos iniciadores assim o objetivo foi analisar apenas seu comportamento fenotípico

**Tabela VI: Tamanhos esperados para os fragmentos provenientes de reação de PCR das ORFs estudadas.**

ORF	Produto de PCR
YDL119C	~ 1722pb
YDR115W	~1111pb
YDR332W	~2632pb
YHR009C	~2356pb
YOR022C	~2515pb



**Figura 20: Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% referente às amplificações por PCR das ORFs YDL119C, YDR115W e YOR022C.**

Padrão de tamanho de DNA apresentando fragmentos de 15 Kb, 7967 pb, 5644 pb, 4408 pb, 2833 pb, 2088 pb, 1575 pb, 1197 pb, 960 pb, 747 pb, 457 pb, 288 pb. Corridos 5µL de 25µL totais de reação. Os primeiros 03 poços do gel 01 referem-se a ORF YDR115W, utilizando, respectivamente os “kits” comerciais PCR Super Mix Taq DNA Polymerase e Platinum Pfx DNA Polymerase. Os 03 poços seguintes ao padrão são referentes à ORF YOR022C, nas mesmas condições citadas acima. No gel 02, os 03 poços posteriores ao padrão equivalem à amplificação da ORF YDL119C. Não houve amplificação com Super Mix. Os tamanhos dos fragmentos obtidos estão de acordo com o esperado (Tabela VI).

As preparações de DNA total dos mutantes de levedura foram realizadas com muito sucesso, resultando em quantidades e concentrações elevadas (ver exemplo na Figura 21), levando-se em conta a simplicidade do protocolo.



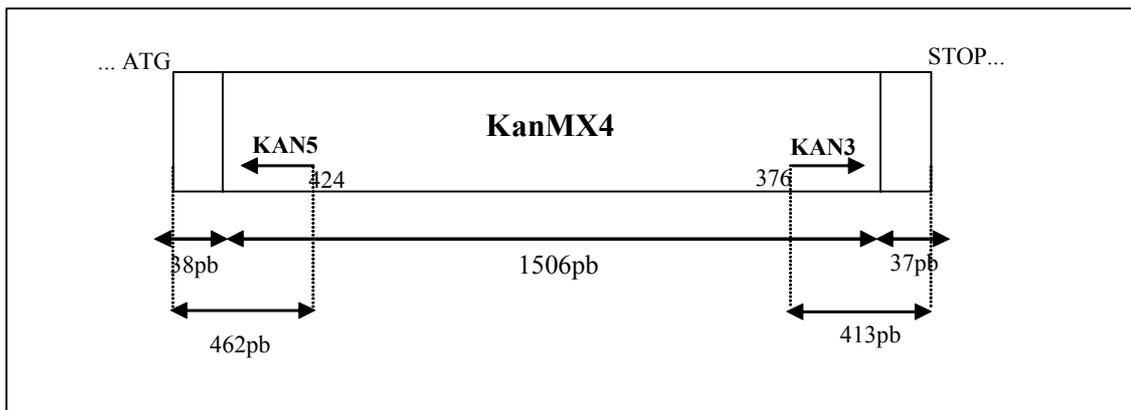
**Figura 21: Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% referente à preparação de DNA total dos mutantes  $\Delta$ YDL119C e  $\Delta$ YOR022C (haplóide), respectivamente.**

Padrão de tamanho de DNA apresentando fragmentos de 15 Kb, 7967 pb, 5644 pb, 4408 pb, 2833 pb, 2088 pb, 1575 pb, 1197 pb, 960 pb, 747 pb, 457 pb, 288 pb. Foi aplicado no gel 1 $\mu$ L, de 300 $\mu$ L totais.  $\Delta$ YDL119C: 35,64ng/ $\mu$ L;  $\Delta$ YOR022C: 32,25ng/ $\mu$ L

A amplificação com os iniciadores KAN-5 e KAN-3 é muito importante para a confirmação de que as linhagens em questão continham os respectivos alelos nulos para cada uma das ORFs selecionadas. Foram feitas as seguintes combinações de iniciadores:

- YDL119C: 494 + KAN-5 e 495 + KAN-3
- YDR115W: 496 + KAN-5 e 497 + KAN-3
- YOR022C: 504 + KAN-5 e 505 + KAN-3

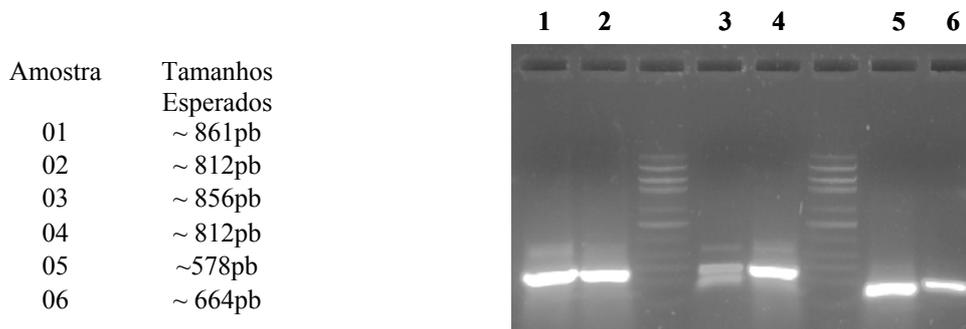
O esquema da amplificação pode ser observado na Figura 22. Os iniciadores do cassete KanMX4 são direcionados para fora do mesmo, conseqüentemente quando combinados com os iniciadores das ORFs confeccionados, amplificam regiões de tamanho específico, o que pode ser usado para correlacionar a ORF com o mutante correspondente. O resultado pode ser observado na Figura 23, o qual foi positivo para as ORFs YDL119C, YDR115W e YOR022C (haplóide).



**Figura 22: Esquema representativo da região amplificada no cassete de KanMX4.**

A região total amplificada na porção do “iniciador” KAN-5 corresponde a 462 nucleotídeos adicionados à região “upstream” do ATG da ORF até o iniciador senso. A região total amplificada na porção do iniciador KAN-3 equivale a 413 nucleotídeos adicionados à região “downstream” do códon de terminação da ORF até o iniciador anti-senso. Modificado de Saccharomyces Genome Deletion Project :

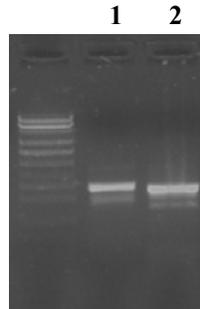
[http://www-sequence.stanford.edu/group/yeast\\_deletion\\_project/PCR\\_strategy.html](http://www-sequence.stanford.edu/group/yeast_deletion_project/PCR_strategy.html)



**Figura 23: Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% referente às amplificações diagnósticas do segmento ORF/KanMX4.**

Padrão de tamanho de DNA apresentando fragmentos de 15 Kb, 7967 pb, 5644 pb, 4408 pb, 2833 pb, 2088 pb, 1575 pb, 1197 pb, 960 pb, 747 pb, 457 pb, 288 pb. Foi aplicado no gel todo o produto de PCR. Nos dois primeiros poços encontram-se as duas amplificações referentes ao mutante  $\Delta$ YDL119C; as duas amplificações seguintes equivalem ao mutante  $\Delta$ YDR115W haplóide; as duas finais, ao  $\Delta$ YOR022C. Todos os fragmentos de amplificação são congruentes com os tamanhos esperados.

Também foram realizadas reações de amplificação para a ORF YDR115W diplóide, utilizando-se as combinações de iniciadores: 496 + KAN-5, 497 + KAN-3 e 496 + 497, conforme Figura 24. As amplificações com as combinações de iniciadores 496 + KAN-5 e 497 + KAN-3 estão no tamanho correto (~ 856 pb e ~812 pb).



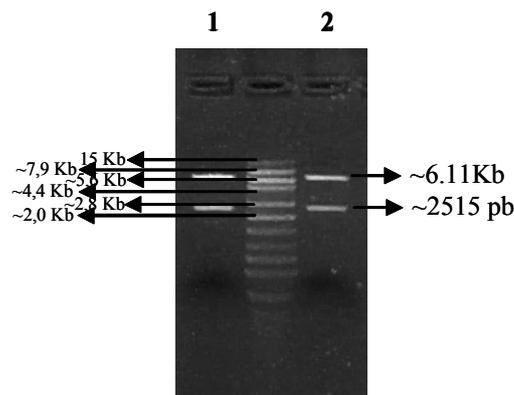
**Figura 24: Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% referente às ampliações diagnósticas do segmento ORF/KanMX4 de  $\Delta$ YDR115W diplóide.**

Padrão de tamanho de DNA apresentando fragmentos de 15 Kb, 7967 pb, 5644 pb, 4408 pb, 2833 pb, 2088 pb, 1575 pb, 1197 pb, 960 pb, 747 pb, 457 pb, 288 pb. Foi aplicado no gel todo o produto de PCR. Poço 1- Fragmento da amplificação 496 + KAN-5 (~856pb); Poço 2 - Fragmento da amplificação 497 + KAN-3 (~812pb).

#### 4.2.5- Confirmação das construções nos vetores por digestão enzimática

Foi possível confirmar, por digestão enzimática, algumas construções nos vetores YCplac33 e YCplac111. Existem algumas vantagens para a clonagem nestes plasmídeos, uma delas é que são vetores ponte, podendo ser inseridos tanto em bactérias quanto em leveduras. Outra vantagem que pode ser citada é que são vetores centroméricos, ou seja, presentes em apenas uma cópia por célula, o que reproduz o comportamento cromossomal da ORF (GIETZ; SUGINO, 1988).

A Figura 25 mostra digestões duplas com *Sma*I e *Sac*I, de dois clones da construção YOR022C/YCplac111, confirmando-a. Com estes fez-se transformação de levedura (ver item 4.2.6).



**Figura 25: Análise eletroforética em gel de agarose 1% referente às digestões enzimáticas de dois clones da construção YOR022C/YCplac111.**

Padrão de tamanho de DNA apresentando fragmentos de 15Kb, 7967pb, 5644pb, 4408pb, 2833pb, 2088pb, 1575pb, 1197pb, 960pb, 747pb, 457pb, 288pb. Foi aplicada no gel toda a reação (10 $\mu$ L). Poço 1: Digestão clone 1 com *SmaI* e *SacI*; Poço 2: Digestão clone 2 com *SmaI* e *SacI*. AS bandas são referentes aos tamanhos aproximados de 6.11Kb, referente ao plasmídeo e 2515pb, referente ao tamanho do inserto de YOR022C.

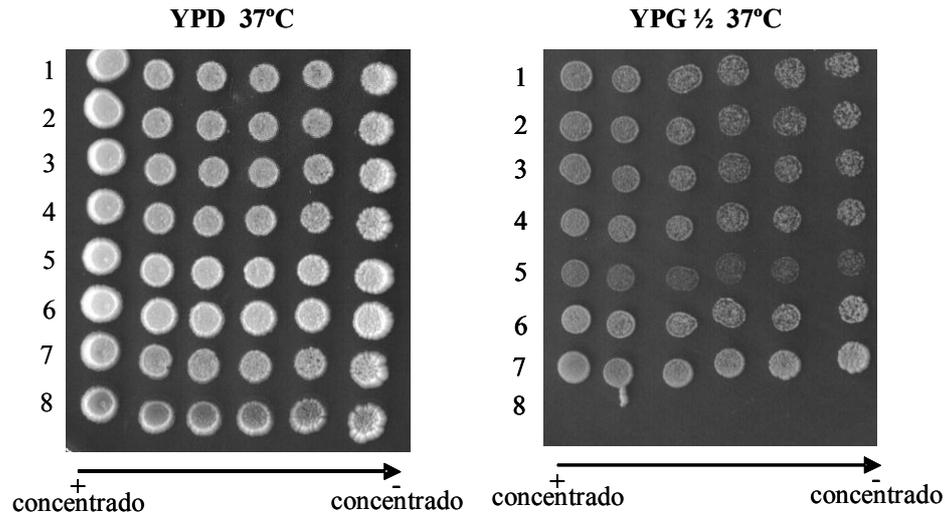
Também foram confirmados clones das construções YOR022C/YCplac33, YDL119C/YCplac33, YDL119C/YCplac111 e YDR115W/YCplac33, os quais foram transformados em levedura.

