JANAINA AREIAS PAULELA

CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS DE Saccharomyces cerevisiae DEFICIENTES NA BIOSSÍNTESE DA COENZIMA Q

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências, pelo Programa Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo.

São Paulo 2017

JANAINA AREIAS PAULELA

CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS DE Saccharomyces cerevisiae DEFICIENTES NA BIOSSÍNTESE DA COENZIMA Q

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências, pelo Programa Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo.

Área de concentração: Biotecnologia Orientador: Dr. Mário Henrique de Barros Versão Original

São Paulo 2017

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Paulela, Janaina Areias Caracterização de linhagens de Saccharomyces cerevisiae deficientes na biossíntese da Coenzima Q. / Janaina Areias Paulela; orientador Mário Henrique de Barros. -- São Paulo, 2017. 123 p.
Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.
1. Saccharomyces cerevisiae. 2. Biogênese mitocondrial. 3. Ubiquinona. 4. Mutagênese sítiodirigida. I. Barros, Mário Henrique de, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia

Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas.

Candidato(a): Janaina Areias Paulela

Título da Tese: Caracterização de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* deficientes na biossíntese da Coenzima Q

Orientador (a): Prof. Dr. Mário Henrique de Barros

() Aprovado(a) () Reprovado(a)

Examinador(a):	Assinatura: Nome Instituição:
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Presidente:	Assinatura: Nome: Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil Telefone :(55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-8405 e-mail: cep@ icb.usp.br

São Paulo, 28 de novembro de 2012.

PARECER 1091/CEP

A Comissão de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do ICB, na sessão realizada no dia 22.11.2012, APROVOU o projeto intitulado: "Estudo das interações "Caracterização de cultura de fibroblastos humanos e de linhagens de Saccharomyces cerevisiae deficientes na biossíntese da coenzima genética e fisiopatológica nas doenças mitocondriais" dos autores MÁRIO HENRIQUE DE BARROS e JANAINA AREIAS PAULELA.

Cabe aos Pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX. 2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP

em 22.11.2013.

Atenciosamente,

Prof. ΖΑΝΟΠΟ Dr PAOLO

Coordenador da Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas / USP Aprovada pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, em 10 de fevereiro de 1998.

Agradecimentos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Processo 2012/11524-8).

Agradeço,

Ao professor Dr. Mário Henrique de Barros, por ter me aceitado em seu laboratório em 2009, quando ainda era aluna de graduação, pela paciência e pelos ensinamentos ao longo de quase uma década, por me auxiliar durante a trajetória e mostrar experimentos tão bonitos e o mundo incrível das leveduras, e muito embora não tenha me convencido a torcer pelo Palmeiras, meu sincero agradecimento!

Ao professor Dr. José Ribamar Ferreira Junior, da Escola de Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo, por me receber como "aluna" no laboratório de Envelhecimento Celular para desenvolver as técnicas de OverLap Extension PCR, Gap Repair e CRISPR/Cas9. Agradeço especialmente pelos desenhos explicativos e pelas longas horas de conversa e amizade: "Faça elevar o cosmo no seu coração, todo o mal combater e despertar o poder... !" Obrigada!

Ao professor Dr. Lucas Bleicher, do Laboratório de Bioinformática, da Universidade Federal de Minas Gerais, que contribuiu imensamente com o desenvolvimento deste projeto, e dedicou seu tempo a me ensinar o método DRCN e a utilizar o programa PFSTATS, por ele desenvolvido. Aqui, estendo meu agradecimento ao aluno Néli Fonseca, que pacientemente me auxiliou e tirou dúvidas a distância, além de recomendar boas músicas. Obrigada por me receberem na UFMG.

Aos colegas do laboratório de Biogênese Mitocondrial, aqui em ordem alfabética, pela adorável convivência, pela amizade e apoio psicológico, pelos sonhos e recomeços, e especialmente por contribuírem para meu crescimento profissional: Ana Santos, Cleverson Busso, Erich Birelli, Fernando Gomes, Janaina Leme, Mariana Zampol, Raquel Monteiro, Viviane Cristina. Além dos técnicos de laboratório com quem convivi por período mais longo: Adolfo Tadeu e Carolina Bertelli, estremamente importantes em todas as fases do projeto, pelo suporte e especialmente pela amizade. Aos colegas do laboratório de Envelhecimento Celular: Danielle, Fabio, Rafaela, Vittoria, que me receberam na EACH e dividiram não apenas a bancada, mas os animes, as músicas e boas risadas no bandejão.

Aos meus pais, Neusa e Wilson, e a minha irmã Tatiane, pelo amor e apoio incondicional, por serem minha fortaleza, meu motivo de orgulho, meus exemplos e os motivos que me fazem sonhar e tentar realizar: "Eu carrego o seu coração, carrego seu coração no meu coração."

Ao meu namorado Lucas, por pacientemente me acompanhar ao laboratório, pelo apoio em meio às crises e a escrita da tese: "Place your head on my beating heart I'm thinking out loud and maybe we found love right where we are..." Ao grande amigo Mateus Luchese pela parceria nesses longos anos de pós-graduação, pelo amor de outras e próximas vidas, e pelas "passagens intergalácticas".

A minha tia Maria Elisabete (in memorian) por me ensinar sobre ser guerreira, enfrentar a vida com alegria, e mostrar que as vezes é preciso "deixar a vida me levar, pra onde ela quiser… seguindo a direção de uma estrela qualquer… ".

Ao meu amigo Luis Felipe (in memorian) pela amizade ("Idem...") e incentivo, mesmo tendo que percorrer a metade do caminho e todo o restante sozinha, finalmente terminei, mesmo com a saudade imensa que você deixou, além das reviravoltas e a vontade de trilhar novos caminhos: "These days are fast, nothing lasts in this graceless age... Even innocence has caught the morning train... and there ain't nobody but left... but us ... these days..."

Aos amigos do Grupo Folk La Bella Italia, pela amizade, além do meu pedido de desculpa por todos os ensaios e apresentações que estive ausente durante o período dedicado ao laboratório.

Aos médiuns do Templo de Umbanda Cacique Xingu, irmãos de fé, que dedicaram tempo e cuidados para me auxiliar e me recompor durante a longa e difícil caminhada, afinal: "Um abraço dado de bom coração é o mesmo que uma benção…"

A todos, que a sua maneira, torceram e contribuíram para a conclusão dessa etapa: "We gotta do what it takes because it's all in our hands... We all make mistakes, but it's never too late to start again, take another breath, say another prayer... And FLY AWAY FROM HERE..."

E à Deus, pelo dom da vida e pelo amor sem igual.

A meus pais (mãe Nê e Benzano) e minha irmã (Tati), com todo o meu amor e a gratidão, porque "*enquanto houver vocês do outro lado, aqui no outro eu consigo me orientar*".

O poeta é um fingidor. Finge tão completamente Que chega a fingir que é dor A dor que deveras sente.

E os que lêem o que escreve, Na dor lida sentem bem, Não as duas que ele teve, Mas só a que eles não têm.

E assim nas calhas de roda Gira, a entreter a razão, Esse comboio de corda Que se chama coração.

Fernando Pessoa (1888 - 1935)

RESUMO

PAULELA, J. A. Caracterização de linhagens de Saccharomyces cerevisiae deficientes na biossíntese da Coenzima Q. 2017. 122 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Coenzima Q (CoQ) é uma molécula de função essencial na transferência de elétrons da cadeia respiratória mitocondrial. Em Saccharomyces cerevisiae, a CoQ é constituída por um anel de benzeno associado a uma cadeia poliprenil, com 6 unidades de repetição, sendo por isso também denominada CoQ₆ ou Q₆. Ao todo já foram identificados treze genes (COQ1 - COQ11, ARH1 e YAH1) nucleares necessários para biossíntese da CoQ. A maioria dos produtos Cog estão fisicamente associados em um complexo biossintético ancorado na membrana mitocondrial interna. Neste projeto, tentamos descrever resíduos relevantes de Cog3p e Cog7p aliando análises de bioinformática com testes fenotípicos para balizamento funcional. Cog7p é uma proteína com dois centros de ferro com íons carboxilato e catalisa a hidroxilação de demetoxi-Q₆ (DMQ₆). Neste estudo, indicamos um grupo de resíduos que modulam a atividade e a estabilidade de Coq7p: D53, R57, V111 e S114. Enquanto R57, V111 e S114 são resíduos muito conservados, V111 e S114 estão correlacionados em comunidades de coevolução. Aqui, demonstramos também que o duplo mutante S114A, V111G e o mutante S114E apresentam deficiência respiratória em temperatura não permissiva, além de acumularem o intermediário DMQ₆ e sintetizarem baixas quantidades de Q₆, concluindo assim que o fosmimético S114E inibe a atividade Cog7p. Dessa forma, propomos que a fosforilação do resíduo S114 promove o deslocamento de uma alça entre as hélices 2 e 3, afetando assim a atividade do centro catalítico Coq7p. Por sua vez, Coq3p atua como uma metiltransferase, catalisando diferentes passos durante a biossíntese da CoQ. Aqui, identificamos resíduos que colaboram para a atividade funcional de Coq3p: E123, S125, C131, G133, G134, H165, D203, E219, K258 e S262. Mutantes carregando as alterações E123A, H165A, D203A, E219A, K258A e S62A apresentam discreto crescimento respiratório e expressão de Coq3p similares à da linhagem selvagem, além de acumularem baixas quantidades de Q6. Enquanto C131, G133 e G134 são resíduos altamente conservados, localizados em uma alça no espaço entre fitas beta, no provável sítio ativo da proteína, mutantes C131A, G133A e G134A se superexpressos apresentam crescimento respiratório em meio contendo fonte de carbono não fermentável, além de acumularem Q₆ compatíveis com os níveis de expressão proteica. Propomos assim um modelo para Coq3p, tendo os resíduos C131, G133 e G134 como centro catalítico de Cog3p.

Palavras-chave: Saccharomyces cerevisiae. Coenzima Q. Mutagênese sítiodirigida. COQ7. COQ3.

ABSTRACT

PAULELA, J. A. Characterization of Saccharomyces cerevisiae strains deficient in the biosynthesis of Coenzyme Q. 2017. 122 f. Ph. D. Thesis (Doctorate in Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Coenzyme Q (CoQ) is a molecule of essential function in the transfer of electrons of the mitochondrial respiratory chain. In Saccharomyces cerevisiae, CoQ is constituted by a benzene ring associated with a polyprenyl chain with 6 repetition units, being therefore also denominated CoQ₆ or Q₆. Thirteen nuclear genes have already been identified (COQ1 – COQ11, ARH1 and YAH1) required for coenzyme Q biosynthesis. Most of Coq products are physically associated in a biosynthetic complex anchored at the mitochondrial internal membrane. In this project, we identified Cog3p and Coq7p residues relevant for their respective role in CoQ synthesis combining bioinformatics analyzes with phenotypic tests for functional mapping. Coq7p is a carboxylate-bridged di-iron protein that catalyzes the hydroxylation of demetoxy-Q6 (DMQ₆), the last monooxygenase step in the synthesis of CoQ. In this study, we found a group of residues that modulate the activity and stability of Coq7p: D53, R57, V111 and S114. While R57, V111 and S114 are highly conserved residues, V111 and S114 are correlated in communities of coevolution. We also demonstrate that the double mutant S114A, V111G and the mutant S114E have respiratory deficiency at non-permissive temperature, in addition to accumulating of the intermediate DMQ₆ and low amounts of Q₆, thus concluding that phosmimetic S114E inhibits the activity of Coq7p. Hence, we propose that the phosphorylation of S114 is required to move a loop between helices 2 and 3, thus affecting the activity of the catalytic center Coq7p. For its part, Coq3p acts as a methyltransferase, catalyzing different steps during biosynthesis of CoQ. Here we identified residues that collaborate for functional activity of Coq3p: E123, S125, C131, G133, G134, H165, D203, E219, K258 and S262. Mutants E123A, H165A, D203A, E219A, K258A and S62A, have mild respiratory growth, and expression of Cog3p levels similar to the wild strain, in addition to accumulating low amounts of Q6. While C131, G133, and G134 are residues highly conserved, located in a loop in the space between beta sheets, the overexpression of the mutants C131A, G133A and G134A present respiratory growth in medium containing non-fermentable carbon source, in addition to accumulate Q6 compatible with the levels of protein expression. We propose a model for Coq3p, with residues C131, G133 and G134 as part of Coq3p catalytic center.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*. Coenzyme Q. Site-directed mutagenesis. *COQ7. COQ3*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Células de Saccharomyces cerevisiae	16
Figura 2 - Morfologia Mitocondrial	18
Figura 3 - Complexos da cadeira respiratória mitocondrial	21
Figura 4 - Organização do complexo biossintético da Coenzima Q.	24
Figura 5 - Biossíntese da Coenzima Q e seus intermediários em eucariotos	28
Figura 6 - Método de perturbação estatística para medir acoplamentos entre posições de	
alinhamento de proteínas.	31
Figura 7 - Esquema da Mutagênese sítio-dirigida por sobreposição de produtos de PCR	41
Figura 8 - Alinhamento da sequência de aminoácidos presentes em Coq7p	49
Figura 9 - Propriedade de crescimento mutantes coq7-ts	50
Figura 10 - Sub-clonagens de COQ7 e testes de complementação	52
Figura 11 - Redes de decomposição de resíduos de Coq7p	54
Figura 12- Rede de aderência de resíduos dentro das comunidades	54
Figura 13 - Modelo de Coq7p e grupos de correlação de resíduos na família Coq7p	55
Figura 14 - Modelo em detalhe da hélice 2 (H2) de Coq7p	56
Figura 15 – Estrutura de Coq7p – Interação entre os resíduos próximos ao centro di-férrico	57
Figura 16- Avaliação do crescimento respiratório de mutantes COQ7, por diluições seriadas	59
Figura 17 - Teste comparativo de crescimento do mutante coq7/S114E	60
Figura 18 - Avaliação dos níveis de expressão proteica em mutantes coq7	62
Figura 19 - Cromatogramas para a detecção de Q ₆ e seus intermediários em mutantes coq7	63
Figura 20 - Alinhamento da sequência de aminoácidos presentes em Coq3	67
Figura 21 - Redes de correlação de resíduos de Coq3p	70
Figura 22– Modelo estrutural tridimensional da proteína Coq3p	73
Figura 23 - Comunidades de resíduos fortemente acoplados e Modelo de Coq3p colorido por	
alfa-hélice, folha beta-pregueada e loops	74
Figura 24 - Fotos representativas das reações de PCR por sobreposição de fragmentos	75
Figura 25 - Diluições seriadas das linhagens mutantes coq3	77
Figura 26 – Avaliação da capacidade respiratória dos alelos em plasmídeo integrativo	78
Figura 27 - Análise do efeito da superexpressão de COQ8 sobre o crescimento de mutantes	
coq3	79
Figura 28 - Avaliação dos níveis de expressão proteica em mutantes coq3 expressos em veto	r
epissomal.	90
Figura 29 - Avaliação dos níveis de expressão proteica em mutantes coq3 expressos em veto	r
integrativo.	91
Figura 30 - Cromatogramas representativos da detecção de Q ₆ e seus intermediários em	
mutantes coq3.	94

ÍNDÍCE DE TABELAS

Tabela 1 - Linhagens utilizadas neste estudo:	34
Tabela 2 - Composição dos meios de cultura para o crescimento de <i>S. cerevisiae</i> e <i>E. coli</i>	35
Tabela 3 - Composição dos géis de separação e de empilhamento utilizados nas análises por	
SDS-PAGE	43
Tabela 4 - Quantificação de Q ₆ e DMQ ₆ em diferentes linhagens mutantes <i>coq7</i> , com a	
superexpressão de COQ8 (+COQ8)	65
Tabela 5 - Análise dos resíduos conservados na família de metiltransferases.	69
Tabela 6 - Residuos de Coq3p fortemente acoplados na comunidade 1	71
Tabela 7- Residuos de Coq3p fortemente acoplados na comunidade 2	71
Tabela 8 -Residuos de Coq3p fortemente acoplados na comunidade 3.	71
Tabela 9 - Validação pelo Diagrama de Ramachandran de modelos tridimensionais de Coq3p,	
obtidos em três servidores diferentes	72
Tabela 10 - Validação pelo Verify3D de modelos tridimensionais de Coq3p, obtidos em três	
servidores diferentes	72
Tabela 11 - Comparação de residuos presentes em Coq3p e outros membros da família de	
metiltransferases, a partir do alinhamento estrutural no servidor TopMatch.	81
Tabela 12 - Hipóteses para interação dos resíduos conservados e/ou correlacionados.	83
Tabela 13 - Quantificação de Coenzima Q ₆ (µg de Coenzima/mg de proteína mitocondrial) em	
diferentes mutantes coq3, crescidos a 30 °C.	92

LISTA DE ABREVIATURAS

4HB	4-hidroxibenzóico
Acetil-CoA	Acetil Coenzima A
ADP	Adenosina difosfato
AOX	Oxidase alternativa
ATP	Adenosina trifosfato
CEGH-CELL	Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e células-tronco
CoQ	Coenzima Q
DMQ ₆	Demethoxy-Q
DPNH	Difosfopiridina reduzida
DRCN	Decomposition of Residues Correlation Networks
HAB	Ácido 3-hexaprenil-4-aminobenzoico
HHB	Ácido 3-hexaprenil-4-hidroxibenzóico
Kb	Kilobases
kDA	Kilodaltons
mtDNA	DNA mitocondrial
ORFs	Open reading frames
рАВА	Acido para-aminobenzoico
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
Q	Quinona
Q•-	Semiquinona desprotonada
Q_6	Coenzima Q
rRNA	RNA ribossomal
tRNA	RNA transportador
SCA	Statistical Coupling Analysis
ТІМ	Translocase inner membrane
ТОМ	Translocase outer membrane
tRNA	RNA transportador

1 INTRODUÇÃO	_16
1.1 Saccharomyces cerevisiae como modelo de estudo da biogênese mitocondrial	16
1.2 A mitocôndria	18
1.2.1 DNA mitocondrial (mtDNA)	20
1.2.2 Cadeia Respiratória	21
1.3 Coenzima Q	22
1.4 Decomposição de Redes de Correlação de Resíduos	30
2 OBJETIVOS	_33
2.1 Objetivo Geral	33
2.2 Específicos	33
<u>2.2.1 COQ7</u>	33
<u>2.2.2 COQ3</u>	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 Procedimentos gerais	34
3.1.1 Linhagens utilizadas	34
3.1.2 Meios de cultura dos microrganismos	35
3.1.3 Condições de cultivo dos microrganismos	36
3.2 Métodos gerais para manipulação de DNA	36
3.2.1 Isolamento Plasmidial	36
3.2.2 Transformação de E. coli com DNA exógeno e preparação de bactérias	37
competentes pelo método de CaCl2	37
3.2.3 Transformação das células de S. cerevisiae	38
3.2.4 Construção de mutantes COQ7 por PCR propenso a erro e por mutagênese sítio-dirigida e subclonage	<u>em</u>
das porções N e C-terminal	38
3.2.5 Construção dos mutantes COQ3 por mutagênese sítio-dirigida	40
3.2.6 Sequenciamento de DNA	42
3.2.7 Isolamento de mitocôndrias de S. cerevisiae – método da zimoliase	42
3.2.8 Análise das proteínas mitocondriais: eletroforese em gel de poliacrilamida em condição desnaturante	<u>9</u>
(SDS-PAGE) seguido de western blot	43
3.2.9 Extração e análise lipídica	44
3.3 Decomposição de Redes de Correlação de Aminoácidos (DRCN)	45
3.3.1 Filtragem e análise de Resíduos conservados	45
3.3.2 Matrizes de autocorrelação e detecção de comunidades	46
3.4 Modelagem molecular de Coq3p	46
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO PARCIAL	_48
4.1. COQ7	48
4.1.1 Alinhamento e análise de resíduos conservados de Coq7p	48
4.1.2 Propriedades dos mutantes de Coq7	50
4.1.3 Análise da expressão de Coq7p	60
4.1.4 Avaliação dos níveis endógenos de Q₀ em mutantes coq7	62
4.2 COQ3	66
4.2.1 Alinhamento e análise de resíduos conservados de Coq3p	66
4.2.2 Decomposição de Redes de Correlações de Aminoácidos (DRCN) de Coq3p	68
4.2.3 Modelagem Molecular de Coq3p	71
4.2.4 Clonagem dos mutantes pontuais de Coq3p baseados na análise DRCN	75
4.2.5 Propriedades dos mutantes de ponto de Coq3	76
4.2.0 mporese das interações dos residuos conservados e/ou coevoluídos na estrutura de coq3p	08 28
4.2.8 Avaliação dos níveis endógenos de Q₀ em mutantes COQ3	91

SUMÁRIO

5 DISCUSSÃO	_95
5.1 Resíduos relevantes para a atividade de Coq7p	95
5.2 Resíduos relevantes para a atividade de Coq3p	97
6 CONCLUSÕES	102
6.1 COQ7	_102
6.2 COQ3	_103
ANEXOS	118
A - Primers utilizados para a amplificação dos fragmentos de <i>coq7</i>	118
B - Primers utilizados para a amplificação dos fragmentos de <i>coq3</i> a serem	
utilizados para posterior reação de sobreposição	119
C - Cromatogramas representativos da detecção de q6 e seus intermediários e	
mutantes coq3	121
D - Modelos representativos do alinhamento para comparação estrutural entre	0
modelo de coq3p e outras proteínas da família pf1349, através do servidor	
topmatch	122
E - Coq7p relevant residues for protein activity and strability1	223

1 INTRODUÇÃO

1.1 Saccharomyces cerevisiae como modelo de estudo da biogênese mitocondrial

Saccharomyces cerevisiae é um fungo unicelular leveduriforme, utilizado há mais de 6.000 anos antes de Cristo, nas primeiras civilizações humanas, para a produção de bebidas como vinho e cerveja e na fermentação de massas (FELDMANN, 2010).

A levedura foi introduzida como um organismo experimental por Hershel Roman, em 1930 (FELDMANN, 2010). ÖWinge foi o primeiro a demonstrar a alternância de gerações de *S. cerevisiae* em fases haplóide e diplóide; as haplóides existindo em dois tipos sexuais: "a" e "α" (WINGE, 1935). Foi Lindegren o primeiro a identificar a existência de cepas heterotálicas, isto é, que mantinham o seu tipo sexual; também descreveu as mudanças morfológicas pelas quais passam células de levedura durante seu ciclo de vida (LINDEGREN, 1943). Já em 1949, Boris Ephrussi percebeu a existência de colônias pequenas e brancas que surgiam espontaneamente, as quais nomeou "*petites*"; além do tamanho, essas colônias também se caracterizavam pela incapacidade de crescimento em meio de cultura contendo fonte de carbono não fermentável (EPHRUSSI, 1949). Ao final da década de 70, os estudos genéticos usando *S. cerevisiae* como modelo ganharam grande impulso com o desenvolvimento de técnicas de transformação com DNA recombinante exógeno, tal qual já era realizado em *Escherichia coli* (FELDMANN, 2010; SHERMAN, 1992).

Figura 1 – Células de Saccharomyces cerevisiae.

Em A é possível observar células diploides da levedura expressando proteínas nucleares, através de microscopia de fluorescência. Em B as leveduras estão sofrendo divisão. As células têm diâmetro de aproximadamente 5µm. Adaptado de: Duina; Miller e Keeney (2014).



Com organização celular semelhante às demais células eucariotas, as leveduras pertencem ao grupo dos ascomicetos, e apresentam parede celular composta por quitina e outros açúcares; membrana celular composta por ergosterol; não apresentam centríolos e a divisão celular ocorre por brotamento. Cada broto de levedura recebe uma cópia de todos os cromossomos nucleares da célula-mãe, incluindo parte do citoplasma, mitocôndrias e outras organelas. Como mencionado anteriormente, as células de S. cerevisiae, na forma haplóide, possuem dois tipos sexuais, designados "a" e "a", que ao entrarem em contato físico têm parte de seus núcleos fundidos, gerando zigotos diplóides. Imediatamente em seguida, ocorrem duas meioses, originando quatro núcleos haplóides, que se dividem por mitose, produzindo quatro esporos haplóides, estes ficam arranjados no interior do asco em tetraedro, refletindo as duas divisões meióticas e a única divisão mitótica (Figura 1B). Em laboratório é possível estimular o processo formador de esporos haplóides, através do uso de meio de cultura contendo acetato de potássio (KAc) como fonte de carbono e, após dois dias nessa condição de cultura, há ascos suficientes para dissecção e separação dos esporos por micromanipulação (HERSKOWITZ, 1988).

Assim, diversas características favoreceram o estabelecimento de *S. cerevisiae* como modelo para funcionamento da célula eucariótica: os dois tipos sexuais opostos permitem cruzamentos diretos, extremamente úteis em estudos genéticos de alelismo e dominância; a disponibilidade de diferentes tipos de plasmídeos e a recombinação homóloga criaram um versátil e único sistema em possibilidades para manipulação genética; é facilmente cultivada em meio definido, favorecendo o controle sobre interferências químicas e físicas; seu tempo de geração na fase exponencial de crescimento é de aproximadamente 90 minutos em meio rico, permitindo a alta disponibilidade de indivíduos para realização de experimentos e acarretando em um baixo custo para a manutenção das linhagens (OHLMEIER et al., 2003; SCHWIMMER et al., 2006). Finalmente, *S. cerevisiae* foi o primeiro eucarioto a ter seu genoma totalmente sequenciado (GOFFEAU et al., 1996) levando ao pioneirismo nos estudos "ômicos" (FELDMANN, 2010; GERSHON; GERSHON, 2000; GOFFEAU et al., 1996).

Além de permitir nosso melhor entendimento sobre as diversas funções de uma célula eucariótica, por ser um organismo aeróbio facultativo, *S. cerevisiae* é um modelo amplamente utilizado em estudos sobre a biogênese mitocondrial; mutantes mitocondriais deste organismo podem sobreviver em fontes de carbono fermentáveis, usando a energia formada na conversão de glicose em piruvato, durante o processo de glicólise, e dessa forma não dependem do ATP gerado pela fosforilação oxidativa. A maioria dos genes que codificam proteínas mitocondriais são altamente conservados entre os eucariotos (KRUFT et al., 2001; RABILLOUD et al., 1998), assim, o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na biogênese mitocondrial em levedura auxilia a compreensão desse processo em eucariotos mais complexos (FOURY; KUCEJ, 2001; GOFFEAU et al., 1996; OHLMEIER et al., 2004).

1.2 A mitocôndria

A mitocôndria (Figura 2) é uma organela que desempenha função central em diversos processos celulares, sendo mais conhecida pelo suprimento celular de energia metabólica na forma de ATP, gerado pelo sistema de fosforilação oxidativa (SARASTE, 1999), além de atuar em diversas reações catabólicas e anabólicas, incluindo o ciclo do ácido cítrico, a β -oxidação de ácidos graxos, a biossíntese dos grupamentos heme e ferro-enxofre (BONAWITZ et al., 2007; HOLZENBERGER et al., 2003; WINDE; GRIVELL, 1993), além de atuar como regulador-chave da morte celular programada (TAIT; GREEN, 2010) e do envelhecimento celular (LARSSON, 2010; WALLACE, 2005).

Figura 2 - Morfologia Mitocondrial.

1 – Célula eucariótica; (a) - Esquema representativo de uma mitocôndria, indicando seus compartimentos: matriz, crista, membrana interna e membrana externa; (b) – Microscopia eletrônica de mitocôndria, indicando seus compartimentos, assim como no esquema (a). Adaptado de Tortora; Funke; Case (2017).



De acordo com a teoria endosimbionte, proposta inicialmente em 1967 por Lynn-Margulis (SAGAN, 1967), as mitocôndrias presentes em organismos eucariontes resultam da simbiose entre uma α-proteobactéria, capaz de utilizar o oxigênio da atmosfera, e uma arquea anaeróbica metanogênica, que obtinha energia exclusivamente através da via glicolítica (DOLEZAL et al., 2006), ocorrendo o intercâmbio do ATP produzido aerobicamente pelo simbionte e compostos orgânicos fornecidos pelo hospedeiro anaeróbico, resultando na transferência de genes mitocondriais para o núcleo do hospedeiro, como resultado da seleção natural contrária aos efeitos lesivos dos radicais livres produzidos pela nova organela (ALLEN; RAVEN, 1996).

A mitocôndria é envolta por duas membranas que delimitam compartimentos distintos. A membrana interna delimita a matriz mitocondrial, enquanto o espaço entre elas é conhecido como espaço intermembranas. A membrana externa permite a livre difusão de moléculas de até ~5 KDa, e contém moléculas da proteína de transporte porina e outras proteínas que formam os complexos TOM (do inglês, *"Translocase Outer Membrane"* – transportador de membrana externa), que importam as proteínas necessárias ao funcionamento da organela, além de regular o mecanismo de fissão (quando há divisão celular) e fusão (quando duas células se tocam e trocam material genético). A membrana interna, impermeável a íons, possui os complexos respiratórios responsáveis pela fosforilação oxidativa (Complexo I a V) e possui as proteínas TIM (do inglês, *"Translocase Inner Membrane"* – transportador de membrana interna) que regulam a importação de proteínas e metabólitos da membrana interna para a matriz mitocondrial (RYAN; HOOGENRAAD, 2007).

O espaço intermembranas possui fatores que controlam a apoptose (morte celular programada) (SUSIN et al., 1999), e é o local onde se forma o gradiente de prótons durante o processo de transferência de elétrons da cadeia respiratória (ALBERTS et al., 2002; RYAN; HOOGENRAAD, 2007).

Nas invaginações formadas na membrana interna, chamadas cristas mitocondriais, está localizado o sistema de fosforilação oxidativa (SCHAFFER; SULEIMAN, 2007; TZAGOLOFF, 1982), abrigando proteínas que controlam a passagem de metabólitos, além da ATP-sintase e outras proteínas dos complexos respiratórios, responsáveis pela captação de elétrons dos substratos NADH e

FADH₂, gerados pelo ciclo de Krebs (DIMMER et al., 2002; RYAN; HOOGENRAAD, 2007).

A matriz mitocondrial é solúvel, e é onde ocorre a replicação e transcrição do DNA mitocondrial (mtDNA); a síntese dos centros Ferro/Enxofre (BONAWITZ et al., 2007; HOLZENBERGER et al., 2003); o ciclo de degradação de proteínas (ALBERTS et al., 2002; LEHNINGER et al., 2004), além de ser também onde se encontram as enzimas como, por exemplo, as envolvidas no ciclo do ácido cítrico, da β -oxidação de ácidos graxos e da oxidação de aminoácidos.

1.2.1 DNA mitocondrial (mtDNA)

Uma das principais características da mitocôndria é possuir genoma próprio, que codifica poucos peptídeos componentes essenciais dos complexos da cadeia respiratória (BARRIENTOS, 2003; BARROS, 2010; WALLACE et al., 2005; XING et al., 2007).

Conforme mencionado anteriormente, estudos realizados por Boris Ephrussi, em 1949, através do emprego do composto mutagênico acriflavina, resultaram na descoberta de uma mutação, herdada citoplasmaticamente, que promovia uma deficiência da função respiratória, o que permitiu concluir que a morfogênese mitocondrial é controlada por um elemento genético não cromossomal, denominado fator (*rho*). Células *rho*^o são caracterizadas por apresentar ausência total de DNA mitocondrial, enquanto células que apresentam genoma mitocondrial contendo grandes deleções são denominadas *rho*-. Mutantes rho- ou *rho*^o são deficientes respiratórios e incapazes de crescer em um meio com fonte de carbono não fermentável, como o etanol e o glicerol.

Observado e relatado pela primeira vez por Schatz e colaboradores, em 1964, o DNA mitocondrial (mtDNA) de *S. cerevisiae* codifica três subunidades da citocromo *c* oxidase (*COX1*, *COX2* e *COX3*), três subunidades da ATP-sintase (*ATP6*, *ATP8* e *ATP9*), uma subunidade da ubiquinol citocromo *c* redutase (*COB1*), uma proteína ribossomal (*VAR1*), além dos RNAs ribossomais e transportadores, que permitem a síntese de uma pequena fração de suas proteínas, dependendo da importação das demais, codificadas pelo DNA nuclear (SCHWIMMER et al., 2006; XING et al., 2007).

Mamíferos possuem DNA mitocondrial com tamanho médio de 16 kb, que codifica 37 genes, sendo 2 rRNA (RNA ribossômico), 22 tRNA (RNA transportador) e

13 polipeptídeos, incluindo a ATP-sintase 6 e ATP-sintase 8 e componentes dos complexos I, III e IV (*COX*1, 2 e 3, *Cit*B e 7 subunidades NADH-CoQ redutase) (ROTIG, 2010; SCHWIMMER et al., 2006). *S. cerevisiae* apresenta um DNA mitocondrial com aproximadamente 85 kb, empacotado no interior de uma estrutura nucleóide globular com um diâmetro médio de ~ 0,3 µm nas células aeróbicas, onde pode existir de 1 a 2 genomas mitocondriais (CHEN; BUTOW, 2005). Aproximadamente 2/3 do genoma mitocondrial de leveduras consiste de sequências não codificantes como introns e sequências intergênicas (ORFs).

A imensa maioria do proteoma mitocondrial (~1200 proteínas) é proveniente do processo traducional do citoplasma e importadas para o interior da organela pelo sistema TOM-TIM. Os complexos respiratórios são os únicos complexos enzimáticos da célula cuja biogênese depende da informação decodificada por dois genomas, o que aumenta a complexidade de sua montagem havendo a constante necessidade da comunicação entre núcleo e mitocôndria (CHEN; BUTOW, 2005; FALKENBERG et al., 2007; FOURY et al., 1998; KELLY; SCARPULLA, 2004; WONG, 2010;).

1.2.2 Cadeia Respiratória

O sistema de fosforilação oxidativa (Figura 3) é composto por uma série de carregadores responsáveis pela catálise da transferência de elétrons provenientes das oxidações das moléculas de alimento.

Figura 3 - Complexos da cadeira respiratória mitocondrial.

As setas em vermelho indicam o fluxo de elétrons através dos componentes da cadeia respiratória mitocondrial. Os elétrons derivados do NADH e succinato são transferidos para o oxigênio molecular por meio de uma série de carreadores presentes na membrana mitocondrial interna. O gradiente eletroquímico (setas cinza), gerado pela transferência de elétrons, impulsiona a síntese de ATP por meio do complexo da ATP-sintase. Adaptado de: Sazanov e colaboradores (2015).



O complexo I (NADH: ubiquinona oxidorredutase) constitui o maior complexo da cadeia respiratória, com cerca de 42 subunidades diferentes, sendo inibido por rotenona (GRANDIER-VAZEILLE et al., 2001). *S.cerevisiae*, entretanto, não possui esse complexo, apresentando duas NADH desidrogenases (Nde1p e Nde2p), localizadas no espaço intermembranas (LUTTICK et al., 1998) e uma NADH desidrogenase (Ndi1p), localizada na matriz mitocondrial (MARRES et al., 1991), sendo as três enzimas responsáveis pelo acoplamento da oxidação do NADH com a redução da ubiquinona (BAKKER et al., 2001).

O complexo II (succinato: ubiquinona oxidorredutase) transfere elétrons recebidos do FADH₂ e participa do ciclo de Krebs (LEHNINGER et al., 2004). Os complexos I e II doam os elétrons recebidos para uma coenzima lipossolúvel, a coenzima Q (LÓPEZ-LLUCH et al., 2010), que, por sua vez, assume a forma reduzida (ubiquinol) e os transfere para o complexo III (ubiquinona: citocromo *c* oxidorredutase) (BARRIENTOS et al., 2002; ROTIG, 2010).

O complexo III possui como centros catalíticos o citocromo *b*, citocromo *c1* e o centro Ferro/Enxofre *de Rieske*, além de permitir a passagem de íons de hidrogênio para o espaço intermembrana. Do complexo III, os elétrons passam para o citocromo *c*, e este passa os elétrons para o complexo IV (citocromo *c* oxidase), que possui como centros catalíticos os centros metálicos CuA, CuB, os hemes *a* e *a*3. O complexo IV faz a redução do oxigênio em água (SARASTE, 1999).

Ao contrário de outros fungos, *S. cerevisiae* não apresenta uma oxidase alternativa (AOX), insensível ao cianeto, que catalisa a oxidação da ubiquinona diretamente pelo oxigênio molecular, sem gerar a força próton-motor (VANLERBERGHE; MCINTOSH, 1997). A passagem dos elétrons do complexo I para o complexo IV resulta na transferência de prótons da membrana para o espaço intermembrana, gerando um gradiente eletroquímico, que força a volta dos prótons para a matriz mitoncondrial pelo poro do complexo V (composto pelo complexo F₁ associado ao complexo F₀, ambos componentes da ATP-sintase), fosforilando o ADP em ATP (BERG et al., 2008; LEHNINGER et al., 2004; MUSTER et al., 2010; SARASTE, 1999; SCHIMMER et al., 2006).