As construções YDL119C/YCplac33 e YDL119C/YCplac111 também foram transformadas na linhagem mutante  $\Delta$ YDL119C\*.

#### 4.2.6 - Transformação homóloga em levedura

Com o intuito de restaurar a capacidade respiratória das linhagens mutantes  $\Delta$ YDL119C,  $\Delta$ YDR115W e  $\Delta$ YOR022C e confirmar a interrupção das respectivas ORFs com cassete de KAN, foram realizadas transformações homólogas em levedura.

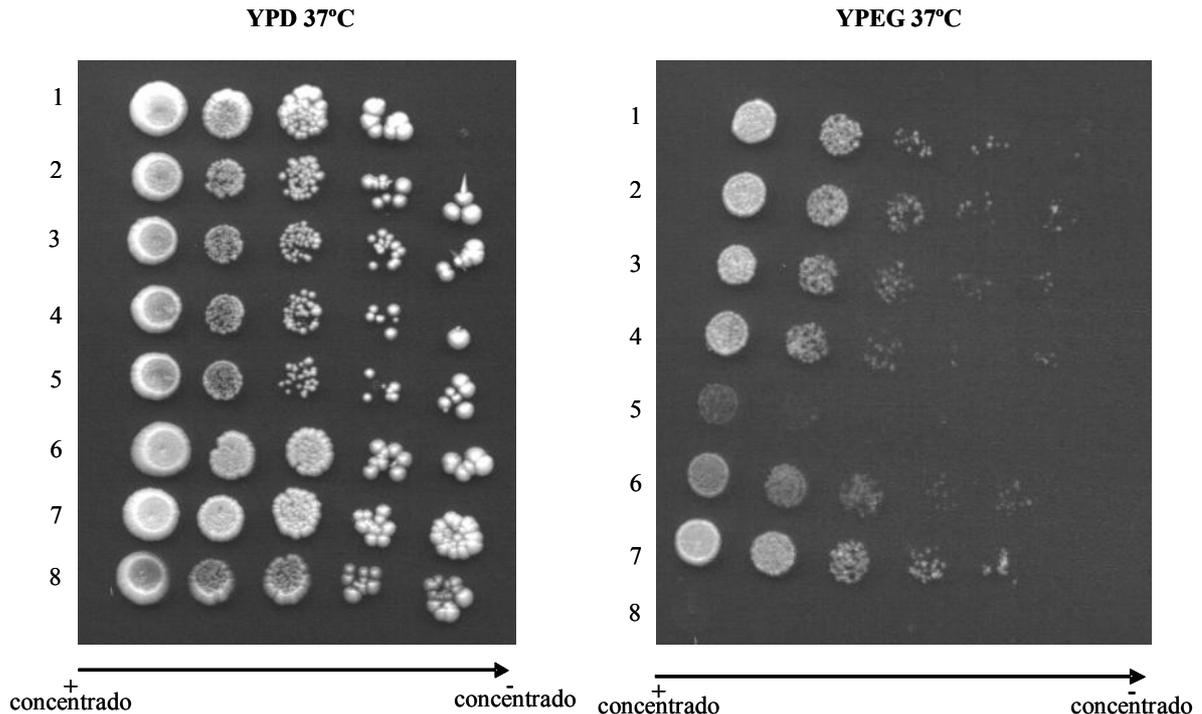
A Figura 26 mostra o resultado da transformação homóloga da linhagem mutante  $\Delta$ YOR022C com a construção YOR022C/YCplac111 (clone 1 da Figura 25). Não foi realizada transformação com a construção YOR022C/YCplac33.



**Figura 26: Análise da expressão fenotípica de quatro clones provenientes da transformação da linhagem mutante  $\Delta$ YOR022C com a construção YOR022C/YCplac111.**

(1)  $\Delta$ YOR022C + YCplac111/YOR022C, clone 1; (2)  $\Delta$ YOR022C + YCplac111/YOR022C, clone 2; (3)  $\Delta$ YOR022C + YCplac111/YOR022C, clone 3; (4)  $\Delta$ YOR022C + YCplac111/YOR022C, clone 4; (5)  $\Delta$ YOR022C; (6) BY4741; (7) W303-1B; (8) CB11. A capacidade respiratória dos quatro clones transformados foi restaurada, já que houve crescimento mais intenso dos clones do que o mutante  $\Delta$ YOR022C, após quatro dias de incubação

A transformação da linhagem mutante  $\Delta$ YDL119C com as construções YDL119C/YCplac33 e YDL119C/YCplac111 gerou resultados positivos, com restabelecimento da capacidade respiratória do mutante, assim como a transformação do mutante  $\Delta$ YDL119C\* (Figura 27).



**Figura 27: Análise da expressão fenotípica de quatro clones provenientes da transformação da linhagem mutante  $\Delta$ YDL119C\*.**

(1) clone 1 - YDL119C/YCplac111 ; (2) clone 2 - YDL119C/YCplac111; (3) clone 1 - YDL119C/YCplac33; (4) clone 2 - YDL119C/YCplac33; (5)  $\Delta$ YDL119C\*; (6) mutante  $\Delta$ YDL119C; (7) BY4741, (8) (4) CB11. A capacidade respiratória dos quatro clones transformados foi restaurada, já que houve crescimento mais intenso dos clones do que o mutante  $\Delta$ YDL119C\*, após quatro dias de incubação.

A construção YDR115W/YCplac33 foi transformada na linhagem mutante diplóide  $\Delta$ YDR115W, já que a haplóide possui o DNA mitocondrial instável. Após a transformação, os clones foram submetidos à metodologia de esporulação. Após a micromanipulação das tétrades, observou-se o mesmo problema descrito no item 4.2.3 dos resultados, em relação à dissecação das tétrades do mutante não transformado  $\Delta$ YDR115W: houve o crescimento – em forma de colônia - de 2 ascósporos de cada asco.

Estes foram testados em geneticina e em YPEG. Percebeu-se que, diferentemente das amostras não transformadas, alguns ascósporos que eram resistentes à geneticina cresceram em YPEG (Figura 28), ou seja, possuem o alelo interrompido mas a deficiência respiratória foi restaurada pela presença do plasmídeo carregando o inserto, havendo a expressão do produto gênico da ORF YDR115W. Assim, a instabilidade do DNA mitocondrial (geração de

petites) foi controlada, já que a proteína referente à ORF YDR115W está presente, desempenhando a sua função, provavelmente relacionada à síntese protéica.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
YPD KAN		⊕		+	⊕	+		⊕	⊕
	+							+	⊕
YPEG	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	+	⊕	+		⊕		+	⊕	⊕
		+	+	+	+	+	+		⊕

**Figura 28: Resultado da dissecação de tétrades da linhagem  $\Delta$ YDR115W diplóide transformada com a construção YDR115W/YCplac33.**

No primeiro quadro é possível verificar os ascósporos que cresceram em YPD com geneticina, indicando a presença do gene interrompido com cassete de KAN. Comparando com o segundo quadro – YPEG, onde alguns ascósporos que possuem o alelo interrompido cresceram (no esquema aparecem circulos), é possível concluir que houve transformação homóloga, com restauração da capacidade respiratória devido a presença do plasmídeo carregando a construção YDR115W/YCplac33.

#### 4.2.6- Consumo de Oxigênio

Para os experimentos de consumo de oxigênio foi utilizado o oxígrafo Oxygraph Versão 1.01, Hansatech Instruments.

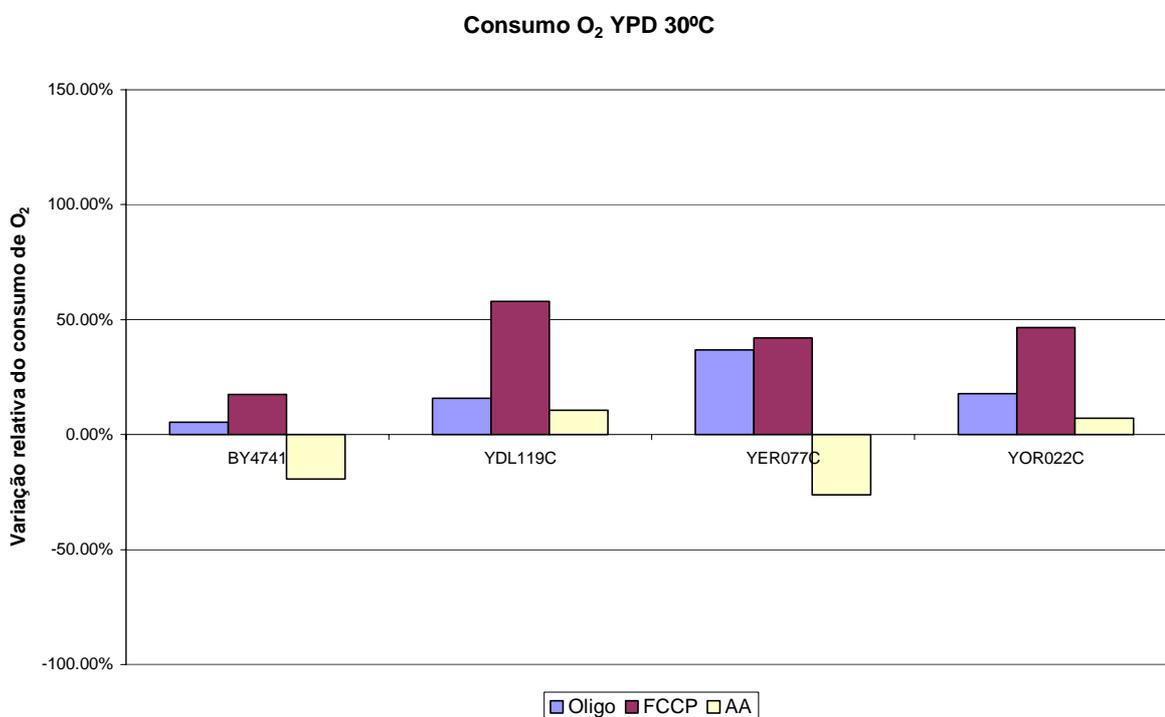
Foram realizados testes com as linhagens W303-1B, BY4741,  $\Delta$ YDL119C,  $\Delta$ YER077C e  $\Delta$ YOR022C, em YPD. Em YPEG foram testadas estas mesmas linhagens e mais  $\Delta$ YDR115W (haplóide),  $\Delta$ YDR332W,  $\Delta$ YHR009C.