1.3 Coenzima Q

A coenzima Q (CoQ) foi isolada e caracterizada pela primeira vez em procariotos por Festenstein e colaboradores, em 1955; é uma molécula lipofílica,

carregadora de elétrons, e presente praticamente em todos os seres vivos. Dada a sua ubiquidade, também é conhecida como ubiquinona, e sua síntese envolve uma série de modificações realizadas a partir da junção do ácido hidroxibenzóico, derivado de aminoácidos aromáticos como, por exemplo, a tirosina, com uma cadeia isoprenóide, derivada do mevalonato (revisto em TRAN; CLARKE, 2007).

O tamanho da cadeia isoprenóide varia entre os seres vivos: em bactérias é possível encontrar cadeias curtas, com duas unidades de repetição; em levedura, com seis unidades; em humanos, com dez unidades. Assim, comumente nos referimos à Coenzima Q humana como Q₁₀ e, à de leveduras e bactérias, como Q₆ e Q₂, respectivamente. Localizada na mitocôndria, a coenzima é encontrada em três estados redox durante sua ação na cadeia respiratória mitocondrial: completamente oxidada (ubiquinona), o radical semiquinona (ubisemiquinona) e completamente reduzida (ubiquinol) (LENAZ et al., 2007; LENAZ; GENOVA, 2009).

Em *S. cerevisiae*, a CoQ (Q₆) realiza o transporte de elétrons entre as NADH desidrogenases, succinato desidrogenase (complexo II), e o complexo *bc*1 (complexo III) da cadeia respiratória mitocondrial (GLOOR; WISS, 1958, HATEFI, 1985; LENAZ et al., 2007). Além de atuar na transferência de elétrons, a Q₆ participa no controle da abertura dos poros de transição da membrana mitocondrial; regula a atividade das proteínas desacopladoras (BENTINGER et al., 2010) e também atua como importante antioxidante, impedindo a oxidação de lipídeos, proteínas e DNA (BENTINGER et al., 2007).

Durante a década de 60, foram realizados ensaios empregando a Q₂ na oxidação da difosfopiridina reduzida (DPNH), e a elevada velocidade de oxidação da DPNH não foi considerada como resultado da colisão durante o transporte da cadeia de elétrons, mas sim devido à ação da Q₂ adicionada (GREEN; HATEFI, 1961).

Em 1975, Mitchell propôs o ciclo de regeneração da Coenzima Q (ciclo Q próton motivo): elétrons provenientes dos complexos I e II atravessam a membrana interna mitocondrial, fornecendo dois prótons para o espaço intermembrana, e paralelamente ocorre a transferência de elétrons para a proteína ferro-enxofre (FeS, proteína *Rieske*) do complexo III - (ubiquinol citocromo *c* redutase ou complexo *bc*1), que transfere os elétrons da Coenzima Q para o citocromo *c*, resultando em uma semiquinona desprotonada (Q^{•-}), sendo esta um radical livre tóxico e impermeável à membrana, que deve doar o segundo elétron para o grupo heme *b*L, formando uma quinona (Q) (COVIAN et al., 2007; TRUMPOWER, 1990).

A energia liberada pela passagem dos elétrons em seus centros catalíticos, para bombear prótons para o espaço intermebrana, auxilia o gradiente eletroquímico necessário à formação de ATP, sendo que a redução da ubiquinona ocorre no sítio "N", e a reoxidação do ubiquinol no sítio "P" (TRUMPOWER, 1990).

A biossíntese da Coenzima Q, em *S. cerevisiae*, é realizada por uma série de enzimas da matriz mitocondrial, algumas das quais estão associadas em um grande complexo biossintético ancorado na membrana mitocondrial interna (revisto em TRAN; CLARKE, 2007).

Até o momento foram descritos ao menos 13 genes de levedura (COQ1-COQ11, ARH1 e YAH1) envolvidos na biossíntese da Q₆ (Figura 4).

Figura 4 - Organização do complexo biossintético da Coenzima Q.

Coq8p é necessário para a fosforilação de Coq3p, Coq5p e Coq7p. Essas proteínas imunoprecipitam em um complexo contendo Coq6p. Coq11p imunoprecipita em complexo contendo as proteínas Coq4p, Coq5p e Coq7p. Coq1p, Coq2p e Coq10p não estão associadas a complexos protéicos (Adaptado de: ALLAN et al., 2015).



Em *S. cerevisiae,* mutantes *coq* são deficientes respiratórios, incapazes de crescer em meio com fonte de carbono não fermentável, como o glicerol ou o lactato, sendo essa capacidade restaurada quando há adição de Q_6 ao meio (DO et al., 2001; JONASSEN et al., 1998). Outra maneira de se comprovar a deficiência específica na biossíntese de Q_6 de um dado mutante respiratório de levedura é a partir do estudo do consumo de oxigênio de mitocôndrias isoladas, que pode ser restaurado nos mutantes *coq* pela adição de Q_2 sintética (TZAGOLOFF; DIECKMANN, 1990).

Na espécie humana, a Q₁₀ atua também como aceptor de elétron para o glicerol-3-fosfato, colina, sarcosina, sulfetos, aminoácidos, lipídeos e enzimas, como

a acil-acetil-CoA desidrogenase (HILDEBRANDT ; GRIESHABER, 2007; LENAZ; DE SANTIS, 1985).

Na biossíntese de Q₆ (Figura 5), a cadeia isoprenóide é gerada pela ação de Coq1p, seguida pela conversão do poliprenil-fosfato em 4-hidroxibenzoato (4HB), sendo que em humanos essa atividade é realizada pelos genes *PDSS1* e *PDSS2*. As cadeias poliisoprenóides são providas pelo dimetildifosfato e isoprenil difosfato, ambos precursores de cinco carbonos, derivados da acetil-coenzima A na via do mevalonato (GRUNLER et al., 1994). O 4-hidroxibenzoato (4HB) é derivado da tirosina, um aminoácido essencial em eucariotos mais complexos (MEGANATHAN, 2001). Entretanto, em levedura, o 4HB também pode ser sintetizado através da via do corismato (GOEWERT, 1980 *apud* TRAN; CLARKE, 2007).

Coq2p funciona como âncora desses polipeptídeos, catalisando a ligação da cadeia isoprenóide ao 4-hidroxibenzoato (4HB), convertendo-o em ácido 3-hexaprenil-4-hidroxibenzóico (HHB), da mesma forma que o gene *Ub*iA em *Escherichia coli* (SUZUKI et al., 1994); além de catalisar a conversão do ácido para-aminobenzóico (pABA) em ácido 3-hexaprenil-4-aminobenzóico (HAB), (ASHBY; EDWARDS, 1990; HSIEH et al., 2007; TAUCHE et al., 2008; XIE et al., 2012). A partir daqui, seguem-se reações de metilações e hidroxilações do anel hidroxibenzóico até a formação da Q₆ madura (TRAN; CLARKE, 2007; PIERREL et al., 2010),

Análises eletroforéticas de extratos mitocondriais solubilizados com digitonina demonstraram que Coq2p, Coq3p, Coq4p, Coq7p e Coq9p formariam um complexo multienzimático de alta massa molecular, ancorado na membrana interna da mitocôndria (HSIEH et al., 2007). Estudos similares realizados em mutantes nulos para essas proteínas mostraram a instabilidade do complexo na ausência de um dos componentes (HSIEH et al., 2007; TRAN et al., 2006). Esses ensaios foram complementados pela análise de co-imunoprecipitação e cromatografia por filtração em gel, em que foi possível observar que Coq3p, Coq4p, Coq6p, Coq7p e Coq8p dependem da expressão de cada um dos outros genes *COQ* (HSIEH et al., 2007; MARBOIS et al., 2005), uma vez que problemas na expressão de qualquer um dos componentes do complexo afeta a estabilidade de todo o complexo (GIN; CLARKE, 2005; HSU et al., 2000).

Mutantes *coq7* tem baixos níveis de Coq3p, Coq4p e Coq9p entre outros (BUSSO et al., 2015; TRAN et al., 2006), sendo Coq4p necessário para manter a

estabilidade de Coq7p (BELOGRUDOV et al., 2001). Coq6p atua como uma monooxigenase flavina-dependente, e depende de reações de óxido-redução desencadeadas por Yah1p (uma ferredoxina) e Arh1p (ferredoxina redutase) (GIN et al., 2003; OZEIR et al., 2011; PIERREL et al., 2010; TRAN; CLARKE, 2007). Coq9p é necessário para a substituição de grupos amina pelo grupo hidroxila, além de atuar junto a Coq6p e Coq7p (XIE et al., 2012). Coq5p catalisa a C-metiltransferase e Coq7p catalisa a hidroxilação do intermediário DMQ₆, o penúltimo passo na formação da Q₆ (MARBOIS; CLARKE, 1996; STENMARK et al., 2001).

A montagem do complexo multienzimático formado por Coq3p, Coq4p, Coq6p, Coq7p, e Coq9p ocorre em duas etapas sequenciais: primeiro é formado um intermediário de 700 Kda, responsável pela síntese do intermediário dimetoxi-Q₆ (DMQ₆), para então Coq7p ser incorporado ao complexo e finalizar a síntese de Q₆ (GONZÁLES-MARISCAL et al., 2014).

O gene *COQ8*, inicialmente descrito como *ABC1* (BOUSQUET et al., 1991), quando superexpresso, suprime parcialmente o defeito respiratório em linhagens mutantes *COQ9 e COQ10* (BARROS et al., 2005; JOHNSON et al., 2005), permitindo inclusive o acúmulo de intermediários da via biossintética de Q₆ anteriormente impossíveis de serem detectados, pois o excesso de Coq8p leva também a um aumento da estabilidade das proteínas Coq, mesmo na falta de um dos componentes do complexo multienzimático envolvido na biossíntese de Q₆ (GIN;CLARKE, 2005; XIE et al., 2011; ZAMPOL et al, 2010). Por sua vez, na ausência de Coq8p este complexo é desfeito (DO et al., 2001) e a maior estabilidade conferida por Coq8p às proteínas deve-se, possivelmente, a eventos de fosforilação, pois diversas evidências apontam para uma provável atividade quinase de Coq8p (LAGIER-TOURENE et al., 2008; XIE et al., 2011). De fato, foi demonstrado que o ortólogo humano de Coq8p, *ADCK*3, possui atividade ATPase e sua estrutura revelou motivos típicos de quinases capazes de se ligarem a nucleotídeos de adenina (STEFELY et al., 2015; WHEELER; JIA, 2015).

Coq7p, Coq3p e Coq5p são algumas das proteínas sujeitas ao controle de fosforilação na biossíntese de Q_6 (XIE et al., 2011). Neste trabalho demonstramos que mutantes *coq7* também podem se beneficiar da superexpressão de *COQ8* (BUSSO et al., 2015).

Dentre os genes COQ, COQ10 e COQ11 continuam sem ter sua função totalmente elucidada. Mutantes *coq10* apresentam níveis de Q₆ idênticos aos

observados na linhagem selvagem, o que difere de outros mutantes *coq (COQ1-COQ9*) deficientes na biossíntese de Q₆ (BARROS et al., 2005). Devido a um túnel de ligação presente em sua estrutura, sugere-se que Coq10p atue como uma chaperona, necessária para a entrega da Q₆ e para a sua correta localização na cadeia respiratória (ALLAN et al., 2013; BARROS et al., 2005; BUSSO et al., 2010; CUI; KAWAMUKAI, 2009; MURAI et al., 2014).

COQ11, o último gene a ser identificado (ALLAN et al., 2015), apresenta fenótipos similares aos mutantes *coq10*: deficiência respiratória recuperável pela adição de Q₆ externa, mas síntese de Q₆ em concentrações idênticas ao observado na linhagem selvagem. É possível que Coq10p e Coq11p atuem conjuntamente na mesma função de entrega da Q₆ recém-sintetizada aos seus sítios de ação (ALLAN et al., 2015).





O elevado grau de similaridade entre mitocôndrias de levedura e de humanos promoveu o uso de *S. cerevisiae* como modelo funcional permitindo a identificação de genes nucleares envolvidos em doenças neurodegenerativas (BARRIENTOS, 2003).

Diversos autores descreveram pacientes com síndromes mitocondriais causadas por mutações nos genes *COQ2, COQ4, COQ6, COQ8* e *COQ9,* que se manifestam como doenças neurodegenerativas, cardiopatias, alterações renais, entre outras, e a patogênese das mutações encontradas nesses genes foi, em muitos casos, validada em *S. cerevisiae* (DUNCAN et al., 2009; EMMANUELE et al., 2012; FOTINO et al., 2013; GASSER et al., 2013; HEERINGA et al., 2011; LAGIER-TOURENNE et al., 2008; MONTERO et al., 2013; SALVIATI et al., 2012; SHARMA et al., 2013; QUINZII et al., 2006).

Além dos pacientes com deficiência primária de Coenzima Q, pacientes portadores de doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson e Huntington também apresentam a Coenzima Q em baixas concentrações (BOTA; DAVIES, 2001; CHINNERY, 2002; JAZWINSKI, 2005; LITARRU; TIANO, 2005), assim, a terapia através da administração de CoQ e seus análogos tem despertado o interesse de diversos pesquisadores, para a verificação de melhora na atividade bioenergética mitocondrial (LÓPEZ-LLUCH et al., 2010).

1.4 Decomposição de Redes de Correlação de Resíduos

Nosso laboratório tem como linha de pesquisa o estudo da biogênese mitocondrial, usando *S. cerevisiae* como modelo a fim de auxiliar na compreensão do papel exercido pelas mitocôndrias em doenças neurodegenerativas e no processo de envelhecimento celular (JAZWINSKI, 2005; OHLMEIER et al., 2004; WALLACE, 2005).

Uma maneira que encontramos para estudar a função das proteínas Coq está na análise de alinhamento de uma família de proteínas para identificar resíduos de aminoácidos específicos que coevoluem, a partir da análise de comunidades, formando redes de correlação e anti-correlação de resíduos (BLEICHER; LEMKE; GARRATT et al., 2011).

Na literatura, esse tipo de análise foi sugerida inicialmente, por GÖBEL e colaboradores (1994), que propuseram que dois resíduos correlacionados apresentam proximidade também na estrutura da proteína tridimensional, enquanto

Atchley e colaboradores encontraram posições que coevoluíram através de estimativas de informação mútua, definida como a medida de correlação entre dois conjuntos de eventos (ATCHLEY; TERHALLE; DRESS, 1999).

Em seguida, LOCKLESS e colaboradores (1999) sugeriram que grupos de resíduos correlacionados podem estar envolvidos na comunicação alostérica em famílias de proteínas. O arcabouço teórico desta análise utilizou a mecânica estatística de Boltzmann e foi denominado análise por acoplamento estatístico (do inglês, "*Statistical Coupling Analysis*", SCA). No mesmo trabalho, foi possível observar, através do método de perturbação (Figura 6), a correlação entre as posições dos aminoácidos comparados com todos os outros da proteína; assim, quando em um dado alinhamento, o resíduo é identificado na posição 2, pode-se observar a frequência elevada em que ocorre outro aminoácido na posição 20 (Figura 6B). Fixando esse resíduo em uma posição, são feitos subalinhamentos, que permitem verificar a frequência em que resíduos de interesse ocorrem em outra posição (Figura 6C).

Figura 6 - Método de perturbação estatística para medir acoplamentos entre posições de alinhamento de proteínas.

A: proteína hipotética contendo quatro posições *i*, *j*, *k e l*. As posições *l e k* atuam independentemente um do outro; *i e j*, cooperativamente. **B:** representação esquemática de um MSA (Alinhamento Múltiplo de Sequência, do inglês *Multiple Sequence Analysis*) de uma família de proteínas, com as frequências de seus aminoácidos indicadas nas quatro posições. Linhas horizontais representam sequências de proteínas individuais. As frequências dos aminoácidos no MSA estão indicadas. **C:** Subalinhamento resultante de um experimento de perturbação onde o sítio *i* é fixado em histidina. Adaptado de Suel e colaboradores (2003).

а



Bleicher e colaboradores (2011) observaram que é possível definir uma rede de resíduos, isto é, uma comunidade em que um conjunto de resíduos mostra fortes ligações entre si, mas não com resíduos de outras redes, sendo que a ligação entre dois resíduos implica que quando um dos aminoácidos da rede estiver em uma determinada posição, o outro tende a estar fixo em outra posição (BLEICHER; LEMKE; GARRATT, 2011).

O estudo de coevolução de resíduos de aminoácidos permitiu a Bleicher e colaboradores desenvolverem o método de Decomposição de Redes de Correlação de Resíduos (DRCN - "Decomposition of Residues Correlation Networks"), que quantifica correlações específicas através do alinhamento de múltiplas sequências geração das comunidades de resíduos correlacionados para а ou anticorrelacionados, sendo possível determinar os grupos de aminoácidos específicos que coevoluíram, e que podem ser determinantes para as propriedades dos membros de uma dada família de proteínas, e que cuja análise mutacional pode ser útil para a caracterização de uma proteína com função ainda desconhecida (BLEICHER; LEMKE; GARRATT, 2011).

O método demonstrou-se eficiente na elucidação da função de várias proteínas. A análise de Her2p (uma subunidade do complexo mitocondrial GatFAB amidotransferase), através do método DRCN, identificou oito conjuntos distintos de resíduos que coevoluíram na família. Foram obtidos mutantes em resíduos presentes nesses conjuntos de aminoácidos, através de mutagênese aleatória (realizada por uma Taq DNA polimerase com baixa atividade revisora), o que ocasionou perturbações nas funções de Her2p. A análise de DRCN mostrou o papel estrutural destes resíduos mutados, indicando que os conjuntos de redes de Her2p são relevantes para a atividade da proteína (FERREIRA-JÚNIOR; BLEICHER; BARROS, 2013).

Em relação à biossíntese de Q₆, Coq7p também foi submetida à análise por correlação de resíduos. A análise de DRCN de Coq7p, enzima monooxigenase com centro di-férrico que participa da biossíntese da Q₆ em levedura, indicou o resíduo S114 como membro de uma comunidade de aminoácidos, cuja mutação (S114E) produziu uma redução na biossíntese de Q₆, além de ser um resíduo fosforilado, que é possivelmente atraído pelo resíduo *R57*, e essa fosforilação é responsável por diminuir a produção de Q₆, sendo essa uma regulação negativa da via (BUSSO et al., 2015).

Esses resultados demonstram que o método DRCN é bem robusto para a identificação de resíduos para mutagênese e determinação da função protéica, o que o torna eficiente e aplicável na identificação de resíduos determinantes da função de Coq3p.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Descrição funcional das proteínas Coq3p e Coq7p, envolvidas na biossíntese de Q₆ em *Saccharomyces cerevisiae*, através da caracterização de mutantes de ponto.

2.2 Específicos

<u>2.2.1 COQ7</u>

 Identificar, por Decomposição de Redes de Correlação de Resíduos (DRCN), grupos de resíduos correlacionados e conservados a partir do estudo da família de Coq7p;

 Construir mutantes de COQ7 e rastrear resíduos relevantes para a função de Coq7p;

 Verificar os efeitos desses determinantes mutados sobre o crescimento respiratório;

 Verificar os níveis de Q₆ e o acúmulo de algum intermediário da sua via biossintética em linhagens mutantes COQ7.

2.2.2 COQ3

 Identificar, por Decomposição de Redes de Correlação de Resíduos (DRCN), grupos de resíduos correlacionados e conservados a partir do estudo da família de Coq3p;

 Construir mutantes de COQ3 por mutagênese sítio-dirigida, baseados na análise de correlação por de DRCN;

 Verificar os efeitos desses determinantes mutados sobre o crescimento respiratório;

 Verificar os níveis de Q₆ e o acúmulo de algum intermediário da sua via biossintética em linhagens mutantes COQ3.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Procedimentos gerais

3.1.1 Linhagens utilizadas

As linhagens de *S. cerevisiae* e *E. coli* utilizadas neste trabalho estão listadas na tabela 1.

Tabela 1 -	Linhagens	utilizadas	neste	estudo:
------------	-----------	------------	-------	---------

Linhagem	Genótipo	Referência
RR1	Δ(gpt-proA)62, leuB6, thi-1, lacY1, hsdB20, rpsL20 (Strr), ara-14, galK2, xyl-5, mtl-1, supE44, mcrB)	HANAHAN, 1983
W303-1A	MATa ade2-1 trp1-1 his3-1,15 leu2-3,112 ura3-1	ROTHSTEIN, R.
	ρ+canR	Columbia University
W3031-B	MATα ade2-1 trp1-1 his3-1,15 leu2-3,112 ura3-1	ROTHSTEIN, R.
	ρ+canR	Columbia University
W303	MATa/α ade2-1/ade2-1 trp1-1/trp1-1 his3-,15/his3-	ROTHSTEIN, R.
	1,15 Ieu2-3,112/Ieu2-3,112 ura3-1/ura3-1 ρ+canR	
W303∆COQ/TS3	MATa ade2-1 his3-1,15 leu2-3112 trp1-1 ura3-1	Este estudo
	coq/::HIS3 pCOQ//IS3 coa/2336	
W303∆COQ7/ST40	MATa ade2-1 his3-1,15 leu2-3112 trp1-1 ura3-1	Este estudo
W303ΔCOQ7/ST41	MATa ade2-1 his3-1,15 leu2-3112 trp1-1 ura3-1	Este estudo
	coq/::HIS3 pCOQ//S141 coq/*****	
W303∆COQ7/ST42	MATa ade2-1 his3-1,15 leu2-3112 trp1-1 ura3-1	Este estudo
	coq7::HIS3 pCUQ77/S142 coq7555, 5114A	
W303∆COQ7/ST43	MATa ade2-1 his3-1,15 leu2-3112 trp1-1 ura3-1	Este estudo
	coq7::HIS3 pCUQ77/S142 coq7555, 5114	
W303∆COQ7/ST51	MATa ade2-1 his3-1,15 leu2-3112 trp1-1 ura3-1	Este estudo
W303∆COQ7/ST56	MATa ade2-1 his3-1,15 leu2-3112 trp1-1 ura3-1	Este estudo
	coq7::HIS3 pCOQ7/S156 coq7/S20,520,520	
W303∆COQ7/ST59	MATa ade2-1 nIS3-1,15 leu2-3112 trp1-1 ura3-1	Este estudo
	COQ7::HIS3 pCUQ7/S159 COQ7:SM	
W303ΔCOQ3 ^{E123A}	$MATa/\alpha \ ade2-1 \ his3-1,15 \ leu2-3,112 \ trp1-1 \ ura3-1$	Este estudo
W303∆COQ3 ^{S125A}	$MATa/\alpha \ ade2-1 \ his3-1,15 \ leu2-3,112 \ trp1-1 \ ura3-1$	Este estudo
		Esta astuda
W303∆COQ3 ^{C131A}	MATa/αaae2-1 NIS3-1,15 Ieu2-3,112 trp1-1 ura3-1	Este estudo.
W303∆COQ3 ^{G1133A}	MATO/αααe2-1 NIS3-1,15 Ieu2-3,112 (Tp1-1 uTa3-1	Este estudo.
	LOUS::LEUS TEPIOLS52-COUS	
W303∆COQ3 ^{G134A}	MATU/UUUU2-1 11153-1,13 12/2-3,112 (17)-1 UIU3-1	Este estudo
	MATa (aada2, 1 bic2, 1, 15 lau2, 2, 112 tra1, 1, ura2, 1	
W303∆COQ3 ^{E138A}	MATU/UUUU2-1 11155-1,15 1202-5,112 (171-1 0105-1	Este estudo
	MATe/er ado2 1 bio2 1 15 Jour 2 2 112 ten 1 1 ura 2 1	
W303∆COQ3 ^{H165A}	1917 1918 1918 1919 1919 1919 1919 1919	Este estudo
	LUYSLLUZ ILFIULSJZ-LUUS MATa/aada2 1 bic2 1 15 lau2 2 112 tra1 1 ura2 1	
W303∆COQ3 ^{E197A}	IVIAIU/UUUU221111551,15120253,1120191101031	Este estudo.
	LUYS.LEUS TEPIULSS2-LUUS	
W303∆COQ3 ^{E200A}	IVIA I U/U UUUZ-1 11155-1,15 IUUZ-3,112 UIPI-1 UIU3-1 coa3··I EI I2 VEDlac252_COA2E200A	Este estudo
	LUYJLLUZ ILFIULJJZ-LUUJ	

W303∆Coq3 ^{H201A}	MATa/αade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 coq3::LEU3 YEPlac352-COQ3 ^{H201A}	Este estudo.
W303ΔCOQ3 ^{D203A} MATa/α ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 coq3::LEU3 YEPlac352-COQ3 ^{D203A} Este		Este estudo
W303∆COQ3 ^{E219A}	MATa/α ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 coq3::LEU2 YEPlac352-COQ3 ^{E219A}	Este estudo
W303ΔCOQ3 ^{T227A}	MATa/α ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 coq3::LEU2 YEPlac352-COQ3 ^{T227A}	Este estudo
W303∆COQ3 ^{R230A}	MATa/α ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 coq3::LEU2 YEPlac352-COQ3 ^{R230A}	Este estudo
W303∆COQ3 ^{H254A}	MATa/α a ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 coq3::LEU3 3. YEPlac352-COQ3 ^{H254A}	Este estudo
W303∆COQ3 ^{K258A}	MATa/α ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 coq3::LEU2 YEPlac352-COQ3 ^{K258A}	Este estudo
W303∆COQ3 ^{S262A}	MATa/α ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 coq3::LEU2 YEPlac352-COQ3 ^{5262A}	Este estudo

3.1.2 Meios de cultura dos microrganismos

As composições dos meios de cultura para o crescimento dos microrganismos utilizados neste trabalho estão listadas na tabela 2. Os meios foram preparados e autoclavados por 15 minutos a 120 °C para esterilização, como descrito por Sambrook e colaboradores (1989).

Para os meios sólidos adicionou-se no preparo ágar bacteriológico (2%).

Tabela 2 - Composição dos meios de cultura para o crescimento de S. cerevisiae e E. coli.

Saccharomyces cerevisiae		
Tipo de meio	Composição	
YPD	1% extrato de levedura, 2% peptona e 2% glicose.	
YPEG	1% extrato de levedura, 2% peptona, 3% glicerol e 2% etanol.	
YPGal	1% extrato de levedura, 2% peptona e 2% galactose.	
Meio mínimo com glicose (WO)	0,17% base nitrogenada, 0,5% sulfato de amônio, 2% glicose, suplementado, quando necessário, com os requerimentos auxotróficos: adenina e uracila 20 mg/L, histidina, triptofano e leucina 10 mg/L.	
Meio para esporulação (KAc)	0,5% extrato de levedura, 1% acetato de amônio e 0,05% de glicose.	
Escherichia coli		
Tipo de meio	Composição	
Luria-Bertani	1% triptona, 0,5% extrato de levedura, 0,5% NaCl e 0,1% de glicose	
Luria-Bertani com	1% triptona, 0,5% extrato de levedura, 0,5% NaCl, 0,1% de glicose, seguido da	
ampicilina (LA)	adição de ampicilina para concentração final de 100 μg/mL.	
3.1.3 Condições de cultivo dos microrganismos

Os cultivos celulares de *S. cerevisiae* e *E. coli* foram realizados, respectivamente, a 30 °C e a 37 °C, em incubadora operando sob constante agitação à 170 rpm. As diferentes linhagens de *S. cerevisiae* e *E. coli* foram armazenadas em meio YPD líquido contendo glicerol 20% e estocadas a -80 °C.

3.2 Métodos gerais para manipulação de DNA

A manipulação geral dos ácidos nucleicos, incluindo eletroforese de DNA, digestão com enzimas de restrição, ligação e purificação dos fragmentos de DNA, foi feita conforme descrito por Sambrook e colaboradores (1989).

3.2.1 Isolamento Plasmidial

O isolamento dos plasmídeos de *E. coli* em pequena escala foi feito segundo Birboim e Dolly (1979). Células bacterianas contendo o plasmídeo de interesse foram crescidas por, aproximadamente, 6 horas em meio LA sólido contendo ampicilina (100 µg/mL) e, em seguida, transferidas para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL. Foram adicionados 100 µl da solução I ou tampão de lise (glicose 50 mM, Tris-Cl 25 mM pH 7,5, EDTA 10 mM, 5 mg/mL de lisozima (Amresco®), 200 µg/mL RNase A) seguidos de 200 µl da solução II (NaOH 0,2 M e SDS 1%). A mistura foi então homogeneizada por inversão 5 vezes e após serem adicionados 150 µl da solução III (acetato de amônio 7,5 M), a amostra foi centrifugada por 16.000 x *g*, por 5 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um tubo de microcentrífuga novo, contendo 300 µl de isopropanol 100% e, em seguida, centrifugado como descrito acima. O precipitado resultante contendo o DNA plasmidial foi lavado duas vezes com etanol 80%, secado e ressuspendido em água ultrapura.

O isolamento dos plasmídeos de *E. coli* em larga escala foi feito através do método de lise com triton. Células bacterianas contendo o plasmídeo de interesse foram cultivadas em placas de meio LA sólido contendo ampicilina (100 µg/mL) e em seguida transferidas para um tubo cônico de 15 mL estéril com auxílio de uma espátula. As células foram então ressuspendidas com 2 mL de tampão de lise (sacarose 5%, Tris 50 mM pH 8,0, EDTA 0,125 M, 5 mg lisozima, 200 µg de RNAse A) e incubadas no gelo por 30 minutos. Após o período de incubação, foram adicionados 1 mL de solução 3X TET (Triton X-100 10%, EDTA 0,5 M, Tris 1 M pH

8,0), seguida de uma centrifugação por 10 minutos, a 4 °C, a 70.000 rpm em ultracentrífuga do tipo Beckman Optma TLX, com rotor TLA 120.2. O sobrenadante foi então transferido para tubos cônicos de 15 mL e após a adição de um volume de fenol saturado, a amostra foi homogeneizada e centrifugada a 1500 x g, por 5 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um tubo novo de 15 mL e então foi adicionado 1 volume de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), misturado por inversão 5 vezes e novamente centrifugado a 1500 x g, por 5 minutos, a 4 °C. O DNA presente no sobrenadante foi precipitado com a adição de 1/20 volume de NaCl 5 M e 3 volumes de álcool etílico 100%. A solução foi centrifugada por 1500 x g, por 5 minutos, a 4 °C, e o precipitado resultante (apresentando um aspecto oleoso), foi ressuspendido em 1,5 mL de acetato de amônio 2 M e 4,5 mL de etanol 100%. Após centrifugação por 1500 x g, por 5 minutos, a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 300 µl de acetato de amônio 2 M, seguidos da adição de 1 mL de etanol 100% e posterior centrifugação por 16.000 x g, por 5 minutos a temperatura ambiente. O precipitado resultante contendo o DNA plasmidial foi lavado duas vezes com etanol 80%, secado e ressuspendido em água ultrapura.

<u>3.2.2 Transformação de E. coli com DNA exógeno e preparação de bactérias</u> <u>competentes pelo método de CaCl₂</u>

As células de *E. coli* foram tornadas competentes por tratamento com solução de cloreto de cálcio, para posterior transformação com a mistura de ligação de acordo com o método de Sambrook e colaboradores (1989). Células de *E. coli* foram crescidas em 50 ml de meio LB a 37 °C sob agitação por duas horas, e em seguida centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos, a 4 °C. O precipitado foi suspenso em 10 ml da solução 10 mM CaCl₂, 10 mM Tris-Cl pH 7,5, seguido por nova centrifugação a 4000 rpm, por 10 minutos a 4 °C. O precipitado foi suspenso e incubado em 10 ml de 30 mM CaCl₂, Tris-Cl pH 7,5, por 30 minutos no gelo. As células foram centrifugadas novamente a 4000 rpm, por 10 minutos a 4 °C, e ao final, as células foram ressuspensas em 5 ml 30 mM CaCl₂, Tris-Cl pH 7,5.

A ligação foi feita utilizando 1 µl do DNA plasmidial e 2 µL do DNA com o gene de interesse, 1 µl de 10X T4 Ligase Buffer e 1 unidade da enzima T4 ligase (Promega®), incubados a temperatura ambiente por 1 hora. Foi adicionado 200 µl da suspensão de células competentes ao DNA recombinante. Após choque térmico a

42 °C por 1 minuto, adicionou-se meio LB às células, que foram incubadas a 37 °C por 40 minutos, centrifugadas e plaqueadas em meio seletivo LA, para posterior seleção dos transformantes.

3.2.3 Transformação das células de S. cerevisiae

As células de *S. cerevisiae* foram transformadas utilizando-se o método de acetato de lítio (SCHIESTL et al., 1989). Células de uma cultura em meio YPD, na fase logarítmica de crescimento, foram coletadas por centrifugação a 600 x *g*, a 21 °C por 5 minutos, e em seguida ressuspensas em solução de TEL (Tris 10 mM pH 7,5; EDTA 1 mM, acetato de lítio 0,1 M) e, em seguida, incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente na presença de 5 ul de DNA de esperma de salmão desnaturado (10 mg/mL – Sigma Aldrich) e 5 ul de DNA transformante. Após este período, as células foram ressuspensas em 0,7 mL de solução de polietilenoglicol 40% (preparado em solução de TEL), e, em seguida, incubadas por 45 minutos a temperatura ambiente, acompanhada de posterior incubação por 10 minutos a 42 °C. As células foram lavadas com 0,5 mL de tampão TE (Tris 10 mM pH 7,5; EDTA 1 mM), centrifugadas a 16.000 x *g* por 30 segundos; o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 100 µl de TE e finalmente semeadas em meio seletivo.

<u>3.2.4 Construção de mutantes COQ7 por PCR propenso a erro e por mutagênese</u> <u>sítio-dirigida e subclonagem das porções N e C-terminal</u>

O plasmídeo recombinante pG*64/72, contendo o gene COQ7, foi digerido com as enzimas Hind*III *e Nsi*I, gerando um fragmento de 1751 pb, clonado nos plasmídeos YEp352, YIp352 e pUC19 (HILL et al., 1986; YANISCH-PERRON et. al., 1985), previamente digeridos com as enzimas *Hind*III e *Pst*I, gerando os plasmídeos recombinantes pCOQ7/ST3, pCOQ7/ST4 e pCOQ7/ST5, respectivamente. O plasmídeo pCoq7/ST5 foi usado para deletar a sequência de *COQ7*, utilizando os primers 5'-ACACGGGATCCCATAATTTC-3' e 5'-TATGGCGGATCCATATACAG-3'. O produto do PCR consistindo em DNA do vetor pUC19 flanqueado por *COQ7* foi digerido com a enzima *Bg*/II e ligado a um fragmento de 1 kb plasmídeo digerido com *Bam*HI, contendo o gene *HIS3* de levedura. O fragmento contendo o alelo de coq7::HIS3 foi linearizado com *Hind*/II e *Pst*I e transformado com a linhagem W303-1A. O mutante *coq7*^{D53G} foi amplificado por mutagênese aleatória, utilizando os

primers yep351F e yep351R, descritos no ANEXO A. Foram feitas quatro reações independentes na presença de 1,5 mM MgCl₂, 30 mM MnCl₂ e 10 mM do deoxinucleotídeo limitante, e 100 mM dos outros 3 desoxinucleotídeos, gerando produtos de 2500 pb, que foram posteriormente digeridos com as enzimas de restrição EcoRI e HindIII e clonados no plasmídeo centromérico YCplac22. Os mutantes S114A, S114E, R57A e V111G foram criados por mutagênese sítiodirigida. A reação para a mutação V111G foi feita utilizando os primers yep351F e V111G (ANEXO A) e gerou o fragmento de 1432 pb, digerido com Stul e Xhol, que foi misturado ao fragmento de coq7/ST3, digerido com Stul e HindIII e ligado ao plasmídeo Ylp349, previamente digerido com Sall e HindIII. A mutação S114A e S114E foram criadas utilizando os primers yep351R e S114A, yep351R e S114E, respectivamente (ANEXO A), gerando fragmentos de 720 pb, digeridos com as enzimas de restrição Stul e HindIII, misturados com o fragmento de 1432 pb de pCoq7/ST3, previamente digerido com Stul e Xhol, ligado ao plasmídeo YIp349, previamente digerido com Sall e HindIII. O mutante R57G, criado utilizando os primers yep351R e R57 (ANEXO A), teve o fragmento de 720 pb digerido com a enzima de restrição Sphl e clonado no plasmídeo pcoq7/ST3, também digerido com Sphl. O triplo mutante S20D, S28E, T32D foi criado a partir da amplificação do pCOQ7/ST3 com os primers yep351F e S20D, S28E, T32D (ANEXO A), gerando um fragmento de 700 pb, digerido com Sphl e HindIII, clonado no plasmídeo Yip349/COQ7, construído com o segmento de 1801 pb de COQ7/IAH1, digerido com Sphl.