Foram realizados diversos experimentos antes de se atingir a padronização adequada. Os resultados mostrados aqui são provenientes de células pré-inoculadas em YPD ou YPEG, re-inoculadas no mesmo meio de cultura, quando atingiram a DO de 0,2 a 600 nM e após crescimento por 2 horas. Todos os experimentos de consumo de oxigênio foram realizados com cerca de  $1,16 \times 10^7$  células.

Com base nos experimentos preliminares, optou-se pela utilização de oligomicina 10  $\mu\text{g/mL}$ , FCCP 5  $\mu\text{M}$  e antimicina A 1  $\mu\text{M}$ . Todas as concentrações utilizadas estão de acordo com as encontradas na literatura. Os compostos foram adicionados sempre na mesma ordem, seguindo o esquema abaixo:

- com 4 minutos de experimento: adição da oligomicina;
- com 7 minutos de experimento: adição de FCCP;
- com 10 minutos de experimento: adição de antimicina A.

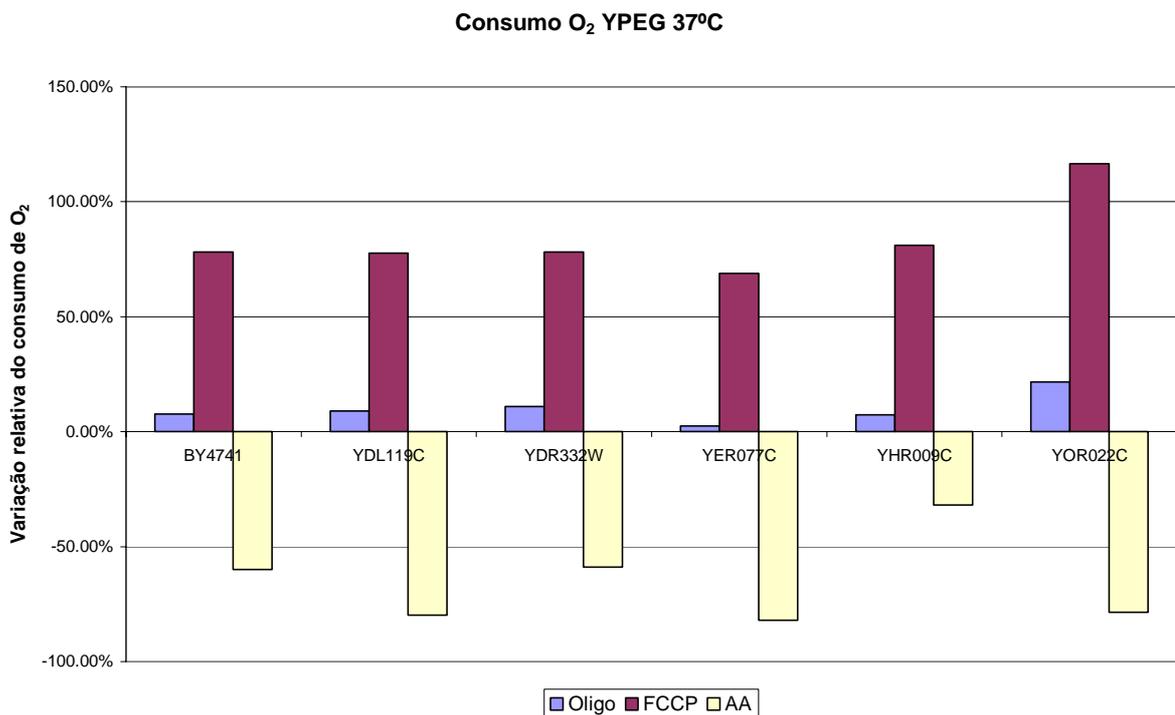
Observando o Gráfico 5 é possível ter uma idéia geral da variação relativa do consumo de oxigênio em YPD a 30°C (condição ideal para o crescimento de *S. cerevisiae*). Neste caso o consumo antes da adição dos compostos foi considerado como 100%. Deste modo, a variação mostrada no gráfico é referente às comparações feitas com base neste valor inicial, ou seja, na velocidade de consumo de oxigênio durante os 4 minutos iniciais.



**Gráfico 5: Variação do consumo de oxigênio das linhagens BY4741,  $\Delta$ YDL119C,  $\Delta$ YER077C e  $\Delta$ YOR022C, em YPD, 30°C.**

Com o Gráfico 5 é possível perceber que mesmo com presença de glicose, ocorre consumo de oxigênio via cadeia de transporte de elétrons, já que em todos os casos ocorre um aumento do consumo de oxigênio quando FCCP (um desacoplador) é adicionado e redução do consumo quando antimicina A é adicionada. A presença de oligomicina gera um fato inesperado: ocorre aumento no consumo de oxigênio e não a inibição da respiração, como seria o esperado.

No Gráfico 6 é possível ter uma idéia geral da variação relativa do consumo de oxigênio em YPEG a 37°C (condição estressante para *S. cerevisiae*). Esta análise também considerou o consumo antes da adição dos inibidores como 100%.

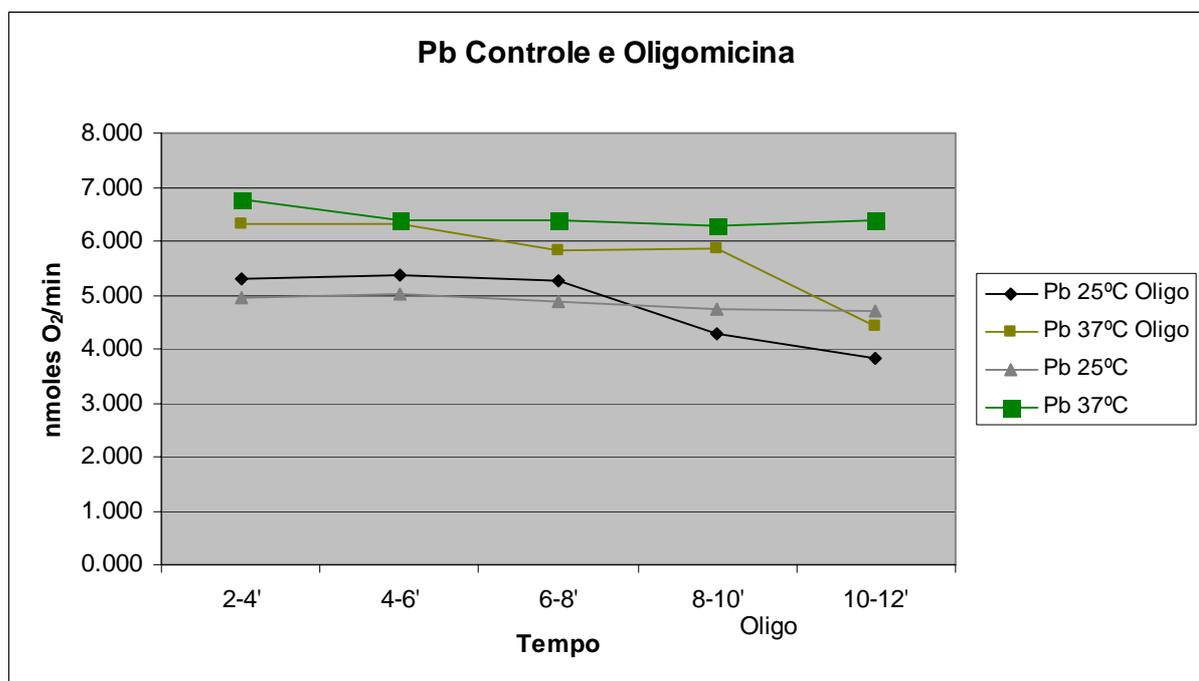


**Gráfico 6: Variação do consumo de oxigênio das linhagens BY4741,  $\Delta$ YDL119C,  $\Delta$ YDR332W,  $\Delta$ YER077C,  $\Delta$ YHR009C e  $\Delta$ YOR022C, em YPEG, 37°C.**

Em YPEG 37°C percebe-se que houve, proporcionalmente, um maior consumo de oxigênio quando FCCP foi adicionado, assim como uma maior inibição quando antimicina A foi adicionada, em todas as amostras, o que mostra que nesta condição a capacidade respiratória da mitocôndria está aumentada. Este experimento vem comprovar que as linhagens mutantes, ditas deficientes respiratórias, na verdade têm a cadeia respiratória funcional (STEINMETZ *et al.*, 2002).

Com o Gráfico 6 também é possível verificar que a adição de oligomicina não inibiu a respiração celular, como era o esperado, para o crescimento em presença de fontes de carbono não fermentáveis.

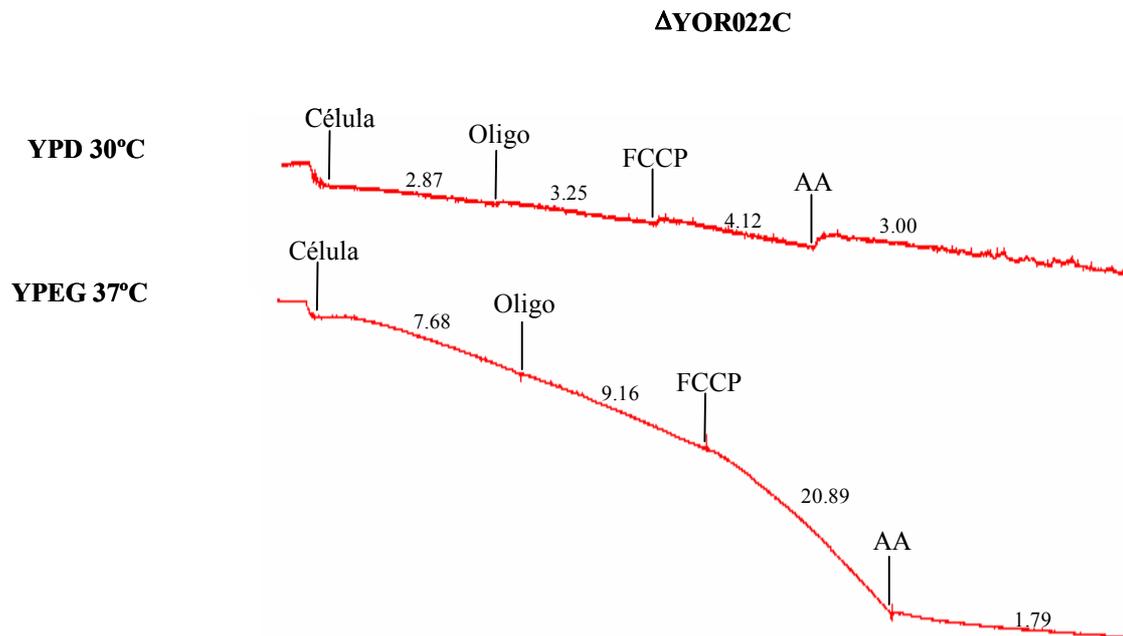
A possibilidade da oligomicina não estar funcionando foi excluída, já que esta mesma alíquota estava sendo usada por outra pesquisadora no laboratório, com o fungo termodimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* com sucesso. No Gráfico 7 está representado um dos seus ensaios que confirma a atividade deste inibidor.