Utilizando-se sítios de restrição existentes no gene *COQ7*, realizou-se clonagem de fragmentos de gene contendo as porções N e C-terminal. A porção N-terminal foi clonada digerindo-se o vetor pCOQ7/ST3 com *Eco*RI e *Stu*I.A porção C-terminal foi clonada digerindo-se o mesmo vetor com *Stu*I e *Hind*III. Ambos os fragmentos foram clonados no plasmídeo YEp352. Alelos COQ7-HA expressando as versões selvagem, *ts*1, *ts*2, *ts*3 e truncada *ST*26 de Coq7p, com a cauda de hemaglutinina A (HA) foram obtidos por amplificação por PCR utilizando-se os primers 5'-GGCTAACGCCAGGGTTTTCCC-3' e 5'-GGCAAGCTTCAAGCGTAGTCT GGGACGTCGTATGGGTAAATTCTTTCGGCACTCCA-3'. O produto de PCR foi digerido com *Eco*RI e *Hin*dIII e ligado no YIp352 (Hill et al., 1986), previamente digerido com as mesmas enzimas. Os plasmídeos resultantes, contendo a fusão

COQ7-HA foram renomeados pCOQ7-HA, pCOQ7/*ts*1-HA, pCOQ7/*ts*2-HA, pCOQ7/*ts*3-HA e pCOQ7/*st*26-HA.

3.2.5 Construção dos mutantes COQ3 por mutagênese sítio-dirigida

Para identificar e caracterizar pontos cruciais envolvidos na biossíntese da Q₆ e produzir mutantes *COQ3* realizou-se mutagênese sítio-dirigida de acordo com Heckman e Pease (2007), por sobreposição de produtos de PCR (O*verlap Extension PCR*) (Figura 7).

Realizaram-se duas reações de PCR independentes com os primers descritos no Anexo B, desenhados a partir da identificação dos resíduos candidatos obtidos através do método de DRCN. Para cada reação para o gene *COQ3*, utilizou-se 20 µl de 5X Tampão de PCR GoTaq® Buffer, 1 µl de DNA, 2,5 mM de cada dNTP, 0,5 µl da enzima *Taq DNA Polymerase* (Promega®), 4,0 µl de cada par de primer específico (100 mM), obtendo-se assim um volume total de 100 µl, processados sob as seguintes condições: um ciclo de 94 °C durante 1 minuto, seguido por 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 56 °C por 1 minuto, 72 °C por 2 minutos e 30 segundos; e o ciclo final de 72 °C por 10 minutos (HECKMAN; PEASE, 2007).

A partir dessas PCRs geraram-se dois produtos para cada mutação (PCR-A e PCR-B), que foram combinados, desnaturados e pareados pelos 20 pb das extremidades, e adicionou-se a enzima Taq DNA polimerase a fim de estender as extremidades 3' na ausência de primers, durante 10 ciclos. Em seguida, foram adicionados os primers Coq3-1-new-F (5'GGC GAG CTC CAA TTT CCC AAT GGA TAC 3') e Coq3-2-old-R (5'- GGG AAG CTT TAA CTA CTT GCT CTT TAA -3'), gerando os produtos de PCR de 1784 pb, contendo a mutação inserida (Figura 7).

Os fragmentos dos mutantes *coq3*^{C131A}, *coq3*^{C133A}, *coq3*^{G134A}, *coq3*^{E138A}, coq3^{H165A}, *coq3*^{E197A}, *coq3*^{H201A}, *coq3*^{T227A}, *coq3*^{R230A}, *coq3*^{H254A}, *coq3*^{K258A} e coq3^{S262A} foram digeridos com as enzimas *Sacl* e *Hind*III, e clonados no plasmídeo integrativo YIp349, e, alternativamente, no vetor multicópia YEp352, previamente digerido com as mesmas enzimas.

Para a construção dos mutantes *coq3*^{E123A}, *coq3*^{S125A}, coq3^{E200A}, coq3^{D203A}, coq3^{E219A} após a sobreposição dos produtos de PCR, os novos fragmentos gerados (Figura 25), com 1784 pb foram recombinados através da técnica de Gap Repair (MUHLRAD, 1992), utilizando-se 400 ng de DNA e 100 ng do vetor YEp352 (HILL et al, 1985), previamente digerido com a enzima de restrição

*Bgl*II, transformados com a linhagem de levedura selvagem W303-1A de acordo com o método de Schiestl e colaboradores (1989). Os mutantes foram selecionados de acordo com a marca de auxotrofia. Neste procedimento, as extremidades dos produtos de PCR se recombinam com as extremidades do plasmídeo, não se integrando ao genoma da levedura, permitindo a seleção através de marcas de auxotrofia. Em seguida, os clones tiveram o DNA recuperado (Kit Zymo® - Yeast Plasmid Miniprep - ref. D2001) e clonados em bactéria, foram selecionados clones positivos que foram sequenciados no Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco. O resultado do sequenciamento confirmou a presença da mutação pontual produzida em cada mutante e a ausência de mutações adicionais em locais não específicos. Esses clones foram transformados com a linhagem $\Delta coq3$ para análise do efeito dessas mutações.

Figura 7 - Esquema da Mutagênese sítio-dirigida por sobreposição de produtos de PCR. (ver texto para descrição detalhada). Adaptado de: Heckman e Pease (2007).



<u>3.2.6 Sequenciamento de DNA</u>

Realizou-se o sequenciamento de DNA, a partir dos plasmídeos contendo o gene com a mutação, no Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e célulastronco (CEGH-CEL), utilizando-se o sequenciador ABI 3730 DNA Analyser, um sistema de análise de DNA de 48 capilares (Life Technologies – Applied Biosystems) e as reações de sequenciamento utilizando o BigDie Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (código 4337456). As sequências foram analisadas no software Chromas Lite 2.01 - Techenelysium Pty Ltd.

3.2.7 Isolamento de mitocôndrias de S. cerevisiae – método da zimoliase

O isolamento de mitocôndrias a partir das linhagens de S. cerevisiae foi feito segundo Faye e colaboradores (1974). Células a partir de uma cultura crescida em meio YPGal por, aproximadamente, 24 horas, foram inicialmente centrifugadas a 900 x g por 5 minutos a 4 °C, suspendidas em Sorbitol 1,2 M e novamente centrifugadas a 900 x g por 10 minutos a 4 °C. O precipitado resultante foi então pesado e, em seguida, ressuspendido em 3 mL, para cada grama de células, de tampão de digestão contendo Sorbitol 2 M, fosfato de sódio 0,5 M pH 7,5; EDTA 0,5 M, βmercaptoetanol 1%, (Merck®) e Zymoliase 1 mg/mL (de Arthobacter luteus, 20.000 U.g-1, MP Biomedicals®). A suspensão resultante foi então incubada com moderada agitação orbital (50 rpm), a 37 °C, por 2 horas. Durante esta etapa, ocorreu a digestão da parede celular fúngica e, consequentemente, a geração dos esferoplastos. Ao término do período de incubação, a reação de digestão foi interrompida através da incubação das amostras no gelo. Os esferoplastos foram então lavados com Sorbitol 1,2 M e em seguida centrifugados a 4600 x q, por 10 minutos a 4 °C. O processo foi repetido. O precipitado resultante foi ressuspendido em tampão Sorbitol 0,6 M, Tris-Cl 10 mM pH 7,5; EDTA 1 mM, na presença de PMSF 100 mM, como inibidor de protease, utilizando-se o mesmo volume empregado na reação de digestão.

A suspensão de esferoplastos foi então submetida a duas etapas de agitação mecânica: uma agitação suave, através de um homogeneizador do tipo *potter*, por aproximadamente 1 minuto, e outra mais forte, com auxílio de um agitador mecânico, durante 40 segundos. Após centrifugação por 1500 x *g*, por 5 minutos, a 4 °C, o sobrenadante foi transferido para tubos cônicos de centrífuga previamente

gelados e em seguida submetido a centrifugação à 18000 x *g*, por 10 minutos, a 4 °C. O precipitado resultante, representando a fração mitocondrial, foi ressuspendido em 2 mL de tampão Sorbitol 0,6 M, Tris-Cl 10 mM pH 7,5; EDTA 1 mM e novamente centrifugado à 18000 x *g*, por 10 min, a 4 °C. Este processo foi repetido mais 3 vezes. A fração mitocondrial foi ressuspendida em 500 µL de tampão Sorbitol 0,6 M, Tris-Cl 10 mM pH 7,5; EDTA 1 mM e novamente 0,6 M, Tris-Cl 10 mM pH 7,5; EDTA 1 mM, e a quantificação de proteínas se deu pelo método de Lowry (LOWRY, 1959).

<u>3.2.8 Análise das proteínas mitocondriais: eletroforese em gel de poliacrilamida em</u> condição desnaturante (SDS-PAGE) seguido de western blot

As análises eletroforéticas de proteínas mitocondriais em gel de poliacrilamida em condição desnaturante foram feitas como descrito por Laemmli (1970), usando o sistema de minigéis. A porcentagem de acrilamida dos géis de separação e de empilhamento foram 12% e 6%, respectivamente, e a composição dos géis é descrita na Tabela 3.

Soluções	Gel de Empilhamento	Gel de Separação
1 M Tris-HCl pH 8.8	-	1,25 ml
3 M Tris-HCl pH 6.8	5, 625 ml	-
Acrilamida:bis-acrilamida 30:0.8	18 mL	2 ml
Persulfato de Amônio 10% (p/v)	0,21 μL	0,05 μL
SDS 10%	045 ml	0,1 ml
TEMED 100%	37,5 μL	15 μL
Água	17,7 mL	6,6 mL

Tabela 3 - Composição dos géis de separação e de empilhamento utilizados nas análises por SDS-PAGE.

Antes de serem analisadas por SDS-PAGE, as amostras de proteínas mitocondriais (200 µg), foram misturadas com 12,5 µL de tampão 4xL (2 mL de Tris-Cl 1M pH 6,8, 4mL de SDS 10%, 4 mL de glicerol, 0,4 mL de mercaptoetanol 0,01% de azul de bromofenol), 1 µL de PMSF 100 mM e água para um volume final de 50 µL.

As eletroforeses foram realizadas a 160 V em tampão 1X ETB (Tris 3,03%; glicina 14,4%; SDS 1%). Após a corrida eletroforética, as proteínas mitocondriais foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose utilizando o sistema de transferência semisseco (Thermo-Fischer®). O processo de transferência consistiu em colocar o gel de poliacrilamida em contato com membrana de nitrocelulose

envoltos com duas folhas de papel absorvente, todos umedecidos em solução de WTB (glicina 1,437%, Tris 0,3%; metanol 20%). A transferência foi realizada em 100 mA por 1 hora e 15 minutos. Após este período, a membrana de nitrocelulose foi corada com solução Ponceau (Ponceau 0,2%, ácido tricloroacético 3%, ácido sulfossalicílico 3%), a fim de comprovar a eficiência do processo de transferência e evidenciar as bandas do padrão de peso molecular.

Posteriormente, a membrana foi bloqueada com solução de leite desnatado 5% durante 1 hora, seguida de incubação com o anticorpo primário (1:1000) por um período de 1 hora. A membrana foi então lavada três vezes com solução de NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM, Triton 0,1%, por um período de 10 minutos e em seguida incubada com o anticorpo secundário (1:5000), durante uma hora. Por fim, a membrana foi novamente lavada 3 vezes com solução de NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM, Triton 0,1%, por um período de 10 minutos. Os complexos antígeno-anticorpo foram visualizados através da exposição da membrana em um filme de raio-X, após lavagem da mesma com 5 ul de Peróxido de Hidrogênio (Sigma-Aldrich®), 5 mL da Solução 1 (5 ml Tris-HCl pH 8,5; 500 µl Luminol; 220 µl Ácido Cumárico) e Solução 2 (5 ml 1 M Tris –HCl pH 8,5; 30 µl Peróxido de Hidrogênio – Sigma-Aldrich®).

3.2.9 Extração e análise lipídica

O extrato mitocondrial foi utilizado para a purificação lipídica da Q₆, utilizando 2 mg de proteína total, suspensa em 40 µL de 10 mM HEPES pH 7,5, vortexada na presença de glass beads, no mesmo volume, por 2 minutos. Os lipídeos foram extraídos utilizando 600 µL de metanol e 400 µL de hexano, em um shaker a 4 °C, por 18 horas. O extrato foi centrifugado a 900 g por 10 minutos, a fase orgânica foi coletada e seca com vapor de N₂. O restante das células foi incubado novamente com 400 µL de hexano por mais 6 horas, centrifugado como anteriormente e seco com vapor de N₂, em seguida foi suspenso em 100 µL de metanol. 30 µL de cada extrato foi analisado por HPLC (Shimadzu® – UFLC – CMB20A/LC-20AT/ CTO-20A) em uma coluna C18 (Shimpack® VP-ODS 150Lx4.6 - Shimadzu®), utilizando como fase móvel metanol e água, na proporção de 98:2. A concentração de Q₄ e Q₆ foi determinada utilizando 5 µM da preparação comercial de cada composto. Para a validação dos dados estatísticos, as mitocôndrias de cada linhagem foram extraídas 2 vezes, e a extração lipídica foi realizada também duas vezes, para cada extrato mitocondrial.

3.3 Decomposição de Redes de Correlação de Aminoácidos (DRCN)

Analisou-se o alinhamento de múltiplas sequências através do software PFstats, desenvolvido por Bleicher e colaboradores (2011). O PFstats realizou quatro etapas de processamento/análise, que identificaram os resíduos conservados e os acoplados que formam comunidades.

3.3.1 Filtragem e análise de Resíduos conservados

A partir da estrutura primária da proteína, depositada no banco de dados *Saccharomyces Genome Database* - SGD (www.yeastgenome.org), obteve-se um alinhamento no PFAM (FINN et al., 2016), que foi filtrado através do software PFstats, para eliminação de sequências proteicas muito similares ou sequências menores que o padrão do alinhamento. Para isto realizaram-se três cortes:

1) Cobertura mínima de alinhamento: comparou-se cada sequência com a sequência da proteína de interesse e removeram-se sequências com menos de 80% dos resíduos alinhados; com isso sequências fragmentadas foram eliminadas bem como sequências com tamanho superior ao da proteína de interesse.

2) Remoção de sequências com baixa identidade: com o alinhamento processado na etapa anterior, realizou-se outra filtragem onde se removeu as sequências com identidade inferior a 15% (quando comparados à sequência do alinhamento).

3) Remoção de sequências similares: por último, comparou-se cada sequência com todas as outras, e eliminaram-se as sequências que eram 90% semelhantes entre si, ou seja, duas sequências muito parecidas eram comparadas e a de menor comprimento era eliminada.

Em seguida, foi avaliada a perturbação estatística dos aminoácidos, onde um determinado aminoácido foi fixado em um dado resíduo e foram observadas as alterações de distribuição nas demais posições, sendo possível analisar a frequência de um dado aminoácido em uma dada posição. Na correlação, a análise de cada nó é um par de posicionamento de resíduo, por exemplo, o resíduo D25, e cada conexão corresponde à magnitude da correlação entre os dois pares de resíduo nessa posição (BLEICHER; LEMKE; GARRATT, 2011).

Para a família de Coq7p, 802 sequências homólogas a Coq7p presentes na família PF03232 (família de Coq7p) foram alinhadas e filtradas de forma a manter o alinhamento com 80% das sequências de Coq7p, com um mínimo de 15% de

identidade, além de serem excluídas sequências com mais de 90% de identidade, utilizando o servidor MUSCLE. O alinhamento final resultou em 363 sequências utilizadas para a decomposição de redes de correlação para encontrar sub-classes correlacionadas na família Coq7p (BLEICHER LEMKE; GARRATT, 2011).

Para a análise de Coq3p, foram utilizadas sequências da Família PF13489 (Família de Coq3p), alinhadas, obtidas diretamente do banco de dados PFAM (FINN et al., 2016), e após a aplicação dos filtros, restaram 7406 sequências, que permitiram a identificação de diferentes resíduos conservados entre espécies, utilizando como filtro a conservação acima de 80%.

3.3.2 Matrizes de autocorrelação e detecção de comunidades

Após o experimento de perturbação estatística são geradas matrizes de autocorrelação, a partir do PFstats, com o score de correlação entre as posições de resíduos, onde representam-se somente os resíduos mais fortemente acoplados. Os resíduos obtidos na matriz de autocorrelação foram submetidos ao algoritmo de Newman (NEWMAN; GIRVAN, 2004), onde são geradas redes de contato e os componentes conectados na rede são denominados comunidades (Tabelas 6 a 8). As comunidades são subconjuntos de resíduos acoplados.

3.4 Modelagem molecular de Coq3p

A proteína Coq3p ainda não possui estrutura cristalográfica resolvida, e a fim de facilitar a visualização dos resíduos correlacionados e conservados, realizou-se sua modelagem molecular em três servidores independentes, utilizando a configuração padrão: Robetta (KIM; CHIVIAN; BAKER, 2004), Phyre2 (KELLEY; STERNBERG, 2009; KELLEY et al., 2015), e I-TASSER (ZHANG,2008). O programa do servidor Phyre2 realiza a modelagem por homologia, ou seja, baseia-se na estrutura tridimensional de proteínas homólogas; o I-TASSER é um servidor que realiza modelagem por *threading*, onde cada aminoácido da sequência a ser modelada é alinhado a uma estrutura molde; o Robetta realiza modelagem por métodos *ab initio*, assim constrói modelos baseados nas propriedades físicas dos aminoácidos partindo de uma estratégia que não se restringe a moldes pré-estabelecidos.

A qualidade das estruturas tridimensionais dos modelos de Coq3p obtidos foi validada através da análise pelo Diagrama de Ramachandran (Tabela 9), que permite a visualização de todas as combinações possíveis de ângulos diédricos Ψ

(psi) versus Φ (phi) nos aminoácidos de um polipeptídio, e que contribuem para a conformação da proteína. Além disso, foi realizada a segunda validação dos modelos, através do programa Verify3D (Tabela 10) (LÜTHY; BOWIE; EISENBERG, 1992), que estabelece um *score* total relacionado à qualidade do modelo e avalia a compatibilidade entre a estrutura tridimensional de uma proteína e a sua própria sequência de aminoácidos. A partir desses dados determinou-se que o modelo mais adequado foi gerado pelo servidor Robetta, e as figuras foram geradas pelo programa PyMol (https://www.pymol.org/) (DELANO, 2002).

Para Coq7p, foi utilizada a sequência primária Coq7p, obtida do banco de dados *Saccharomyces Genome Database* – SGD (www.yeastgenome.org) sem os 23 aminoácidos que fazem a sinalização mitocondrial, determinados através do MITOPROT (CLAROS; VINCENS, 1996) e a modelagem molecular foi realizada através do servidor I-Tasser.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO PARCIAL

4.1. COQ7

4.1.1 Alinhamento e análise de resíduos conservados de Coq7p

A proteína Coq7p, localizada na matriz da membrana mitocondrial interna, pertence à família PF03232 (FINN et al., 2016), e faz parte do complexo proteico para a biossíntese de Q₆.