**Gráfico 7: Consumo de oxigênio em *Paracoccidioides brasiliensis*.**

Percebe-se que com a adição de oligomicina houve diminuição no consumo de oxigênio, tanto em 25°C quanto em 37°C

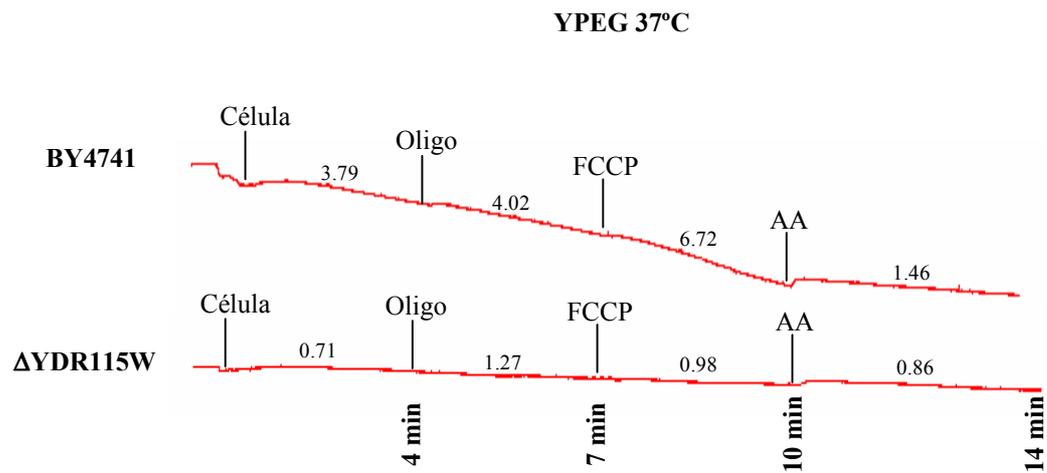
Na Figura 29 está representado o consumo de oxigênio da linhagem  $\Delta YOR022C$  tanto em YPD como em YPEG. O intuito é exemplificar a diferença do perfil do traçado (o consumo de oxigênio é medido em nmoles/mL) em relação aos dois meios de cultura. Em YPD, a velocidade do consumo de oxigênio é bem menor do que em YPEG, que não pode ser fermentado.



**Figura 29: Consumo de oxigênio pela linhagem  $\Delta YOR022C$ , em YPD e YPEG.**

Os valores numéricos no traçado indicam o consumo de oxigênio em nMoles. A descrição das adições está especificada no texto

O mutante  $\Delta YDR115W$  apresentou baixo consumo de oxigênio em YPEG, fato que condiz com sua incapacidade respiratória decorrente de mutação no DNA mitocondrial. O baixo nível de consumo de oxigênio deste mutante, comparado com o do controle BY4741 pode ser visto na Figura 30.



**Figura 30: Consumo de oxigênio pelas linhagens BY4741 e  $\Delta$ YDR115W (haplóide) em YPEG.** Os valores numéricos no traçado indicam o consumo de oxigênio em nMoles. A descrição das adições está especificada no texto.

## 5- DISCUSSÃO

Uma abordagem muito importante no estudo da função de um gene é o efeito gerado pela sua inativação. Organismos que possuem seu genoma conhecido e que são de fácil manipulação, como é o caso de *S. cerevisiae*, podem ter seus genes sistematicamente inativados. Os estudos globais com diversos objetivos tais como desvendar a função de proteínas envolvidas em determinado processo ou então de classificar produtos gênicos relacionados a certo fenótipo, partem da geração de bibliotecas de mutantes nulos.

A escolha das ORFs estudadas neste trabalho - YDL119C, YDR115W, YDR332W, YER077C, YHR009C e YOR022C - foi baseada no trabalho global de Steinmetz *et al.* (2002). Este grupo analisou qualitativamente 5791 mutantes heterozigotos diplóides e 4706 mutantes homozigotos diplóides de *Saccharomyces cerevisiae* em relação ao crescimento em 9 diferentes meios de cultura, buscando aqueles relacionados à atividade respiratória mitocondrial, com o objetivo de identificar, posteriormente, genes mitocondriais humanos ortólogos aos de levedura e possivelmente envolvidos em mitocondriopatias.

Os mutantes utilizados por Steinmetz *et al.* (2002) foram gerados por um consórcio que envolveu laboratórios de diversos países, o qual recebeu o nome de “*Saccharomyces* genome deletion project” (WINZELER *et al.*, 1999).

A vantagem da substituição total de um gene é a perda irreversível da sua função (GIAEVER *et al.*, 2002). No caso de Steinmetz *et al.* (2000), a inativação dos genes foi completa - desde o códon inicial até o terminador - através da introdução por recombinação de um cassete de *KanMX*, flanqueado por seqüências de 20 nucleotídeos únicas para cada ORF deletada, gerando os chamados alelos nulos.

Devido ao grande número de mutantes, Steinmetz *et al.* (2002) optaram pela realização de “pools” para o crescimento das linhagens. Após o crescimento, foi feita a extração do DNA genômico do “pool” e posterior amplificação utilizando-se as seqüências

únicas de cada ORF. A intensidade do crescimento de cada amostra foi avaliada por “microarray”.

No “pool” de linhagens heterozigotas destacaram-se poucos mutantes deficientes respiratórios, então sugeriram que a quantidade do produto gênico gerado pelo alelo normal era suficiente para desempenhar a função. Assim os principais resultados foram gerados com base no “pool” de linhagens homozigotas.

Dos 4706 mutantes diplóides homozigotos, 3928 pertencem à Classe I – crescimento igual em todos os meios de cultura; 276 compõem a Classe II – com crescimento superior em meios de cultura não fermentáveis; 502 fazem parte da Classe III, com deficiência de crescimento em meios não-fermentáveis em níveis variáveis. Removendo-se as ORFs dúbias, restaram 466. Destas, 201 (43%) codificam para proteínas com função ou localização sabidamente mitocondriais, 35% (161) mostram-se como possuindo localização subcelular desconhecida e na maioria dos casos, função não sabida, 104 ORFs (22%) possuem funções não relacionadas à mitocôndria, como transporte de íons, transcrição, sinalização protéica, entre outras.

Segundo o portal “Yeast Deletion Project and Proteomics of Mitochondria Database” disponível em [http://www-deletion.stanford.edu/YDPM/YDPM\\_index.html](http://www-deletion.stanford.edu/YDPM/YDPM_index.html), que contém informações suplementares ao trabalho de Steinmetz *et al.* (2002), todas as ORFs selecionadas para este mestrado estão contidas na Classe III (deficiência de crescimento em meios não-fermentáveis mais ou menos severa), sendo que a ORF YDL119C pertence ao grupo de ORFs sabidamente mitocondriais enquanto as demais estão no grupo caracterizado por função e/ou localização desconhecidos.

## 5.1- Análises *in silico*:

### 5.1.1- YDL119C

El Moualij *et al.* (1997) realizaram uma busca *in silico* das ORFs possivelmente pertencentes à família de carreadores mitocondriais, com base na análise de sequências. Encontraram 34 proteínas que poderiam pertencer a esta família e com este dado foi feito um estudo filogenético. A ORF YDL119C foi citada neste trabalho.

Três anos mais tarde, Belenkiy *et al.* (2000) retomaram o estudo de todas as proteínas carreadoras mitocondriais, porém relataram a existência de 35 e não de 34, como proposto por El Moualij *et al.* (1997). Neste trabalho foram geradas novas sequências de 04 ORFs cuja massa dos produtos protéicos tinham um desvio significativo da média de 30-KDa. Com as demais proteínas foram realizadas comparações *in silico* utilizando dados de estudos globais como o de De Risi; Iyer; Brown (1997).

Na revisão realizada por Arco; Satrústegui (2005), com base no trabalho de El Moualij *et al.* (1997), foram listadas 34 ORFs cujos produtos protéicos são carreadores mitocondriais. A proteína Ugo1p, inicialmente descrita como uma carreador mitoncodrial, foi excluída já que se localiza na membrana externa da mitocôndria.

Os carreadores mitocondriais foram divididos em categorias, pré-estabelecidas por El Moualij *et al.* (1997), de acordo com os metabólitos que transportam. O primeiro grupo refere-se à carreadores mitocondriais envolvidos no transporte de ADP/ATP, o segundo à carreadores de ácidos dicarboxílicos e o último à carreadores de cofatores mitocondriais (fosfato, por exemplo), citrato e metabólitos relacionados, sendo que a ORF YDL119C pertence a este grupo, porém ainda não foi descoberto o exato metabólito que esta ORF transporta.

Os primeiros resultados informativos do BLASTP realizado para a ORF YDL119C mostrou similaridade com proteínas carreadoras mitocondriais dos fungos *Aspergillus*

*fumigatus* e *Candida glabrata*. O resultado fornecido pelo WU BLAST mostra similaridade da ORF em questão com as 33 proteínas transportadoras mitocondriais citadas na literatura. A de maior similaridade é a proteína codificada pela ORF YPR021C/*AGCI* (transportador aspartato-glutamato), contida no mesmo grupo da ORF YDL1119C, segundo Arco; Satrústegui (2005).

Os domínios protéicos apresentados pela ORF YDL1119C também indicam que esta proteína faz parte da família de carreadores mitocondriais. Assim como a proteína codificada pela ORF em questão, todas as que fazem parte desta família possuem 3 domínios “Mito\_carr” ao longo da seqüência, com exceção de apenas 4 proteínas, que possuem apenas 2 domínios.

Em relação ao endereçamento do produto gênico da ORF YDL1119C, foi possível verificar que cada programa trouxe um resultado distinto, o que pode ser explicado pelo fato das proteínas carreadoras mitocondriais não possuírem endereçamento protéico N-terminal e sim sinalização ao longo da seqüência (NEUPERT, 1997). É importante ressaltar que os programas utilizados reconhecem apenas seqüências N-terminais.

Proteínas destinadas à membrana interna da mitocôndria são transportadas via TOM. No espaço intermembranar são acompanhadas pelas chaperonas Tim9p e Tim10p até atingirem o complexo TIM22, que conduz a inserção. Este processo é dependente do potencial da membrana interna (KOEHLER, 2004) e, por conseguinte, da respiração.

#### 5.1.2- YDR115W

Gan *et al.* (2002) realizaram a identificação experimental por espectroscopia de massa de várias proteínas que compõem o ribossomo mitocondrial da levedura. Também verificaram o crescimento dos respectivos mutantes em meios de cultura contendo fonte de carbono não fermentáveis. Em seu trabalho, classificam a ORF YDR115W como uma proteína ribossomal mitocondrial, com base na análise *in silico* de similaridade à proteína ribossomal bacteriana

L34. Askree *et al.* (2004) fizeram uma ampla classificação das ORFs de *S. cerevisiae* relacionadas ao metabolismo dos telômeros, através da análise de mutantes para estas ORFs. Verificaram que, surpreendentemente, genes relacionados à diversas funções estão envolvidos neste processo. Determinaram experimentalmente que a deleção da ORF YDR115W é responsável por uma leve diminuição no comprimento do telômero. A função da ORF YDR115W (proteína ribossomal mitocondrial putativa) está descrita no SGD com base no trabalho de Hughes *et al.* (2000), cuja evidência está relacionada à similaridade de seqüência.

Vale ressaltar que esta ORF está descrita como verificada no SGD, porém só foi estudada globalmente (STEINMETZ, *et al.*, 2002, GIAEVER *et al.*, 2002, HUGHES *et al.*, 2000).