Estudos baseados em predições estruturais sugerem que Coq7p seja uma proteína com dois centros de ferro com íons carboxilato, responsável pela hidroxilação da demetoxi-Q a dimetil-Q (MARBOIS; CLARKE, 1996; STENMARK et al., 2001; TRAN et al., 2006). A modelagem molecular de Coq7p e outras proteínas com coordenação dupla de ferro carboxilados indicam a presença de quatro hélices com um motivo de coordenação dos átomos de ferro do tipo E X_{n1} EXXH X_{n2} E X_{n3} EXXH (STENMARK et al., 2001).

Foram analisadas 806 sequências de proteínas homólogas a Coq7p de levedura. A fim de demonstrar simplificadamente a conservação de Coq7p entre algumas espécies, a figura 8 mostra o alinhamento de Coq7p de Saccharomyces cerevisiae, com seus ortólogos em Drosophila melanogaster e Homo sapiens, produzido no programa Clustal Omega.

Figura 8 - Alinhamento da sequência de aminoácidos presentes em Coq7p.

As sequências foram obtidas do banco de dados UniProt (http://www.uniprot.org/). As sequências de aminoácidos de Coq7p de Saccharomyces cerevisiae, Drosophila melanogaster e Homo sapiens foram alinhadas usando o programa Clustal Omega (SIEVERS et al., 2011) e apresentado conforme o BoxShade Server (https://embnet.vital-it.ch/software/BOX_form.html). Os boxes apresentados em preto são resíduos conservados entre as três espécies, enquanto os boxes apresentados na cor cinza são conservados, porém, apresentam variação em uma das espécies. * = resíduos mutados neste estudo (S20, S28,T32, D53, R57, V111 e S114).

			*	* *	* _ *
S.	cerevisiae	MLSRVSVFKPASRGF	SVLSSLKITEHI	SAKHTEKPEHAP	KCQNLSDAQA <mark>A</mark> FL <mark>D</mark> RVIR
H.	sapiens				MTLDNISRAAVDRIIR
D.	melanogaster	NGMLR-RGLSRPEPRLI	SKRYLSSATGGG	GSAGTTEGGSS	ETTP <mark>L</mark> RPRPN <mark>A</mark> LT <mark>D</mark> EIIR

S.	cerevisiae	58	VDQAGELGADYIYAGQYFVLAHRYPHLKPVLKHIWDQEIHHHNTENNLQLKRRVRPSLLT
H.	sapiens	17	VDHAGEYGANRIYAGQMAVLGRTSVGPVIQKMWDQEKDHLKKENELMVTFRVRPTVLM
D.	melanogaster	58	VDHAGELGADRIYAGQMAILGNGPLGKTIGHMWEQEKEHRKQEQLIQQHRVRPTIMT

S.	cerevisiae	118	PLWKAGAFAMGAGTALLSPEAAMACTEAVETVIGGHYNGQLRN ANQFNLERTDGTKGPS
Η.	sapiens	75	PLWNVLGFALGAGTALLGKEGAMACTVAVEESIAHHYNNQIRTLMEEDP
D.	melanogaster	116	PIWNVAGFVLGAGTALMGEKAAMACTVAVETVIVEHYNDQLRQIMEAP

S.	cerevisiae	178	EEIKSLTSTIQQFRDDEL <mark>EH</mark> LDTAIKHDSYMAVPYTVITEGIKTICRVAIWSAERI
H.	sapiens	124	EKYEELLQLIKKFRDEELEHHDIGLDHDAELAPAYAVLKSIIQAGCRVAIYLSERL
D .	melanogaster	164	NPDKELLATITKFRDEEQEHHDTGIDHGAEQAPFYQAMTEVIKFGCKTAIAISKKI

4.1.2 Propriedades dos mutantes de Coq7

A deleção completa de COQ7 em S. cerevisiae induz uma deficiência no crescimento da levedura em fonte de carbono não fermentável contendo etanol e glicerol (YPEG), indicando o papel principal deste gene na atividade respiratória mitocondrial, e assim como em outros mutantes coq, a adição de Q₂ sintética às mitocôndrias isoladas de mutantes coq7 restaura o consumo de O2 em ensaios respiratórios que seguem a oxidação de NADH (MARBOIS; CLARKE, 1996, TZAGOLOFF; DIECKMANN, 1990).

A fim de gerar novas informações sobre resíduos relevantes para a estabilidade e função de Coq7p, foi realizada mutagênese aleatória do gene COQ7 por PCR propenso a erro, conforme descrito na sessão de métodos. Assim foi construída uma biblioteca, a partir das reações de PCR clonadas em plasmídeo, com cerca de 1000 transformantes, que tiveram o DNA recuperado e utilizado para transformar o mutante nulo cog7. As colônias de leveduras obtidas nessa transformação foram replicadas em meio etanol-glicerol a 30 °C e a 37 °C, e assim buscou-se colônias que cresciam à temperatura permissiva (30 °C) e deixavam de se desenvolver na temperatura não permissiva (37 °C) caracterizando um fenótipo ts. Dessa maneira foram isolados os mutantes cog7-ts1, cog7-ts2, cog7-ts3 e cog7ts4 (Figura 9).



Figura 9 - Propriedade de crescimento mutantes coq7-ts.

Crescimento da linhagem selvagem (W303) do mutante nulo de coq7 (coq7) e dos mutantes ts coq7/ts1, coq7/ts2, coq7/ts3 e coq7/ts4 em meio rico contendo glicose como fonte de carbono (YPD) ou em fonte de carbono não fermentável (YPEG) incubados na temperatura permissiva (30 °C) e não Os plasmídeos presentes nos mutantes *ts* foram recuperados das respectivas linhagens e sequenciados. Ambos alelos *coq7/ts1* e *coq7/ts2*, cujas linhagens apresentaram o fenótipo *ts* mais claramente (Figura 9), apresentaram mutação *nonsense* Q106Stop. O posicionamento de um códon de parada na posição 106 seria algo extremamente interessante, pois mostraria que Coq7p manteria-se parcialmente funcional mesmo na ausência do seu centro catalítico de coordenação dos átomos de ferro nas posições E63, E95, H98, E194, H197.

Dessa forma, os mutantes *ts1* e *ts2* possuem um códon de parada interrompendo a sequência de leitura entre resíduos críticos para a função. A fim de verificar se somente a porção N-terminal seria suficiente para a função de Coq7p realizou-se duas sub-clonagens que geraram os recombinantes ST23, que manteve a porção N-terminal, e ST26, cuja sequência se inicia a partir da posição 52 da proteína selvagem (Figura 10A). Curiosamente, a construção ST23 foi incapaz de complementar a deficiência respiratória do mutante *coq7*, enquanto ST26 restaurou o fenótipo *ts*. Esse resultado indica que a expressão somente da porção N-terminal de Coq7p é insuficiente para sua função, contrariando a hipótese que Coq7p manteria-se parcialmente funcional na ausência de parte do seu centro catalítico de coordenação nos alelos expressando a mutação Q106Stop.

Investigou-se também se as variantes alélicas geradas nesse estudo resultavam em proteínas maduras estáveis. A partir da adição de um epítopo de HA na porção C-terminal de Coq7p, pode-se verificar a expressão de Coq7p com tamanho esperado em todos os mutantes testados. Em todos eles com tamanho próximo a proteína madura, independentemente da presença da mutação Q106Stop (Figura 10B).

Figura 10 - Sub-clonagens de COQ7 e testes de complementação.

A) Os diagramas representam as sub-clonagens realizadas na geração dos alelos ST23 e ST26. Os sítios de restrição para *EcoRI*, *SphI*, *StuI* e *HindIII* utilizados nas clonagens estão indicados. No teste de crescimento a linhagem parental (W303-1A) o mutante nulo *coq7* e os mutantes ST23 (coq7/ST23) e ST26 (coq7/ST26) foram diluídas seriadamente e colocadas para crescimento em meio rico contendo glicose (YPD) e meio seletivo para a atividade respiratória (YPEG) na temperatura permissiva (30 °C) e não permissiva (37 °C). As placas foram fotografadas após três dias de crescimento. B) Análise da expressão dos mutantes *coq7*. Proteínas mitocondriais foram isoladas da linhagem parental (WT) do mutante nulo *coq7* transformado com o gene *COQ7-HA* fusionado com o epítopo HA dos alelos *ts1*, *ts2*, *ts3* e *ST26* também fusionados com HA. Após eletroforese em gel SDS-12% acrilamida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e imunodecoradas com anticorpo anti-HA, seguida com reação secundária de IgG de coelho e reação quimiluminescente de detecção com luminol e ácido cumárico.



A ausência de complementação do mutante *coq7* por ST23 aliada à presença de uma banda, embora que ainda menos intensa em *ts1* e *ts2*, com tamanho praticamente idêntico ao controle Coq7-HA, sugere fortemente que o códon de parada gerado na posição 106 não está sendo totalmente seguido. Supressões de mutações *nonsense* são particularmente comuns em mutantes *sup35* ou partir da ação da sua forma prion [PSI⁺], que por sua vez deixa de agir a 37 °C (GESTELAND

et al., 1976). Portanto, essa talvez seja a melhor explicação para o fenótipo *ts* encontrado em *ts1*, *ts2* e *ST26*, pois a inativação do fator [PSI⁺] a 37 °C impediria a supressão do códon de parada com o restabelecimento de Sup35p funcional.

Já os alelos coq7/ts3 e coq7/ts4, cujo fenótipo *ts* não ficou bem caracterizado no ensaio por diluição seriada (Figura 9), apresentam crescimento muito próximo ao da linhagem referência mesmo na temperatura não permissiva, além disso, apresentam duas mutações de ponto: D53G no *ts3* e P39H no *ts4*. A mutação D53G presente em coq7/ts3, todavia, estimulou estudos posteriores conforme será detalhado mais à frente.

Como não se obteve um conjunto alto de mutantes *coq7* por mutagênese aleatória que permitissem um estudo funcional mais aprofundado, optou-se por empregar a técnica de Decomposição de Redes de Correlação de Aminoácidos, (DRCN) desenvolvida pelo professor Lucas Bleicher da UFMG (BLEICHER LEMKE; GARRATT, 2011), para localizar outros resíduos potenciais realizar mutagênese sítio-dirigida. Assim, Coq7p foi subdividido em conjuntos de aminoácidos que apresentam coevolução a partir da decomposição de redes de correlação dos seus resíduos. A rede de decomposição pode ser útil na compreensão da evolução de uma proteína e na integração funcional de resíduos que podem ser alvo para mutagênese.

A partir da análise do alinhamento contendo 806 sequências da família PFAM F03232 (FINN et al., 2016), foram identificadas quatro redes de resíduos que tendem a aparecer simultaneamente na família F03232 (Figura 11). Coq7p possui apenas os resíduos dos grupos 1 e 2, destacados em azul e vermelho, respectivamente.

Figura 11 - Redes de decomposição de resíduos de Coq7p.

Redes de decomposição de resíduos de Coq7p. Em azul os 20 resíduos do grupo 1; em vermelho a rede de 14 resíduos do grupo 2; em amarelo 4 resíduos do grupo 3, e em cinza a dupla D12-R33, membros do grupo 4.



Deve-se registrar que as sequências contendo resíduos dos grupos 1 e 2 tendem a não ter os resíduos do grupo 3 e vice-versa (Figura 12), o que deve indicar uma conservação diferencial desses resíduos, originária de pressões seletivas distintas nas proteínas das diferentes espécies presentes na família.

Figura 12- Rede de aderência de resíduos dentro das comunidades.

A rede de aderência demonstra as comunidades presentes em Coq7p. É possível observar que quando os membros da comunidade 1 e 2 ocorrem, a proteína não possui as comunidades 3 e 4, e vice-versa.



O primeiro grupo contém vinte resíduos, com conservação entre 46 a 69% dos homólogos de Coq7p, a maioria deles se localiza na hélice 3 ou interage diretamente com ela (Figura 13C). O segundo grupo contém 14 resíduos nas hélices 2, 3 e 4 com

conservação de 45 a 55% (Figura 13D). O terceiro grupo é de apenas 4 resíduos periféricos ao centro da proteína (Figura. 13E), e o quarto grupo diz respeito a 47% das sequências que contém uma dupla de resíduos nas posições 12 e 33 (Figura 13F).

Figura 13 - Modelo de Coq7p e grupos de correlação de resíduos na família Coq7p.

A) Coq7p com centro de bi-ferro (em amarelo) e resíduos mutagenizados (em verde). B) Os resíduos participantes do centro bi-ferro e sua localização nas hélices. C) Grupo 1 de correlação encontrado em eucariotos (superfície vermelha). D) Grupo 2 também presente em eucariotos, exceto trypanosomatideos (superfície azul). E) Grupo 3 presente em procariotos (superfície amarela). F) Grupo 4 também de procariotos consistindo somente dois resíduos (superfície roxa).



Em nosso modelo é possível observar que o resíduo D53 está longe do centro di-férrico de Coq7p, e, portanto, para explicar o defeito de crescimento observado no mutante D53G, avaliamos outros resíduos da proteína que pudessem ser necessários para a estabilidade térmica do mutante D53G: V111 e S114, pertencentes ao grupo 1 e 2, respectivamente.

O resíduo V111 chamou atenção pela proximidade espacial com D53 (Figura 14), assim é possível supor que D53 está em choque estérico com o resíduo V111, membro da comunidade 1, impondo alguma restrição de mobilidade na proteína, o que também poderia explicar o fenótipo observado no mutante V111G, similar ao efeito causado pela mutação D53G, quando Coq8p é superexpressa.

Figura 14 - Modelo em detalhe da hélice 2 (H2) de Coq7p.

Detalhe da regiões próximas ao resíduo D53, localizado em uma porção de Coq7p que apresenta instabilidade térmica no mutante D53G. Superfícies vermelhas indicam resíduos do grupo 1.



A atração entre D53 e V111 possivelmente diminui a carga positiva que atrairia o resíduo S114 (Figura 14), um resíduo da comunidade 2 com alto potencial de fosforilação (score 0.874) predita pelo programa NetPhos.

Supomos que a fosforilação de S114 permita o deslocamento da pequena hélice que se encontra entre as hélices 2 e 3; uma vez que S114 tem uma carga negativa que seria atraída pela cadeia lateral carregada positivamente de R57, retirando a pressão no resíduo A61, membro da comunidade 1, o que levaria ao mal posicionamento de E63, que coordena o íon ferro, reduzindo assim a atividade catalítica (Figura 15).

Figura 15 – Estrutura de Coq7p – Interação entre os resíduos próximos ao centro di-férrico.

No painel A, é possível observar na estrura a região próxima ao centro di-férrico. Supõe-se que, quando fosforilada, a cadeia lateral de S114, carregada negativamente, atraia a carga positiva de R57. S114 está localizada em uma alça com resíduos hidrofóbicos, e próxima ao resíduo W120, presente em uma pequena hélice, que ao se deslocar pela atração entre S114 e R57, deixa de exercer pressão sobre o resíduo A61, membro da comunidade 1. No painel B, é possível observar que quando a interação desloca a pequena hélice localizada na alça que liga as hélices 2 e 3, a pressão em A61 reduz drasticamente, afetando a atividade de Coq7p, uma vez que A61 está localizado a ½ volta de hélice do resíduo E63, que coordena o centro de catálise do íon ferro.



A proximidade espacial entre esses resíduos motivou a criação das mutações sítio-dirigidas R57A, V111G, S114A e do fosfomimético S114E, construído para simular a proteína constantemente fosforilada e a possível interação com o resíduo R57, tornando Coq7p estável, independente do mecanismo regulatório. Um duplo mutante S114A, V111G também foi gerado a fim de estudar uma possível itensificação fenotípica.

De fato, enquanto os mutantes D53G e S114A apresentam um leve decréscimo de crescimento na temperatura permissiva, o duplo mutante S114A, V111G apresenta deficiência de crescimento em meio de cultura contendo fonte de carbono não fermentável a 37 °C. Diferentemente dos demais mutantes, o mutante S114E apresenta deficiência respiratória também a 30 °C (Figura 16). Como o fosfomimético S114E apresentou clara deficiência de crescimento, investigou-se se outros resíduos anteriormente indicados como únicos pontos de fosforilação de Coq7p (MARTIN-MONTALVO et al., 2011) também apresentariam deficiência respiratória. Assim, foi construído o triplo mutante S20D, S28E, T32D, aqui nomeado ST56.

Em estudos anteriores do nosso grupo, observou-se o efeito benéfico da superexpressão de *COQ8* no restauro da capacidade respiratória de alguns mutantes *coq* (BARROS et al., 2005; BUSSO et al., 2010, ZAMPOL et al., 2010). De fato, mutantes *coq7* também podem se beneficiar do excesso de Coq8p (HE et al., 2015) e Coq3p, Coq5p, Coq7p seriam alvos da fosforilação durante a biossíntese da Q₆, provavelmente catalisada por Coq8p (GONZALEZ-MARISCAL, et al., 2014). Assim, transformou-se os mutantes coq7 gerados neste estudo com vetores que superexpressam *COQ8* (Figura 16). Dentre os mutantes testados, a variante contendo a mutação S114E foi a que mais claramente se beneficiou pela transformação com *COQ8*. Curiosamente, o mesmo efeito positivo não se reproduziu no duplo mutante S114A, V111G (Figura 16).

Figura 16- Avaliação do crescimento respiratório de mutantes *COQ7*, por diluições seriadas. Crescimento das linhagens contendo as mutações aleatórias (D53G) e sítio-dirigidas (V111G, S114A, S114E, R57A, ∆coq7/st56 -S20D,S28E,T32D), combinadas entre si (duplo mutante) ou sozinhas, e transformadas com o plasmídeo superexpressando Coq8p, crescidas em meio YPD ou meio YPEG, à temperatura permissiva (30 °C) e não-permissiva (37 °C).



Como a função de Coq7p depende de Coq9p (LOHMAN et al., 2014) e a regulação do seu estado de fosforilação depende da fosfatase Ptc7p (MARTIN-MONTALVO et al., 2011), testou-se se a superexpressão desses genes também teriam algum efeito benéfico sobre o mutante coq7 S114E (Figura 17). Entretanto, nota-se que somente a superexpressão de *COQ8* resulta na parcial recuperação da capacidade de crescimento de S114E em meio seletivo para a atividade respiratória.

Figura 17 - Teste comparativo de crescimento do mutante coq7/S114E.