A primeira similaridade significativa obtida com o BLASTP foi com uma proteína ribossomal hipotética de *Cryptococcus neoformans var. neoformans*. Os resultados subsequentes mostraram similaridade da proteína codificada pela ORF YDR115W com proteínas ribossomais de diversos organismos, inclusive com procariotos, o que condiz com o domínio protéico L34. Como já foi dito anteriormente, o WU BLAST não forneceu informações relevantes, já que a maior similaridade foi de e-value 0.020, considerada não significativa

Segundo os ensaios computacionais, com exceção do TargetP, a proteína codificada pela ORF YDR115W deve ser endereçada à mitocôndria. A análise de endereçamento realizada no TargetP para as proteínas sabidamente mitocondriais Atp2p, Mas2p e Coxp4 também trouxe resultados questionáveis, o que levanta dúvidas sobre a eficiência deste programa na predição de possíveis proteínas mitocondriais em *S. cerevisiae*.

Guda *et al.*, (2004) ao desenvolverem o programa Mitopred apontam deficiências nos outros algoritmos de análise de pré-sequência por não terem sido suficientemente alimentados em sua base de dados específica para cada espécie. Mas lembrando que a alta

taxa de aminoácidos hidrofóbicos na seqüência de clivagem auxilia a sustentar esta hipótese de endereçamento mitocondrial.

Na seqüência de aminoácido da proteína codificada pela ORF YDR115W foi possível detectar a presença do domínio protéico ribossomal L-34. As proteínas que compõem o ribossomo são nomeadas de acordo com a subunidade a qual pertencem: a menor (S1 à S31) e a maior (L1 à L44). A proteína L34 ribossomal é uma das presentes na subunidade maior do ribossomo de procariotos. É um polipeptídeo pequeno, composto de 44 à 51 resíduos.

### 5.1.3- YDR332W

Um importante trabalho relacionado à ORF YDR332W é o de Shiratori *et al.* (1999). Este grupo realizou um extenso estudo de identificação, classificação e caracterização sistemática de ORFs relacionadas à atividade de DNA helicase e RNA helicase em *Saccharomyces cerevisiae*. De acordo com o trabalho, a proteína codificada pela ORF YDR332W deve estar envolvida no processamento de ácidos nucléicos na mitocôndria. Devido à sua importância, o trabalho de Shiratori *et al.* (1999) será retomado em outros pontos da discussão.

Luban *et al.* (2005) estavam interessados em buscar novos genes nucleares envolvidos no processamento de íntrons na mitocôndria de levedura, além dos 18 apontados por Séraphin *et al.* (1997) como provavelmente relacionados a esta função. Luban *et al.* (2005) fecharam um grupo de 51 ORFs promissoras para se buscar aquelas envolvidas no processamento de íntrons na mitocôndria. A análise que fizeram em relação à ORF YDR332W baseou-se na análise de sua seqüência, a qual apresentou baixa similaridade com o gene *MSS116*, que codifica para uma proteína DEAD-box requerida para o processamento de íntrons mitocondriais, ou seja, segundo os autores, a ORF em questão está possivelmente envolvida neste processo. Um fato curioso foi que o trabalho de Luban *et al.* (2005) não cita ou possui

vínculo com o trabalho de Shiratori *et al.* (1999), onde o autor faz um levantamento sobre as ORFs relacionadas à função de helicase.

Tanto os resultados do BLASTP como do WU BLAST trouxeram similaridades da ORF YDR332W com proteínas relacionadas a função de helicase, sendo que o BLASTP resultou em similaridades apenas com fungos e procariotos. Os domínios protéicos presente ao longo de sua seqüência também estão relacionados à uma suposta função de helicase. O domínio HELICc (e-value do motivo: 3e-12) compreende uma superfamília de helicases de domínio c-terminal, associada com proteínas DEXDc (diversa família de proteínas envolvida na abertura do DNA e RNA e dependentes de ATP), DEAD (envolvidas em vários aspectos do metabolismo de RNA, incluindo transporte nuclear, processamento do pré-mRNA, biogênese de ribossomos, entre outros) e DEAH. O motivo de maior e-value (1e-69) é o SSL2, correspondente a uma DNA/RNA helicase da superfamília II, que está relacionada à replicação, transcrição recombinação e reparo do DNA.

De acordo com a análise computacional de endereçamento protéico realizada neste trabalho, a proteína codificada pela ORF YDR332W deve ser endereçada à mitocôndria. Apenas o programa Mitopred forneceu um resultado contraditório, indicando endereçamento não mitocondrial. Shiratori *et al.* (1999) comentam sobre o provável endereçamento desta proteína para mitocôndria, sendo que também utilizaram o programa PSORT. Luban *et al.* (2005), ainda com base no PSORT descrevem uma probabilidade de endereçamento de 65,2%, idêntico ao obtido neste trabalho. Huh *et al.* (2003) – referência do SGD - realizaram uma análise global de localização protéica em *S. cerevisiae*, por fusão com a proteína fluorescente verde (GFP). De acordo com este trabalho a proteína codificada pela ORF YDR332W é endereçada para a mitocôndria.

A análise dos aminoácidos presentes na suposta seqüência de endereçamento indicam a presença de menos de 50% de resíduos hidrofóbicos. Como foi dito anteriormente, há uma

tendência em se encontrar aminoácidos hidrofóbicos na porção relacionada ao endereçamento, porém isto não é uma regra.

#### 5.1.4- YER077C

Pouca informação está disponível em relação à ORF YER077C. Os principais trabalhos que a referenciam são os globais de Giaever *et al.* (2002) e Steinmetz *et al.* (2002). No trabalho de Dimmer *et al.* (2002) esta ORF é classificada como uma proteína de função desconhecida cuja linhagem mutante correspondente é deficiente respiratória. Os resultados do BLASTP mostraram similaridade principalmente com proteínas não nomeadas de outros ascomicetos e o WU BLAST resultou em similaridades com e-value muito ruins. A busca por domínios protéicos pelo NCBI trouxe como resposta a não detecção de domínios conservados.

A análise do endereçamento protéico realizada mostrou falta de congruência entre os resultados fornecidos pelos programas utilizados, não sendo possível apontar uma possível localização desta proteína, porém a informação disponível no SGD é baseada no trabalho de Huh *et al.* (2003), o qual indica endereçamento mitocondrial.

#### 5.1.5- YHR009C

Assim como para a ORF YER077C também há pouca disponibilidade de informação em relação à ORF YHR009C. Os trabalhos referência do SGD são os globais de Giaever *et al.* (2002), Steinmetz *et al.* (2002) e Rout *et al.* (2000), no qual foram sistematicamente definidos os componentes do complexo do poro nuclear de levedura. Neste trabalho diversas ORFs foram estudadas a fundo, fato que não se aplica para a ORF YHR009C. A proteína em questão foi identificada na fração referente ao complexo do poro nuclear, assim seu endereçamento foi experimentalmente definido como citoplasmático.

Os estudos computacionais de endereçamento protéico realizados para esta ORF sugerem um endereçamento não mitocondrial, com exceção do programa Mitopred, porém o

PSORT indica maior probabilidade de endereçamento nuclear. O curioso é que, no trabalho de Steinmetz *et al.* (2002) esta ORF está contida no grupo de 161 ORFs não classificadas e não no grupo de 104 ORFs sabidamente não mitocondriais, sendo que este fato já era conhecido, pois o trabalho de Rout *et al.* é de 2000, anterior ao de Steinmetz.

O BLASTP da ORF YHR009C mostrou que esta é similar a uma proteína citoplasmática putativa de *Cryptococcus neoformans var. neoformans*, o que reforça a questão sobre o seu provável endereçamento. Com um e-value um pouco menos significativo veio a similaridade com uma hipotética oxirredutase FAD-dependente de *Oryza sativa*. O WU BLAST resultou em similaridades pouco significativas.

O domínio protéico DadA presente na suposta proteína codificada por esta ORF também não é muito informativo, relacionando-se de uma maneira geral ao metabolismo e transporte de aminoácidos.

#### 5.1.6- YOR022C

Os trabalhos referentes à ORF também são os globais de Giaever *et al.* (2002) e Steinmetz *et al.* (2002). A suposta função de fosfolipase registrada no SGD é baseada no trabalho de Higgs *et al.* (1998), definida por comparação da seqüência com a de uma fosfolipase que catalisa a hidrólise de ácidos fosfatídicos em testículos de bovinos. O WU BLAST não mostrou resultados consistentes. Já o BLASTP da ORF YOR022C trouxe similaridade com proteínas não nomeadas de diversos ascomicetos, sendo que o primeiro resultado informativo foi relacionado à similaridade desta ORF com o motivo protéico DDHD de *Aspergillus fumigatus*. O interessante é que com e-value um pouco menos significativo veio a similaridade com uma fosfolipase que catalisa a hidrólise de ácidos fosfatídicos de *Neurospora crassa*, o que condiz com função proposta por Higgs *et al.* (1998) para a proteína

codificada para a ORF em questão. Não foi encontrada maior descrição sobre este domínio, apenas que contém 04 resíduos conservados que formam um sítio de ligação com metal.

De acordo com os programas computacionais utilizados, não houve consenso quanto o possível endereçamento desta proteína, embora a informação fornecida pelo SGD seja baseada em Huh *et al.* (2003), o qual indica endereçamento mitocondrial.

## 5.2 – Análise fenotípica

As linhagens mutantes e os controles utilizados no decorrer deste trabalho foram adquiridos da EUROSCARF, cuja coleção tem como referência o consórcio “*Saccharomyces* genome deletion project” (WINZELER *et al.*, 1999), assim como as linhagens mutantes utilizadas por Steinmetz *et al.* (2002).

De acordo com o portal SGD, as linhagens mutantes para as ORFs YDL119C, YDR115W, YDR332W, YER077C, YHR009C e YOR022C exibem defeito no crescimento em meios com carbono não-fermentável (respirável), sendo que esta característica é baseada em Steinmetz *et al.* (2002). Para todas as linhagens mutantes selecionadas, o trabalho global de Giaver *et al.* (2002) é a referência para o fenótipo mutante viável.

Ao realizar os primeiros testes fenotípicos verificou-se que todas as linhagens mutantes para as ORFs em questão cresceram em YPEG – etanol e glicerol, fontes de carbono não-fermentáveis, contradizendo assim os resultados apresentados por Steinmetz *et al.* (2002). A exceção foi a linhagem  $\Delta$ YDR115W, a qual foi posteriormente confirmada como petite.

Após este resultado, diversos meios de cultura foram testados e as linhagens plaqueadas por série de diluição. Apesar das linhagens mutantes terem apresentado fenótipo deficiente respiratório não estável, foi possível diferenciar de um modo sutil o crescimento destas em relação aos controles, tanto em YPEG quanto em YPG, desde que à temperatura limitante de 37°C.

A melhor diferenciação no crescimento das linhagens mutantes em relação ao controle só foi possível com o acompanhamento do crescimento através de uma curva, em condição de fonte de carbono (YPEG) e de temperatura limitantes (37°C).

O mutante  $\Delta$ YER077C foi o que demonstrou crescimento mais lento nesta condição, sendo que em YPEG a 30°C seu comportamento fenotípico foi muito semelhante ao da linhagem controle BY4741. Este é um dado importante, pois mostrou que a linhagem  $\Delta$ YER077C é um mutante condicional.

Mutantes condicionais em levedura são razoavelmente freqüentes e muito utilizados na descrição de fenômenos diversos tais como a herança e distribuição da organela (BERGER KH; YAFFE, 1996), como o estudo da função da RNA polimerase mitocondrial (LISOWSKY *et al.*, 1996).