A linhagem parental de referência (W303) e os mutantes coq7/S114E superexpressando os genes indicados (+COQ8, +COQ9, +PTC7) foram diluídos em série e postos para crescimento a temperatura permissiva (30°C), em meio rico contendo glicose (YPD) e meio rico contendo etanol-glicerol (YPEG). As placas foram fotografadas após 2 dias.



4.1.3 Análise da expressão de Coq7p

Após a identificação da mutação S114E e do duplo mutante S114A, V111G como deletérios ao crescimento em meio seletivo para atividade respiratória, investigou-se se esses mutantes geravam produtos estáveis e se alteravam a estabilidade de outros compontentes do complexo multi-enzimático responsável pela síntese de Q₆. Esses ensaios foram realizados também nos respectivos mutantes superexpressando *COQ8*. Cultura de células das linhagens de interesse foram crescidas em meio YPGal tanto na temperatura permissiva (30 °C) como na não-permissiva (37 °C). As culturas foram centrifugadas e seguiu-se o isolamento de suas mitocôndrias para avaliação em SDS-PAGE (Figura 18). Western blot das membranas foi realizado com anticorpos anti-Coq3, anti-Coq4 e anti-Coq7 gentilmente cedidos pela Dra. Catherine Clarke (UCLA); como controle de carregamento utilizou-se anti-Porin (Invitrogen®). Sabendo-se que na ausência de um dos componentes *coq*, o complexo se desestabiliza (GONZALEZ-MARISCAL et al., 2014; TRAN; CLARKE, 2007), os anticorpos para Coq3p e Coq4p foram

utilizados a fim de a verificar a estabilidade do complexo proteico, formado durante a síntese de Q₆.

Enquanto Coq7p mostrou-se, a 37 °C, presente nos extratos mitocondriais da linhagem parental com uma banda majoritária e uma segunda banda com migração um pouco mais lenta, os mutantes coq7 apresentaram grande variação na disposição de bandeamento de Coq7p em até três bandas (Figura 18). A natureza das bandas adicionais ainda é desconhecida e precisa ser investigada, sendo possível se tratarem de Coq7p sob diferentes estados de fosforilação. Numa exposição mais longa ao filme de raio X, observa-se que tanto Coq4p como Coq3p não sofrem alterações significativas entre os mutantes Coq7p a 37 °C, exceto no mutante S114E. Corroborando o efeito benéfico do excesso de Coq8p, nota-se a recuperação dos níveis de Coq3p e Coq4p no mutante S114E superexpressando COQ8. O maior efeito estabilizador de Coq8p sobre o complexo biossintético da CoQ vem sendo demonstrado em diferentes trabalhos (XIE et al., 2012; ZAMPOL et al., 2011). Numa exposição mais curta, nota-se que há menos das duas proteínas nos mutantes cog7 a 37 °C, em comparação ao encontrado nos extratos proteicos mitocondriais isolados a 30 °C, principalmente nos mutantes S114E, e S114A-V111G.

Figura 18 - Avaliação dos níveis de expressão proteica em mutantes coq7.

Extratos proteicos mitocondriais, obtidos de culturas da linhagem parental de referência (WT) e dos mutantes coq7 (S114A; S114A, V111G; S114E) superexpressando *COQ8* (+*COQ8*), foram separados em gel de 12% poliacrilamida-SDS, transferidos para membrana de nitrocelulose e imunodecorados com os anticorpos anti-Coq7, anti-Coq3, anti-Coq4 e anti-Porin e, sequencialmente reagiram com anticorpo secundário anti-camundongo (Porin) e anti-coelho. Após reação de quimiluminescência realizada na presença de luminol, ácido cumárico e peróxido de hidrogênio, filmes de raio X foram expostos à membrana. Painel à esquerda com extrato proteico obtido de mitocôndrias isoladas a 37 °C , na presença ou ausência de *COQ8*. Painel à direita com extrato proteico obtido de mitocôndrias



4.1.4 Avaliação dos níveis endógenos de Q₆ em mutantes coq7

Os diferentes mutantes *coq7* foram utilizados para quantificação do conteúdo de Q₆ produzido em suas mitocôndrias, e também para a possível verificação do acúmulo de DMQ₆, que é substrato de Coq7p (Tabela 4). Culturas celulares das diferentes linhagens foram crescidas em meio rico com galactose, à temperatura permissiva (30 °C) e não-permissiva (37 °C) (Figura 19).

Figura 19 - Cromatogramas para a detecção de Q₆ e seus intermediários em mutantes coq7.

Extratos lipídicos mitocondriais da linhagem parental (W303) e dela superexpressando *COQ8* (W303 + *COQ8*) foram comparadas com o mutante nulo de *coq7* sozinho, ou contendo os alelos mutantes indicados na figura, que reflete somente alguns cromatogramas realizados a partir de material crescido na temperatura não permissiva (37 °C) e escolhidos como representativos desses ensaios. O último cromatograma foi obtido a partir da injeção de 5mg de Q₆ pura para definição do seu tempo de migração na cromatografia.



Um pico que, provavelmente, indica o acúmulo de DMQ₆ foi melhor detectado no mutante S114E e no duplo mutante S114A, V111G. As demais linhagens apresentaram picos na mesma região, porém, eles eram estatisticamente diferentes de zero. Após a superexpressão de *COQ8*, foram detectados picos na mesma região o que também indica o acúmulo de DMQ₆.

À temperatura permissiva, os mutantes D53G, V111G E R57A acumularam 2 a 2,7 vezes mais Q₆, enquanto os mutantes S114A, S114E e o duplo mutante S114A, V111G acumularam de 3,4 a 4,6 vezes mais Q₆, em relação ao acúmulo observado nas mesmas linhagens crescidas à temperatura não-permissiva. Esses resultados estão dentro do esperado para os fenótipos de crescimento respectivamente observados.

Como pode ser observado na tabela 4, no mutante D53G houve decréscimo no acúmulo de Q₆ a 37 °C, e um leve aumento no acúmulo de DMQ₆. Para o mutante R57A, não houve acúmulo de DMQ₆ a 37 °C. Em estudo anterior, mostrou-se que os resíduos S20, S28 e T32 controlam a atividade de Coq7p (MARTIN-MONTALVO et al., 2011). O triplo mutante S20D,S28E,T32D apresentou crescimento normal em meio contendo etanol e temperatura seletiva, porém, apresentou redução nos níveis de Q₆ quando cultivado a 37 °C, estando de acordo com resultados anteriores.

O mutante S114E apresentou crescimento deficiente a 30 °C e 37 °C, tendo também um decréscimo no acúmulo de Q₆ e DMQ₆ a 37 °C, apresentando, porém, quantidades similares para Q₆ e DMQ₆ a 30 °C. O duplo mutante S114A, V111G também apresentou menor acúmulo de Q₆ e DMQ₆ a 37 °C, estando de acordo com o fenótipo obtido em estudos anteriores, demonstrando deficiência de crescimento. O fenótipo respiratório foi parcialmente recuperado após a superexpressão de *COQ8*, o que pode também explicar o ligeiro aumento na síntese e acúmulo de Q₆ e DMQ₆ demonstrados aqui.

Na linhagem selvagem com a superexpressão de *COQ8*, foi observado, na mesma região, um pico menor, não sendo considerado estatisticamente diferente de zero. Além disso, foi observado que há menor acúmulo de Q₆ em mitocôndrias isoladas de linhagens crescidas à temperatura não permissiva, em comparação ao acúmulo de Q₆ observado nas mesmas linhagens crescidas a 30 °C, exceto para o mutante S114E, que apresentou um discreto aumento no acúmulo de Q₆ e DMQ₆.

Linhagem	30	°C	37	°C
	Q ₆	DMQ ₆	Q ₆	DMQ ₆
W303	$\textbf{4.23} \pm \textbf{0.761}$	0.14 ± 0.040	$\textbf{2.18} \pm \textbf{0.15}$	0.07 ± 0.015
WT+COQ8	$\textbf{3.72} \pm \textbf{0.408}$	$\textbf{0.15} \pm \textbf{0.07}$	$\textbf{1.55} \pm \textbf{0.16}$	$\textbf{0.04} \pm \textbf{0.019}$
$\Delta coq7$	ND	ND	ND	ND
<i>∆coq7/</i> D53G	$\textbf{3.52} \pm \textbf{0.403}$	$\textbf{0.11} \pm \textbf{0.01}$	$\textbf{1.52} \pm \textbf{0.117}$	$\textbf{0.10} \pm \textbf{0.017}$
$\Delta coq7D53G + COQ8$	$\textbf{2.9} \pm \textbf{0.465}$	$\textbf{0.14} \pm \textbf{0.01}$	$\textbf{1.25} \pm \textbf{0.095}$	$\textbf{0.14} \pm \textbf{0.139}$
$\Delta coq7/S114A$	$\textbf{1.76} \pm \textbf{0.265}$	$\textbf{0.15} \pm \textbf{0.012}$	$\textbf{0.52} \pm \textbf{0.05}$	$\textbf{0.11} \pm \textbf{0.05}$
$\Delta coq7/S114A + COQ8$	$\textbf{1.76} \pm \textbf{0.162}$	$\textbf{0.14} \pm \textbf{0.037}$	$\textbf{0.44} \pm \textbf{0.076}$	$\textbf{0.13} \pm \textbf{0.015}$
$\Delta coq7/V111G$	$\textbf{2.91} \pm \textbf{0.254}$	$\textbf{0.12} \pm \textbf{0.024}$	$\textbf{1.05} \pm \textbf{0.186}$	$\textbf{0.03} \pm \textbf{0.01}$
$\Delta coq7/V111G + COQ8$	$\textbf{3.77} \pm \textbf{0.566}$	$\textbf{0.09} \pm \textbf{0.019}$	$\textbf{1.1}\pm\textbf{0.073}$	$\textbf{0.05} \pm \textbf{0.023}$
∆ <i>coq7/</i> S114A, V111G	$\textbf{1.06} \pm \textbf{0.268}$	$\textbf{0.62}\pm\textbf{0.1}$	$\textbf{0.27} \pm \textbf{0.058}$	$\textbf{0.42}\pm\textbf{0.05}$
$\Delta coq7/$ S114A, V111G + COQ8	$\textbf{1.14} \pm \textbf{0.457}$	$\textbf{0.74} \pm \textbf{0.14}$	$\textbf{0.31} \pm \textbf{0.05}$	$\textbf{0.44} \pm \textbf{0.048}$
$\Delta coq7/$ S114E	$\textbf{0.58} \pm \textbf{0.183}$	$\textbf{0.39} \pm \textbf{0.19}$	$\textbf{0.13} \pm \textbf{0.003}$	$\textbf{0.45}\pm\textbf{0.04}$
$\Delta coq7/S114E + COQ8$	$\textbf{1.03} \pm \textbf{0.340}$	$\textbf{0.40} \pm \textbf{0.12}$	$\textbf{0.375} \pm \textbf{0.027}$	$\textbf{0.75} \pm \textbf{0.15}$
$\Delta coq7/R57A$	$\textbf{1.74} \pm \textbf{0.5}$	$\textbf{0.08} \pm \textbf{0.06}$	$\textbf{0.63} \pm \textbf{0.06}$	ND
$\Delta coq7/S20D$, S28E,T32D	$\textbf{2.68} \pm \textbf{0.5}$	$\textbf{0.1}\pm\textbf{0.09}$	$\textbf{0.75} \pm \textbf{0.08}$	ND
$\Delta coq7/$ S20D, S28E, T32D + COQ8	$\textbf{1.91} \pm \textbf{0.22}$	$\textbf{0.05} \pm \textbf{0.05}$	1 ± 0.18	$\textbf{0.07} \pm \textbf{0.01}$

Tabela 4 - Quantificação de Q_6 e DM Q_6 em diferentes linhagens mutantes *coq7*, com a superexpressão de *COQ8* (+*COQ8*).

4.2 COQ3

4.2.1 Alinhamento e análise de resíduos conservados de Coq3p

Enquanto sugere-se que Coq7p seja uma proteína com dois centros de ferro com íons carboxilato, responsável pela hidroxilação da demetoxi-Q a dimetil-Q, (MARBOIS; CLARKE, 1996; STENMARK et al., 2001; TRAN et al., 2006), a proteína Coq3p, descrita como uma O-metiltransferase, catalisa dois diferentes passos durante a biossíntese de Q₆, participando de um complexo com outras proteinas Coq, não tendo sido descrito seu papel exato ainda.

Coq3p pertence à família PF13489 (FINN et al., 2016), que corresponde à família de metiltransferases_23 e está relacionada com outras 2 famílias de metiltransferases: PF08421 (metiltransferase_13) e PF08484 (metiltransferase_14) (FINN et al., 2016).

Assim, diferentemente de outras proteínas Coq, tais como Coq4p, Coq5p, Coq7p que apresentam 1180, 4442 e 1423 sequências disponíveis, homólogos de Coq3p estão presentes em 3900 espécies, apresentando 18196 sequências disponíveis, o que garante análises bioinformáticas que geram resultados com maior significância estatística. Assim, dentre as proteínas Coq escolheu-se Coq3p devido ao alto número de sequências homólogas, que poderiam contribuir de forma mais significativa no estudo funcional da proteína como, por exemplo, na identificação do seu centro catalítico.

A fim de ilustrar simplificadamente a conservação de Coq3p entre algumas espécies, foi realizado o alinhamento de Coq3p de *Saccharomyces cerevisiae* e as sequências de proteínas homólogas em *Drosophila melanogaster* e *Homo sapiens* através do programa Clustal Omega (Figura 20).

Figura 20 - Alinhamento da sequência de aminoácidos presentes em Coq3.

As sequências foram obtidas do banco de dados UniProt (http://www.uniprot.org/). As sequências de aminoácidos de Coq3p de Saccharomyces cerevisiae, Drosophila melanogaster e Homo sapiens foram alinhadas usando o programa Clustal Omega (SIEVERS et al., 2011) e apresentado conforme o BoxShade Server (https://embnet.vital-it.ch/software/BOX_form.html). Os boxes apresentados em preto são resíduos idênticos entre as três espécies, enquanto os boxes apresentados na cor cinza são conservados, porém, apresentam variação em uma das espécies. * = resíduos mutados neste estudo (E123, S125, C131, G133, G134, E138, E197, E200, H201, D203, E219, T227, R230, H254, K258, S262).



4.2.2 Decomposição de Redes de Correlações de Aminoácidos (DRCN) de Coq3p

Conforme apresentado anteriormente no estudo do gene *COQ7*, a rede de decomposição de aminoácidos auxilia na compreensão da evolução proteica e da interação entre diferentes resíduos, o que permite a identificação de possíveis resíduos funcionais que podem ser alvos para a mutagênese. Assim, utilizando-se o alinhamento da Família PF13489 (Família de Coq3p) obtido no PFAM (FINN et al., 2016), através do programa PFstats, foram feitas análises comparativas de 7406 sequênciass, que permitiram a identificação de diferentes resíduos conservados entre espécies, utilizando como filtro a conservação acima de 80%.

Nossas análises revelaram que a família das metiltransferases apresenta 3 resíduos altamente conservados (acima de 85%): G130, G134 e G221 (numeração de Coq3p), ambos descritos como membros do sítio de ligação da S-adenosil-L-metionina. Na Tabela 5 estão descritos resíduos conservados na família de metiltransferases, os resíduos que são substituídos em algum organismo estão destacados em vermelho.

Em relação ao total de sequências comparadas, os resíduos G325 e D1125 aparecem em 83,6% e 86,2% das sequências. O resíduo 325 do alinhamento, embora tenha um alto índice de conservação, é substituído por uma fenilanina na bactéria *Pectobacterium atrosepticum* e também no fungo *Aspergillus fumigatus*. Por outro lado, o resíduo D1125, que apresenta 86,2%, de conservação, substitui o ácido aspártico por uma glicina na posição 112 e por uma treonina na posição 226, nos organismos *Clostridium thermocellum e Pectobacterium atrosepticum*, respectivamente.

Pode-se observar que a posição 1354 do alinhamento apresenta glicina em 89,9% das sequências da família, como nas leveduras *Saccharomyces cerevisiae e Schizosaccharomyces pombe*, e nos eucariotos *Bos Taurus, Mus musculus, Rattus norvegicus, além do protozário Dictyostelium discoideum*. No entanto, observou-se que na proteína HNMT, também da família de metiltransferases, a glicina pode ser substituída por uma alanina, como nas proteínas de *Homo sapiens, Mus musculus e Rattus norvegicuse*.

Esses dados sugerem uma possível atividade funcional desses resíduos na família de metiltransferases.

Resíduos conservados em família de metiltransferases (%)							
Código	Organismo	PBDid	G317	G325	G333	D1125	G1354
UNIPROT	organismo	(8	(89.3)	(83.6)	(94.2)	(86.2)	(89.7)
COO2 VEAST	Saccharomyces		C120	C122	C124	D101	6221
COQ5_ILASI	cerevisiae		0130	0132	0134	DIJI	0221
COQ3_BOVIN	Bos taurus	-	G155	G157	G159	D218	G247
	Dictyostelium	_	G125	G127	G120	D205	6334
COQ3_DICDI	discoideum		0133	0137	0139	0205	0234
COQ3_MOUSE	Mus musculus	-	G155	G157	G159	D218	G247
COQ3_RAT	Rattus norvegicus	-	G154	G156	G158	D217	G246
	Schizosaccharomyces		C00	600	602	D1/0	C179
	pombe	-	999	990	692	D149	0178
GLIN_ASPFU	Aspergillus fumigatus	-	G55	F57	G59	D112	G144
HENMT_MOUSE	Mus musculus		G56	G58	A60	D127	A157
HNMT_DANRE	Zebrafish	-	G60	G62	G64	D137	G166
HNMT_HUMAN	Homo sapiens	1JQD	G60	G62	G64	D137	A166
HNMT_MOUSE	Mus musculus	-	G60	G62	G64	D138	A167
HNMT_RAT	Rattus norvegicus	-	G60	G62	G64	D138	A167
LAEA_ASPFU	Aspergillus fumigatus	-	G143	G145	G147	D199	A228
LAEA_EMENI	Aspergillus nidulans	-	G145	G147	G149	D201	A230
MET18_HUMAN	Homo sapiens	4RFQ	G195	G197	G199	D288	G317
MET2B_HUMAN	Homo sapiens	-	G188	G190	G192	D255	G286
METL2_BOVIN	Bos taurus	-	G188	G190	G192	D255	G286
METL2_CHICK	Gallus gallus	-	G181	G183	G185	D248	G279
	Dictyostelium	C96	R 88	600	D150	C100	
	discoideum	-	990	000 000	0.00	0123	G199
PEAM1_ARATH	Arabidopsis thaliana	-	G290	G292	G294	D350	G379
ταμ μλάτι	Mycobacterium	-	G37	639	G41	D91	\$120
	tuberculosis		037	000	041	051	5120
UBIG_ECOLI	Escherichia coli	4KDC	G64	G66	G68	D124	G153
YEA9 SCHPO	Schizosaccharomyces	-	G151	G153	G155	T226	G273
	pombe				0100		
YGU4 SCHPO	Schizosaccharomyces	-	G92	G94	G96	D153	G182
	pombe						
O6D6E7 PECAS	Pectobacterium	2P7H	G49	F51	G53	D104	G134
	atrosepticum	,	5.0			0104	0104
A3DHC8 CLOTH	Clostridium	3JWG	E106	G108	G110	G112	-
	thermocellum		-100		0-10		
TAM AGRFC	Agrobacterium fabrum	2P35	G38	G40	G42	D94	G123

Tabela 5 - Análise dos resíduos conservados na família de metiltransferases.