O fato do alelo nulo para YER077C ter essa característica condicional favorece maiores caracterizações bioquímicas posteriores baseando-se na análise comparativa de suas propriedades na temperatura permissiva (30°) versus temperatura restritiva (37°C).

A análise da curva de crescimento das linhagens mutantes também confirmou a deficiência respiratória apresentada pelo mutante  $\Delta$ YDR115W, a qual foi verificada ser decorrente da instabilidade na manutenção do DNA mitocondrial.

É importante ressaltar novamente que os experimentos realizados por Steinmetz *et al.* (2002) foram baseados em “pools” de mutantes, o que pode gerar resultados que não condizem com aqueles encontrados quando os mutantes são analisados individualmente. A disputa por nutrientes, a produção de metabólitos liberados pelas células, a saturação de espaço, entre outros fatores, podem ocasionar comportamentos fenotípicos que não são confirmados pela análise individual detalhada.

Outra questão importante envolvida é o fato destas proteínas exercerem funções que não são essenciais para o crescimento celular em meios contendo fontes de carbono não-

fermentáveis. Segundo Shiratori *et al.* (1999) a proteína hipotética codificada pela ORF YDR332W é uma possível helicase mitocondrial não necessária para a sobrevivência celular.

Realizando o WU BLAST poderiam ter sido encontradas proteínas semelhantes que realizassem a mesma função, assim, na falta de uma, a outra conseguiria suprir essa ausência, porém nenhum resultado encontrado – com exceção da ORF YDL119C - nos chamou a atenção neste sentido.

O teste da expressão fenotípica das linhagens mutantes em outro “background” genético confirmou o esperado. O teste foi realizado com a linhagem  $\Delta$ YDL119C cruzada com W303-1B, resultando na linhagem denominada  $\Delta$ YDL119C\*. A mistura das marcas auxotróficas das duas linhagens parentais na linhagem filha confirmou a também mistura do “background” genético de ambas. O interessante é que este embaralhamento ocorre aleatoriamente, podendo resultar em linhagens com fenótipo mais ou menos proeminente. Neste trabalho de mestrado também foram obtidas linhagens cuja deficiência respiratória era muito semelhante à da linhagem  $\Delta$ YDL119C, mas optamos por não mostrá-los, já que o objetivo era obter um novo mutante cuja deficiência respiratória fosse mais marcante.

#### 5.2.2- Transformação homóloga

Mesmo com essas dificuldades em relação ao fenótipo das linhagens mutantes, foi possível reconhecer transformações homólogas positivas.

A restauração da capacidade respiratória dos mutantes  $\Delta$ YDL119C,  $\Delta$ YDR115W (ver abaixo) e  $\Delta$ YOR022C transformados com os vetores YCplac33 e YCplac111 (GIETZ; SUGINO, 1988) contendo o segmento das respectivas ORFs selvagens comprovou a autenticidade dos mutantes adquiridos da EUROSCARF, assim como a amplificação realizada com os iniciadores KAN-5 e KAN-3 combinados com os iniciadores específicos para cada ORF.

### 5.2.3- Mutante YDR115W

A linhagem mutante para a ORF YDR115W demonstrou peculiaridades em diversos experimentos realizados neste trabalho de mestrado.

O não crescimento do mutante  $\Delta$ YDR115W nos meios contendo fonte de carbono não-fermentável poderia ser decorrente da interrupção da ORF em questão, o que comprovaria os achados de Steinmetz *et al.* (2002). Esta hipótese foi logo descartada após a demonstração da instabilidade do DNA mitocondrial desta linhagem.

A ausência da proteína codificada pela ORF YDR115W deve ocasionar um prejuízo à célula diretamente relacionado à sua função. Como abordado anteriormente, há indícios de que esta ORF codifique para uma proteína da subunidade maior do ribossomo mitocondrial, ou seja, participe da síntese protéica mitocondrial. Segundo Myers; Pape; Tzagoloff (1985), a manutenção do DNA mitocondrial selvagem (livre de mutações) depende da presença de um sistema funcional de síntese de proteínas mitocondriais.

Para verificar a instabilidade do DNA mitocondrial do mutante diplóide heterozigoto  $\Delta$ YDR115W (EUROSCARF), este foi submetido a condições de crescimento limitantes para que as células fossem induzidas à esporulação. Após a dissecação das tétrades formadas, verificou-se que apenas dois ascósporos de cada asco cresciam o suficiente para formarem colônias visíveis a olho nú, sendo que os demais replicavam de 2 a 4 vezes e morriam. Ao testar os esporos viáveis quanto à resistência a geneticina e quanto ao crescimento em YPEG, identificou-se que os que eram resistentes à geneticina eram deficientes respiratórios, mas devido à instabilidade do genoma mitocondrial.

A instabilidade do DNA mitocondrial da linhagem haplóide  $\Delta$ YDR115W (EUROSCARF) foi testada em outro “background” genético. O primeiro passo foi gerar uma linhagem diplóide pelo cruzamento de  $\Delta$ YDR115W com W303-1B. Depois de realizar os

devidos procedimentos, procedeu-se com a dissecação das tétrades geradas. Diferentemente do experimento anterior, observou-se o crescimento de 4 ascósporos viáveis em todas as tétrades.

Este fato sugere que com mutante diplóide da EUROSCARF há um gene essencial em heterozigose também se segregando durante a esporulação, que quando presente inviabiliza o crescimento do ascósporo em questão.

A mudança do “background” genético possibilitou a descoberta desta peculiaridade do mutante diplóide fornecido pela EUROSCARF e também confirmou que a presença da ORF interrompida pelo cassete de *KanMX4*, independente do “background” da célula, gera instabilidade no DNA mitocondrial, já que os ascósporos gerados do cruzamento das linhagens  $\Delta$ YDR115W com W303-1B apresentaram o mesmo fenótipo daqueles gerados pela dissecação da linhagem diplóide  $\Delta$ YDR115W da EUROSCARF.

Foi feita a transformação homóloga da linhagem diplóide heterozigota  $\Delta$ YDR115W da EUROSCARF com a construção YDR115W/YCplac33. Para analisar os resultados foi realizada a dissecação das tétrades geradas após a esporulação. Novamente observou-se o crescimento de apenas 2 ascósporos de cada asco, porém a transformação pode ser comprovada pela resistência dos ascósporos à geneticina e pela restauração da capacidade respiratória dos mesmos.

#### **5.2.4- Consumo de oxigênio**

Os resultados mostrados neste trabalho de mestrado em relação aos experimentos de consumo de oxigênio foram realizados após padronização dos métodos utilizados. Para chegar a esta padronização, foi preciso realizar diversos experimentos prévios, onde foram avaliadas as concentrações dos inibidores utilizados, o tempo de corrida do oxígrafo, a medição da quantidade de células tanto por D.O. quanto por contagem em câmara de Neubauer, entre outras variáveis.

Estes experimentos prévios foram importantes, pois eles sustentam os resultados mostrados, já que estes são baseados em no máximo duas repetições da corrida.

Observando o Gráfico 5, relacionado ao experimento realizado em YPD a 30°C ficou claro que mesmo na presença de dextrose, as células estão respirando, pois tanto o controle como os mutantes respondem à presença do desacoplador FCCP e do inibidor antimicina A.

Comparando com o Gráfico 6 cujo experimento foi realizado em YPEG à 37°C, percebe-se que houve uma resposta maior ao inibidor e ao desacoplador tanto das linhagens mutantes quanto do controle BY4741, quando comparado com a resposta em YPD. Este fato pode ser indício não necessariamente de uma resposta mais intensa, mas sim de uma maior atividade mitocondrial, visto que a geração de energia deve estar concentrada na fosforilação oxidativa, decorrente da fonte de carbono fornecida (etanol e glicerol).

Estes dados vêm confirmar que os mutantes originalmente descritos como deficientes respiratórios no trabalho de Steinmetz *et al.* (2002)., com exceção de  $\Delta YDR115W$ , na verdade são capazes de respirar.

De Risi; Iyer; Brown (1997) estudaram a alteração na expressão de genes durante a transição diáuxica e verificaram que genes relacionados ao ciclo dos ácidos tricarboxílicos e à cadeia transportadora de elétrons, por exemplo, têm sua expressão aumentada quando a disponibilidade de glicose vai diminuindo.

Dois pontos podem ser levantados em relação aos resultados observados neste trabalho de mestrado:

- a resposta gerada tanto pelos mutantes quanto pelo controle em relação ao FCCP e à antimicina A quando crescidos em YPD pode sugerir que a fosforilação oxidativa está ocorrendo mesmo na presença de açúcar, para que seja mantida a diferença de potencial da membrana interna, necessária para diversos processos metabólicos na célula, como por exemplo a inserção de proteínas na membrana interna pelo complexo TIM22.

- antes da realização dos experimentos as células estavam suspensas em pequena quantidade de YPD, o que pode ter gerado o esgotamento do açúcar disponível no meio, assim as células adaptaram seu metabolismo para o consumo do etanol produzido. Ao serem adicionadas ao meio de cultura fresco com abundância de açúcar, não foi possível observar a readaptação do metabolismo fermentativo, devido ao tempo do experimento (cerca de 14 minutos).

Em nenhum dos ensaios realizados houve resposta à adição de oligomicina. Na realidade o que se observou foi um aumento do consumo de oxigênio (mais proeminente em YPD) em todas as linhagens testadas, que pode ser explicado pelo fato de que foi utilizado etanol para a diluição dos inibidores e do desacoplador, assim as células estariam respondendo ao etanol e não à oligomicina.

A hipótese de a oligomicina estar degradada foi descartada, pois este inibidor foi utilizado por outra pesquisadora do laboratório, a qual obteve os resultados esperados.

Segundo Tzagoloff (1982), a oligomicina, entre outras drogas e antibióticos, inibe o crescimento de *S. cerevisiae* em meios de cultura não fermentáveis, o que indica que esta é permeável à célula da levedura, além de ser um composto lipossolúvel. Essa afirmação também exclui o fato da ATPsintase de levedura ser pouco sensível a este inibidor.

No trabalho de Pozniakovsky *et al.* (2006) foi utilizada uma concentração final de 10 µg/mL de oligomicina, a mesma utilizada nos experimentos deste trabalho de mestrado. Estes pesquisadores utilizaram oligomicina em células crescendo em YPD e não perceberam resposta, o que está correto já que em presença de açúcar a levedura prefere fermentar à oxidar (SCHÜLLER, 2003).

Desta forma o fato das linhagens mutantes e controle não estarem respondendo à adição de oligomicina tanto em YPD como em YPEG não pode ser explicada.

O consumo de oxigênio da linhagem mutante haplóide  $\Delta$ YDR115W só foi analisado em YPEG. O comportamento apresentado por esta linhagem é característica de um mutante

deficiente respiratório, já que apresentou baixo consumo de oxigênio, conseqüentemente a resposta é praticamente nula em relação ao FCCP e à antimicina A.

A realização de outros experimentos se faz necessária para a total compreensão dos dados obtidos neste trabalho.

A repetição destes experimentos com mitocôndrias isoladas afastaria totalmente o questionamento da permeabilidade da parede celular da levedura à oligomicina. Experimentos que medem o potencial de membrana também se fazem necessários, para confirmar que a parada da ATP sintase está sendo acompanhada por um aumento deste. A possibilidade das linhagens mutantes apresentarem defeitos sutis na respiração deve ser mais bem estudada e necessita de experimentos adicionais, que deverão ser realizados futuramente.

## 6- CONCLUSÕES

Este estudo procurou unir informações provenientes de diversos trabalhos globais, com análises *in silico* e fenotípicas de 6 ORFs. A partir dessas análises pode-se chegar a proposição das possíveis funções biológicas das proteínas codificadas por algumas das ORFs estudadas:

- YDL119C: provável carreador mitocondrial de especificidade indefinida;
- YDR115W: provável componente da subunidade maior do ribossomo mitocondrial, participando da síntese protéica nesta organela; o mutante nulo correspondente tem DNA mitocondrial instável, gerando petites rapidamente o que reforça a função proposta ligada à síntese protéica da organela;
- YDR332W: provável helicase mitocondrial atuante no processamento do RNA mensageiro organelar.

A suposta deficiência respiratória destas linhagens indicada pelo estudo global de Steinmetz *et al.* (2002) não se evidenciou nos testes usuais em meio sólido e só foi revelada nas curvas de crescimento a 37°C, as quais exibem velocidades de crescimento típicas para cada mutante nulo e inferiores à da linhagem controle BY4741.

Embora os estudos globais forneçam um quadro geral, o estudo individual de cada ORF ainda se faz necessário. Estudos globais, muitas vezes, abdicam do controle de diversas variáveis biológicas que podem ser particularmente importantes em determinados mutantes. Além disso, os estudos globais podem estar sujeitos a erros primários de identificação de linhagens, difíceis de detecção dada a escala de análise. Dessa maneira a caracterização isolada de ORFs fornece informações mais seguras e até hoje indispensáveis para a correta definição funcional de cada uma.

Os mutantes nulos para as ORFs YDR115W e YER077C apresentaram fenótipo prontamente relacionados à função respiratória, o que abre a oportunidade de aprofundamento da caracterização fenotípica e genética dos mesmos.

## **7- GENOMA MITOCONDRIAL DE *Epidermophyton floccosum***

Como foi dito na introdução, no decorrer deste mestrado o Doutor José Humberto Machado Tambor propôs colaboração em um projeto cujo objetivo era seqüenciar e analisar o genoma mitocondrial do fungo *Epidermophyton floccosum*, a qual foi prontamente aceita.

Dermatófitos são fungos associados a infecções na pele, no cabelo e nas unhas e compreendem três gêneros, sendo eles *Epidermophyton*, *Trichophyton* e *Microsporum*.

Há duas espécies de *Epidermophyton*: *E. stockdaleae*, habitante do solo e não patogênica e *E. floccosum*, causadora de infecções em humanos. Sua distribuição é mundial e

causa infecções na pele (*tinea pedis*, *tinea cruris* e *tinea corporis*) e nas unhas (onicomicose). A infecção é restrita aos tecidos queratinizados e a transmissão se dá por contato.

É diferenciado morfologicamente de *Trichophyton* e *Microsporum* pela ausência de microconídeos. O estudo do DNA mitocondrial pode auxiliar na distinção destes dermatófitos, assim como contribuir para o estudo populacional e para a verificação da diversidade destes organismos de importância médica, já que este traz regiões conservadas e outras variadas que podem ser utilizadas como marcadores moleculares.

Este trabalho foi o pioneiro no seqüenciamento do DNA mitocondrial de dermatófitos, assim como *E. floccosum* foi o primeiro organismo da ordem Onygenales a ter seu DNA mitocondrial seqüenciado.

O genoma mitocondrial de *Epidermophyton floccosum* possui uma molécula circular com 30.910 pb (Figura 1 do manuscrito). Todos os genes codificam no mesmo sentido e fita. Estão presentes os genes típicos da fosforilação oxidativa, as duas subunidades do RNA ribossomal, 25 tRNAs. Este genoma apresenta um alto grau de compactação pois além de seu tamanho relativamente pequeno ainda possui 5 íntrons, sendo um deles uma proteína ribossomal, e 5 genes putativos. Seu conteúdo de AT é de 76,6% e 52% dos códons utilizados não apresentaram GC.

A comparação entre os genomas mitocondriais de *E. floccosum*, *P. marneffeii*, *A. nidulans* e *T. rubrum* (Figura 2 do manuscrito) mostra claramente uma melhor sintenia com o último. Acredita-se que o trecho ausente no genoma de *T. rubrum* corresponda aos tRNAs e a subunidades maior do RNA ribossomal, ainda não seqüenciados. As poucas diferenças em relação à posição entre estes dois genomas estão na presença de íntrons e tRNAs, o que resultou na anotação de um tRNA para cisteína no genoma de *T. rubrum* entre as subunidades NAD1 e NAD3.

A alta identidade encontrada entre as sequências traduzidas de *E. floccosum* e *T. rubrum* era esperada nas análises filogenética, onde a posição destes fungos mostra claramente sua homologia (Figura 3 do manuscrito).

**BIBLIOGRAFIA**

ADAMS, A.; GOTTSCHLING, D.E.; KAISER, C.A.; STEARNS, T. **Methods in Yeast Genetics. A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual.** New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.

ARCO, A.D.; SATRÚSTEGUIA, J. New mitochondrial carriers: an overview. **Cellular and Molecular Life Sciences.** v. 62, n. 19-20, p. 2204-2227, 2005

ASKREE, S.H.; YEHUDA, T.; SMOLIKOV, S.; GUREVICH, R.; HAWK, J.; COKER, C.; KRAUSKOPF, A.; KUPIEC, M.; MCEACHERN, M.J. A genome-wide screen for *Saccharomyces cerevisiae* deletion mutants that affect telomere length. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** v. 101, n. 23, p. 8658-8663, 2004.

BELENKIY, R.; HAEFELE, A.; EISEN, M.B; WOHLRAB. H. The yeast mitochondrial transport proteins: new sequences and consensus residues, lack of direct relation between consensus residues and transmembrane helices, expression patterns of the transport protein genes, and protein-protein interactions with other proteins. **Biochimica et Biophysica Acta.** v.1467, n.1, p.207-218, 2000.

BERGER, K.H.; YAFFE, M.P. Mitochondrial distribution and inheritance. **Experientia.** v. 52, n. 12, p. 1111-1116. 1996.

BONJARDIM, C.A.; NÓBREGA, F.G. Revision of the nucleotide sequence at the last intron of the mitochondrial apocytochrome b gene in *Saccharomyces cerevisiae*. **Brazilian journal of medical and biological research.** v.17, n.1, p.17-20, 1984.

BONJARDIM, C.A.; PEREIRA, L.S.; NÓBREGA, F.G. Analysis of exon and intron mutants in the cytochrome b mitochondrial gene of *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Genetics.** v. 30, n.3, p.200-205, 1996.

BOXMA, B. DE GRAAF; R.M., VAN DER STAAY, G.W.; VAN ALEN, T.A.; RICARD, G.; GABALDON, T.; VAN HOEK A.H.; MOON-VAN DER STAAY; S.Y., KOOPMAN W.J.; VAN HELLEMOND, J.J.; TIELENS, A.G.; FRIEDRICH, T.; VEENHUIS, M.; HUYNEN, M.A.; HACKSTEIN, J.H. An anaerobic mitochondrion that produces hydrogen. **Nature**. v.434, n.7029, p.74-79, 2005.

BULLERWELL, C.E.; LANG, B.F. Fungal evolution: the case of the vanishing mitochondrion. **Current opinion in microbiology**. v. 8, n. 4, p. 362-369, 2005.

CHACINSKA, A.; REHLING, P. Moving proteins from the cytosol into mitochondria. **Biochemical Society Transactions**. v. 32, parte 5, 2004.

CLAROS, M.G.; VINCENS, P. Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. **European journal of biochemistry**. v.241, p.779-786 1996. MITOPROT (Prediction of mitochondrial targeting sequences): banco de dados. Disponível em <http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>. Acesso em mar. 2006.

CORUZZI, G.; TRMBATH, K.M.; TZAGOLOFF, A. Isolation of mitochondrial and nuclear mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with specific defects in mitochondrial function. **Methods in enzymology**. v.56, p.95-106, 1979.

De RISI, J.L.; IYER, V.R.; BROWN, P.O. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. **Science**. v. 278, p.680–686, 1997.

DIMMER, K.S.; FRITZ, S.; FUCHS, F.; MESSERSCHMITT, M.; WEINBACH, N.; NEUPERT, W.; WESTERMANN, B. Genetic Basis of Mitochondrial Function and Morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Biology of the cell**. v.13, p.847–853, 2002.

EL MOUALIJ, B.; DUYCKAERTS, C.; LAMOTTE-BRASSEUR, J.; SLUSE, F.E. Phylogenetic classification of the mitochondrial carrier family of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**. v. 13, n.6, p.573-81, 1997.

EMANUELSSON, O.; NIELSEN, H.; BRUNAK, S.; HEIJNE, G. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. **Journal of Molecular Biology**. v.300, p.1005-1016, 2000. TARGETP): banco de dados. Disponível em <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>. Acesso em mar. 2006.

EPHRUSSI, B.; SLONIMSKI, P.P. Subcellular units involved in the synthesis of respiratory enzymes in yeast. **Nature**. v.176, p.1207-1208, 1955.

EUROSCARF (European *Saccharomyces cerevisiae* archive for functional analysis): banco de dados. Disponível em <http://www.rz.uni-frankfurt.de/FB/fb16/mikro/euroscarf/>. Acesso em: 24 set.2003; Jul 2004; Out. 2004; Fev 2005.

GAN, X.; KITAKAWA, M.; YOSHINO, K.; OSHIRO, N.; YONEZAWA, K.; ISONO, K. Tag-mediated isolation of yeast mitochondrial ribosome and mass spectrometric identification of its new components. **European journal of biochemistry**. v.269, p.5203–5214, 2002.

GIAEVER, G., *et al.* Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. **Nature**. v:418, n.6896, p.387-391, 2002.

GIETZ, R.D.; SUGINO, A. New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. **Gene**. v.74, p.527-534, 1998.

GOFFEY, A.; BARRELL, B.G.; BUSSEY, H.; DAVIS, R.W.; DUJON, B.; FELDMANN, H.; GALIBERT F.; HOHEISEL, J.D.; JACQ, C.; JOHNSTON, M.; LOUIS, E.J.; MEWES, H.W.; MURAKAMI, Y.; PHILIPSEN, P.; TETTELIN, H.; OLIVER, S.G. Life with 6000 genes. **Science**. v.274, n.5287, p.563-567.

GUDA, C.; GUDA, P.; FAHY, E.; SUBRAMANIAM, S. MITOPRED: A web server for the prediction of mitochondrial proteins. **Nucleic Acids Research**. v.32, p.372-374, 2004. MITOPRED (A genome-scale method for predicting mitochondrial proteins): banco de dados. Disponível em <http://mitopred.sdsc.edu/>. Acesso em mar. 2006.

GUDA C.; FAHY E.; SUBRAMANIAM S. MITOPRED: A genome-scale method for prediction of nuclear-encoded mitochondrial proteins. **Bioinformatics**, v.20, p.1785-1794,

2004. MITOPRED (A genome-scale method for predicting mitochondrial proteins): banco de dados. Disponível em <http://mitopred.sdsc.edu/>. Acesso em mar. 2006.