*Tabela representativa dos resíduos conservados em diferentes espécies.

Além da identificação dos resíduos altamente conservados, através da comparação das 7406 sequências homólogas a Coq3p, foi possível obter matrizes de autocorrelação que geraram 3 comunidades de resíduos fortemente acoplados, ou seja, resíduos que tendem a estar presentes durante a evolução na família das metiltransferases (Figura 21 e Tabela 6).

Figura 21 - Redes de correlação de resíduos de Coq3p.

Em azul os 6 resíduos do grupo 1, em verde os 2 resíduos do grupo 2, em amarelo a dupla de resíduos que ocorrem no grupo 3.



O grupo 1 (Tabela 6), contém 6 resíduos presentes em 20-27% dos membros desta família: E224, P159, Q158, T131, W136 e R196. Embora eles estejam ausentes em *COQ3* e em *Ubi*G de *E.coli*, as posições Q158 e R196 foram descritas como parte do local de ligação do substrato e, portanto, sugere uma mudança na especificidade de ligação; o grupo 2 (Tabela 7) é composto pelos residuos D153 e G132, duas posições próximas que estão presentes na maioria das proteínas desta família; o grupo 3 (Tabela 8), tem como membros os residuos H201 e H254, presentes em metade das proteínas nesta família (incluindo Coq3p e *Ubi*G), sendo que a posição H201 corresponde ao resíduo H137 na RNA 2'-O-metiltransferase pequena de ratos (Uniprot: Q8CAE2), que é descrito por sua participação na ligação do íon magnésio (KIRINO; MOURELATOS, 2007).

Embora esses grupos tenham tendência a aparecer simultaneamente, as sequências contendo resíduos dos grupos 1 tendem a não ter os resíduos do grupo 2 e 3, e vice-versa, o que deve indicar uma conservação diferencial desses resíduos.

	Comunidade 1					
Sequence*	T321	W344	Q606	P609	R1161	E1371
COQ3_YEAST	C131	L136	C158	l159	M196	F224

Tabela 7- Residuos de Coq3p fortemente acoplados na comunidade 2.

Comunidade 2					
Sequence*	D581	G325			
COQ3_YEAST	D153	G132			

*conservação do resíduo na família.

Tabela 8 -Residuos de Coq3p fortemente acoplados na comunidade 3.

Comunidade 3				
Sequence*	H1195	H1638		

COQ3_YEAST H201 H254

*conservação do resíduo na família. Em vermelho, resíduo mutado neste trabalho.

<u>4.2.3 Modelagem Molecular de Coq3p</u>

Coq3p é uma proteína periférica de membrana, o que dificulta sua purificação e explica o fato de ainda não possuir estrutura cristalográfica determinada. Por essa razão, para facilitar a análise e localização de resíduos e escolher os melhores candidatos à mutagênese sítio-dirigida, foi necessário obter um modelo estrutural da proteína. Utilizaram-se 3 servidores de modelagem molecular independentes: Robetta (KIM; CHIVIAN; BAKER, 2004). Phyre2 (KELLEY; STERNBERG, 2009; KELLEY et al., 2015) e I-TASSER TASSER (ZHANG,2008). A estrutura obtida foi validada por duas métricas distintas, sendo elas: Diagrama de Ramachandran, que avalia as combinações possíveis de ângulos diédricos Ψ (psi) versus Φ (phi) (Tabela 9) e o Software Verify 3D, que compara a compatibilidade entre a sequência de aminoácidos com a estrutura tridimensional (Tabela 10).
Tabela 9 - Validação pelo Diagrama de	Ramachand	ran de modelos	tridimensionais o	de Coq3p,
obtidos em três servidores diferentes.				

Diagrama de Ramachandran									
Servidor	Pogiões favorecidas	Regiões adicionais	Regiões generosamente						
Servidor	Regiões lavorecidas	permitidas	permititas						
Robetta	96,6%	1,0%	2,4%						
Phyre 2D	93,7%	3,4%	2,9%						
I-Tasser	79%	14,2%	6,8%						

Tabela 10 - Validação pelo Verify3D de modelos tridimensionais de Coq3p, obtidos em três servidores diferentes.

Servidor	Compatibilidade estrutural*
Robetta	81,43%
Phyre 2D	78,50%
I-Tasser	80,77%

*Porcentagem de resíduos com score $3D-1D \ge 0.2$.

Com base nas métricas, o modelo obtido no servidor Robetta apresentou 96,6% dos resíduos em regiões favoráveis pelo Diagrama de Ramachandran e mais de 80% de coerência entre o modelo gerado e a sequência de aminoácidos, de acordo com o Verify3D, sendo selecionado para utilização no trabalho (Figura 22).

Figura 22– Modelo estrutural tridimensional da proteína Coq3p.

Estrutura gerada no servidor Robetta, a partir da seqüência primária de aminoácidos, e colorida através do programa PFstats (BLEICHER LEMKE; GARRATT, 2011), indicando resíduos mais ou menos conservados (graduação de cor do vermelho para o azul, sendo o vermelho mais conservado e, o azul menos conservado).



Através do modelo obtido, foi possível observar as comunidades de resíduos acoplados (Tabelas 6, 7, 8), indicadas na figura 23A.

Para tentar compreender a conformação da proteína e a interação dos resíduos, e facilitar a localização no modelo, avaliamos a posição das alfa-hélices, *loops* e fitas beta, apresentadas na figura 23B.

Figura 23 - Comunidades de resíduos fortemente acoplados e Modelo de Coq3p colorido por alfa-hélice, folha beta-pregueada e loops.

A análise através do PFstats revelou os resíduos fortemente acoplados, formando as 3 comunidades indicadas nas tabelas 6, 7,8 .No painel A, a superfície verde indica os resíduos da comunidade 1, a superfície em azul indica os resíduos D153 e G132 da comunidade 2, e a superfície em amarelo, os resíduos H201 e H254, acoplados na comunidade 3. No painel B, o modelo foi colorido para indicar as diferentes regiões da proteína, loops em cor-de-rosa; hélices em verde; fitas beta em lilás. Na parte superior estão indicadas as hélices, e as fitas beta estão indicadas abaixo.



4.2.4 Clonagem dos mutantes pontuais de Cog3p baseados na análise DRCN

A partir das análises por DRCN, a fim de gerar novas informações sobre resíduos relevantes para a estabilidade e função de Coq3p, foram realizadas mutagêneses sítio-dirigidas do gene COQ3 por sobrepoição de PCRs (overlap extension PCR), de acordo com o método de Heckman e Pease (2007). A figura 24 apresenta fotos representativas das reações de PCR.

Figura 24 - Fotos representativas das reações de PCR por sobreposição de fragmentos.

Na figura A, pode- se observar os fragmentos esperados para a primeira parte das reações (E123-1A; E123-1B; D128-1A; D128-1B; H165-1A; H165-1B; -1A E200-1A E200-1B; D203-1A; D203-1A; D203-1B; S125-1A; S125-1B; E219-1A; E219-1B). No painel B é possível observar as reações de PCR após a reação de sobreposição de fragmentos amplificados como descrito na seção 3.2.5. Para as reações de sobreposição, os tamanhos esperados após amplificação é 1784 pb para todos os fragmentos amplificados. P = Marcador de peso molecular, em A: 1 kb Plus Ladder (Thermo-Scientific); em B: DNA do fago Lambda digerido com BsteX.

*Reações descartadas após análise por següenciamento.



<u>4.2.5 Propriedades dos mutantes de ponto de Coq3</u>

A inativação de *COQ3* em *S. cerevisiae* induz uma deficiência no crescimento da levedura em fonte de carbono não fermentável contendo etanol e glicerol (YPEG), indicando o papel principal deste gene na atividade respiratória mitocondrial (JOHNSON et al., 2005; MARTÍN-MONTALVO et al., 2011; XIE et al., 2012).

A linhagem $\Delta coq3$ é um mutante para a Q₆, apresentando, portanto, deficiência respiratória, crescendo apenas em fonte de carbono fermentativa, como o YPD; assim, investigou-se os possíveis efeitos das mutações sitío-dirigidas sobre a capacidade de crescimento das leveduras.

As mutações foram confirmadas através do sequenciamento do DNA, e esses mutantes foram avaliados quanto ao crescimento em meio não fermentável (Figura 26) e também avaliação da síntese de Q₆.

Os mutantes *coq3*^{E123A}, *coq3*^{S125A}, *coq3*^{C131A}, *coq3*^{C133A}, *coq3*^{G134A} coq3^{D203A}, coq3^{E219A} e *coq3*^{K258A}, coq3^{S262A} apresentaram discreto crescimento em fonte de carbono não fermentável. Enquanto a variante contendo a mutação coq3^{H165A} apresentou crescimento muito próximo a linhagem referência. Os mutantes *coq3*^{E138A}, *coq3*^{E197A}, *coq3*H^{201A}, *coq3*^{T227A}, *coq3*R^{230A}, *coq3*H^{254A} não apresentaram crescimento em fonte de carbono não fermentável (Figura 25).

Figura 25 - Diluições seriadas das linhagens mutantes coq3.

Foram crescidas células da linhagem selvagem (W303), usada como linhagem controle, com capacidade respiratória aeróbica e fermentativa, e linhagens mutantes *coq3*, na presença (+*COQ8*) ou ausência de *COQ8*, cultivadas após 48h em meio rico de glicose (YPD) e em fonte de carbono não fermentável (YPEG), à temperatura permissiva (30 °C). Placas fotografadas após 3 dias de crescimento.



Os mutantes foram construídos em plasmídeo epissomal, e, por essa razão, apresentam muitas cópias do alelo mutante, o que poderia auxiliar na restauração

do fenótipo respiratório em meio de fonte de carbono não fermentável. Os alelos foram recuperados e transformados no plasmídeo integrativo Ylp352, e dessa forma foi possível avaliar mais claramente a relevância desses resíduos para a capacidade respiratória, quando em baixo número de cópias (Figura 26). Os mutantes apresentaram crescimento similar aos alelos construídos em vetor multicópia, exceto para o mutante Coq3^{S262A,} que foi incapaz de complementar a deficiência respiratória do mutante *coq3*.

Figura 26 – Avaliação da capacidade respiratória dos alelos em plasmídeo integrativo.

Crescimento da linhagem selvagem (W303), do mutante nulo de *coq3* (∆coq3) e dos mutantes *coq3*^{E123A}, *coq3*^{S125A}, *coq3*^{C131A}, *coq3*^{C133A}, *coq3*^{G134A} coq3^{D203A}, coq3^{E219A} e *coq3*^{K258A}, coq3^{S262A} em meio rico contendo glicose como fonte de carbono (YPD) e fonte de carbono não fermentável (YPEG) incubados na temperatura permissiva (30 °C). Placas fotografadas após 3 dias de crescimento.



Em estudos anteriores, nosso grupo observou o efeito benéfico da superexpressão de *COQ8* no restauro da capacidade respiratória de alguns mutantes *coq* (BARROS et al., 2005; BUSSO et al., 2010, ZAMPOL et al., 2011). No presente estudo, a superexpressão de *COQ8* beneficiou o crescimento do alelo de *coq7* carregando a mutação S114E, e uma vez que supõe-se que Coq8p catalisa a fosforilação de Coq3p, Coq5p e Coq7p durante a biossíntese de Q₆, também foi avaliado o efeito da superexpressão de *COQ8* sobre os mutantes *coq3*.

Assim, transformou-se os mutantes *coq3* gerados neste estudo com vetores que superexpressam *COQ8*, e, curiosamente, o mutante *coq3*^{H165A}, que apresentou crescimento similar ao da linhagem selvagem, teve o crescimento respiratório reduzido após a superexpressão de *COQ8* (Figura 27). Os demais mutantes apresentaram crescimento similar ao observado na ausência de *COQ8* (Figura 27), e, portanto, não tiveram alterações significativas no crescimento em fonte de carbono não fermentável (YPEG). Os mutantes *coq3*^{E123A}, *coq3*^{S125A} e *coq3*^{E200A} não foram avaliados na presença de vetores superexpressando *COQ8*.

Figura 27 - Análise do efeito da superexpressão de COQ8 sobre o crescimento de mutantes *coq3.*

Foram crescidas células da linhagem selvagem (W303), usada como linhagem controle, com capacidade respiratória aeróbica e fermentativa, e linhagens mutantes *coq3*, na presença (+*COQ8*) ou ausência de *COQ8*, cultivadas após 48h em meio rico de glicose (YPD) e em fonte de carbono não fermentável (YPEG), a temperatura permissiva (30 °C). Placas fotografadas após 3 dias de crescimento.



<u>4.2.6 Hipótese das interações dos resíduos conservados e/ou coevoluídos na</u> <u>estrutura de Coq3p</u>

As análises obtidas por DRCN revelaram 24 resíduos candidatos para produzir mutantes pontuais em Coq3p, e, considerando o modelo produzido e a localização dos resíduos, elaboraram-se hipóteses de interação (Tabela 12) entre os resíduos conservados e que coevoluíram em Coq3p (Tabelas 6, 7, 8)

A partir dessas hipóteses de interação, a princípio foram escolhidos os seguintes resíduos para realizar a mutação sítio-dirigida: E123, S125, C131, G133, G134, E138, H165, E197, E200, H201, D203, E219, T227, R230, H254, K258 e S262.

O ácido aspártico (E) e o ácido glutâmico (D) são resíduos que apresentam cadeias laterais ácidas, polares e carregadas negativamente. A serina (S) e a treonina (T) apresentam cadeias polares não-carregadas assim como a cisteína (C), que tem um grupo tiol (-SH), que permite a formação de uma ponte dissulfeto. A glicina (G) apresenta cadeia lateral não carregada. Por fim, os resíduos histidina (H), arginina (R) e a lisina (K) são polares, carregados positivamente e apresentam cadeias laterais básicas. A mutagênese gerada em nossos mutantes de ponto substitui os resíduos selecionados pelo resíduo alanina (A), que é hidrofóbica e também apresenta cadeias laterais não-polares.

Além disso, na tentativa de melhor entender a interação entre os resíduos de Coq3p, realizamos o alinhamento estrutural do modelo bioinformático, proposto em nosso estudo, com outros modelos de estruturas da família de metiltransferases, disponívels no Protein Data Bank (PDB), utilizando o servidor TopMatch (https://www.came.sbg.ac.at/index.php) (Tabela 11 e ANEXO D).

Na tabela 11, os resíduos destacados em vermelho indicam a conservação em diferentes estruturas de metiltransferares, enquanto os resíduos destacados em verde indicam a substituição por resíduos com carga semelhante ou oposta, e que por essa razão poderiam desempenhar o mesmo tipo de interação que o resíduo encontrado na sequência de Coq3p de leveduras.

Tabela 11 - Comparação	de residuos presentes em	Coq3p e outros membro	s da família de metiltransfer	rases, a partir do alinham	ento estrutural no
servidor TopMatch.				-	

	Resíduos de Coq3p e sua correspondência estrutural em outros membros da família de metiltransferases																	
PDBID	E123	S125	C131	G133	G134	E138	H165	E197	E200	H201	D203	E219	T227	R230	H254	K258	S262	Referências
1JQD	E53	K55	G61	A63	A64	L68	L101	Q143	Y146	Y147	K149	T164	V172	G175	D193	Q197	S201	HORTON et al., 2001
1KYZ	L201	S203	G209	T211	G212	N216	-	W266	H269	D270	S272	-	E297	L300	H323	G327	T331	ZUBIETA et al., 2002
2AOT	E53	K55	G61	A63	G64	L68	L101	Q143	Y146	Y147	K149	-	V172	G175	D193	Q197	S201	HORTON et al., 2005
2DPM	Y36	R38	V44	G46	G47	F51	174	P195	F214	S215	A217	T232	N240	S242	-	-	E247	TRAN et al., 1998
2XIE	G78	K80	T86	G88	G89	A93	T121	A154	P157	-	-	-	V177	Y180	F204	V208	G212	*
3JWG	A30	K32	C38	E40	G41	S45	R72	E110	E113	H114	D116	R132	T140	K143	F164	R168	Q172	MUI-CHAN et al.,
		120	645	5.47	6.40	150	100	5424		14/4.25			64.40	D452	V4 70	D 402	D400	2009
3651	R37	L39	C45	P47	G48	L52	180	E121	H124	W125	-		G149	D152	Y1/8	P182	R186	BURGIE et al.,*
3NDI	D106	F108	C114	D116	G117	R121	K146	N177	C180	-	P183	D199	D206	L209	Y222	F226	S230	BRUENDER et al.,
																		2010
3006	R47	D49	S55	T57	G58	R62	H87	H115	A118	H119	P121	G139	D146	D149	R177	V181	P185	LEE et al., 2010
3L8D	E54	E56	C63	D64	G65	Y69	R94	N124	E127	W128	E130	-	1153	P156	D172	N176	P180	FEDOROV et al.,*
4029	G73	K75	T81	S83	G84	A88	N116	A150	-	-	-	D165	V173	R176	-	-	-	GRIFFITH, S.C. 2002
4RFQ	G188	K190	C196	S198	G199	1203	N230	E294	Y297	N298	D300	K315	S323	H326		V330	V334	RAVICHANDRAN et al., *
4QNX	G123	T125	C131	S133	G134	W138	-	G197	Y200	H201	R203	D219	T227	1230	M246	K250	A255	QUINONES et al.,
																		2014
4KDC	G57	K59	C65	G67	G68	E72	H97	E130	E133	H134	P136	G152	T159	R162	-	K190	P194	ZHU; MAIKUN; XU*
5T64	D106	F108	C114	D116	G117	R121	R146	N177	C189	H181	P183	-	D206	L209	Y222	F226	S230	DOW; TODHEN E
																		HOLDEN, 2016
5DM1	P60	S62	C68	Q70	G71	E75	L102	L130	G133	L134	E136	N151	D159