FISHER, N.; CASTLEDEN, C.K.; BOURGES, I.; BRASSEUR, G.; DUJARDIN, G. MEUNIER, B. Human disease-related mutations in cytochrome b studied in yeast. **Journal of Biological Chemistry**. v.279, n.13, p.12951-12958, 2004.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Research Symp. Ser.** v.41, p.95-98, 1999.

HIGGS, H. N.; HAN, M. H.; JOHNSON, G. E.; GLOMSET, J. A. Cloning of a phosphatidic acid-preferring phospholipase A1 from bovine testis. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 273, n.10, p. 5468–5477, 1998.

HUGHES, T. R., *et al.* Functional discovery via a compendium of expression profiles. **Cell**. v. 102, p. 109-126, 2000.

HUH, W.K.; FALVO, J. V.; GERKE, L. C.; CARROL, A. S.; HOWSON R. W.; WEISSMAN, J. S.; O'SHEA, E. K. Global analysis of protein localization in budding yeast. **Nature**. v. 425, n. 6959, p. 686-691, 2003.

JOHNSTON, M. Feasting, fasting and fermenting glucose sensing in yeast and other cells. **Trends im Genetics**. v.15, n.1, p.29-33, 1999.

KERSCHER, S.J. Diversity and origin of alternative NADH:ubiquinone oxidoreductases. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1459, p.274-283, 2000.

KOEHLER, C.M. New developments in mitochondrial assembly. **Annual review of cell and developmental biology**. v. 20, p.309-335, 2004

LANDRIEU, I.; VANDENBOL, M.; HÄRTLEIN, M; PORTETELLE, D. Mitochondrial asparaginyl-tRNA synthetase is encoded by the yeast nuclear gene YCR024C. **European journal of biochemistry**. v.243, p.268-273, 1997.

LANGKJØR, R.B.; CASAREGOLA, S.; USSERY, D.W.; GAILLARDIN, C.; PISĚKUR, J. Sequence analysis of three mitochondrial DNA molecules reveals interesting differences among *Saccharomyces* yeasts. **Nucleic Acids Research**. v.31, n.12, p.3081-3091, 2003.

LEMAIRE, C.; GUIBET-GRANDMOUGIN, F.; ANGLES, D.; DUJARDIN, G.; BONNEFOY, N. A yeast mitochondrial membrane methyltransferase-like mrotein man ompensate for *oxa1* mutations. **The Journal of Biological Chemistry**. v.279, n.46, p.47464-47472, 2004.

LISOWSKY, T.; STEIN, T.; MICHAELIS, G.; GUAN, M.; CHEN, X.J; CLARK-WALKER, G.D. A new point mutation in the nuclear gene of yeast mitochondrial RNA polymerase, RPO41, identifies a functionally important amino-acid residue in a protein region conserved among mitochondrial core enzymes. **Current Genetics**. v. 30, n. 5, p. 389-395.

LOGAN, D.C. Mitochondrial dynamics. **New Phytologist**. v.160, p.463-478, 2003.

LUBAN, C.; BEUTEL, M.; STAHL, U.; SCHMIDT, U. Systematic screening of nuclear encoded proteins involved in the splicing metabolism of group II introns in yeast mitochondria. **Gene**. v.354, p.72-79, 2005.

LUK, E.; CARROLL, M.; BAKER, M.; CULOTTA, V.C. Manganese activation of superoxide dismutase 2 in *Saccharomyces cerevisiae* requires *MTM1*, a member of the mitochondrial carrier family. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.100, n.18, p.10353-10357, 2003.

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

MACINO, G.; CORUZZI, G.; NOBREGA, F. G.; LI, M.; TZAGOLOFF, A. Use of the UGA terminator as a tryptophan codon in yeast mitochondria.. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.76, n.6, p.03784-03785, 1979.

MASUMOTO, H.; HAWKE, D.; KOBAYASHE, R.; VERREAULT, A. A role cell-cycle-regulated histone H3 lysine 46 acetylation in the DNA damage response. **Nature**. v.436, p.294-298, 2005

MYERS, A.M.; PAPE, L.K.; TZAGOLOFF, A. Mitochondrial protein synthesis is required for maintenance of intact mitochondrial genomes in *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO Journal**. v.4, n.8, p.2087-2092, 1985.

NAKAI, K.; HORTON, P. PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. **Trends in a biochemical sciences**. v. 24, n.1, p. 34-36, 1999. PSORT (Prediction of proteins sorting signal and localization sites in amino acid sequences): banco de dados. Disponível em <http://psort.nibb.ac.jp/form2.html>. Acesso em mar. 2006.

NCBI (National Center for Biotechnology Information): banco de dados. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso abr. 2006.

NEWMAYER, D. D.; FERGUSON-MILLER, S. Mitochondria: Releasing power for life and unleashing the machineries of death. **Cell**. v.112, p.481-490, 2003.

NÓBREGA, M.P.; NÓBREGA, F.G.; TZAGOLOFF, A. COX10 codes for a protein homologous to the ORF1 product of *Paracoccus denitrificans* and is required for the synthesis of yeast cytochrome oxidase. **Journal of Biological Chemistry**. v.265, n.24, p.14220-14226, 1990.

NÓBREGA, F.G.; NÓBREGA, M.P.; TZAGOLOFF, A. BCS1, a novel gene required for the expression of functional Rieske iron-sulfur protein in *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO Journal**. v.11, n.11, p.3821-3829, 1992.

ÖSTLING, J.; CARLBERG, M.; RONNE, H. Functional domains in the Mig1 repressor. **Molecular and Cell Biology**. v.16, p.753–761, 1996.

PFAM (Protein families database of alignments and HMMs): banco de dados. Disponível em <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/> Acesso em mar. 2006.

POZNIAKOVSKY, A.I.; KNORRE, D.A.; MARKOVA, O.V.; HYMAN, A.A.; SKULACHEV, V.P.; SEVERIN F.F. Role of mitochondria in the pheromone- and amiodarone-induced programmed death of yeast. **The Journal of Cell Biology**. v.168, n.2, p.257-269, 2005.

PROKISCH, H.; SCHARFE, C.; CAMP, D.G.I; XIAO, W.; DAVID, L.; ANDREOLI, C.; MONROE, M.E.; MOORE, R.J.; GRITSENKO, M.A.; KOZANY, C.; HIXSON, K.K.; MOTTAZ, H.M.; ZISCHKA, H.; UEFFING, M.; HERMAN, Z.S.; DAVIS, R.W.; MEITINGER, T.; OEFNER, P.J.; SMITH, R.D.; STEINMETZ, L.M. Integrative Analysis of the Mitochondrial Proteome in Yeast. **PLOS Biology**. v.2, n. 6, p.0795-0804, 2004.

RANDEZ-GIL, F.; BONJUNGA, N.; ENTIAN, K.D. Glucose derepression of gluconeogenic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* correlates with phosphorylation of the gene activator Cat8p. **Molecular and Cellular Biology**. v. 17, n. 5, p. 2502-2510, 1997.

ROCKMILL, B.; LAMBIE, E.J.; ROEDER, G.S. Spore enrichment. **Methods Enzymol**. v.194, p.146-149, 1991.

ROUT, M.P.; AITCHISON, J.D.; SUPRAPTO, A.; HJERTAAS, K.; ZHAO, Y.; CHAIT, B.T. The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. **The Journal of Cell Biology**. v.148, n.4, p.635-651, 2000.

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

SARASTE, M. Oxidative Phosphorylation at the fin de siècle. **Science**. v.283, p.1488-1493, 1999.

SÉRAPHIN, B.; BOULET, A.; SIMON, M.; FAYE, G. Construction of a yeast strain devoid of mitochondrial introns and its use to screen nuclear genes involved in mitochondrial splicing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 84, p. 6810-6814, 1987.

SGD (Saccharomyces Genome Database): banco de dados. Disponível em: <http://www.yeastgenome.org/>. Acesso em maio, set. 2003 ;abr. 2006.

SCHÜLLER, H.J. Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Genetics**. v.43, p.139-160, 2003

SHERMAN, 1998. An Introduction to the Genetics and Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Disponível em [http://dbb.urmc.rochester.edu/labs/sherman\\_f/yeast/index.html](http://dbb.urmc.rochester.edu/labs/sherman_f/yeast/index.html) Modified from: F. Sherman, Yeast genetics. The Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine. v.6,1997, p.302-325.

SHIRATORI, A.; SHIBATA, T.; ARISAWA, M.; HANAOKA, F.; MURAKAMI, Y.; EKI, T. Systematic identification, classification, and characterization of the open reading frames which encode novel helicase-related proteins in *Saccharomyces cerevisiae* by gene disruption and Northern analysis. **Yeast**. v.15, n.3, p.219-253, 1999.

SOUZA, R.L.; GREEN-WILLMS, N.S.; FOX, T.D.; TZAGOLOFF, A.; NOBREGA, F.G. Cloning and characterization of *cox18*, a *Saccharomyces cerevisiae* *PET* gene required for the assembly of cytochrome oxidase. **The Journal of Biological Chemistry**. v.275, n.20, p.14898–14902, 2000.

STEINMETZ, L.M.; SCHARFE, C.; DEUTSCHBAUER, A.M.; MOKRANJAC, D.; HERMAN, Z.S.; JONES, T.; CHU, A.M.; GIAEVER, G.; PROKISCH, H.; OEFNER, P.J.; DAVIS, R.W. Systematic screen for human disease genes in yeast. **Nature Genetics**. v.31, n.4, p.400-404, 2002.

TAMBOR, J.H.M; GUEDES, R.F.; NÓBREGA, M.P.N; NÓBREGA, F.G. The complete DNA sequence of the mitochondrial genome of the dermatophyte fungus *Epidermophyton floccosum*. **Current Genetics**. v.49, p.302-308, 2006.

TRUSCOTT, K.N.; BRANDER, K.; PFANNER, N. Mechanisms of protein import into mitochondria. **Current Biology**. v.13, p.326-337, 2003.

TZAGOLOFF, A. Genetic and Translational Capabilities of the Mitochondrion. **Bioscience Journal**. v. 27, p.18-23, 1977.

TZAGOLOFF, A.; AKAI, A.; NEEDLEMAN, R.B. Assembly of the mitochondrial membrane system: isolation of nuclear and cytoplasmic mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with specific defects in mitochondrial functions. **Journal of Bacteriology**. v. 122, n. 3, p.826-831, 1975b.

TZAGOLOFF, A. **Mitochondria**. 1Ed. New York: Plenum Press. 1982. 342p.

WINZELER *et al.* Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. **Science**. v.285, p. 901-905. 1999.

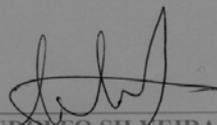
YDPM (Yeast Deletion Project and Proteomics of Mitochondria Database): banco de dados. Disponível em [http://www-deletion.stanford.edu/YDPM/YDPM\\_index.ht](http://www-deletion.stanford.edu/YDPM/YDPM_index.ht). Acesso Maio 2005.

## COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVAP

### CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo n.º L088/2004/CEP, intitulado “*Caracterização genética e funcional de 9 genes nucleares de provável função mitocondrial em Saccharomyces cerevisiae*”, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Francisco G. Nóbrega, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA/Junho de 1991) e segue as Normas Para a Prática Didático-Científica da Vivissecção de Animais (Lei 6638 de 08/05/1979) sendo, portanto, **aprovado** por esta Comissão de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 13 de agosto de 2004.



PROF. DR. LANDUETO SILVEIRA JUNIOR  
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVAP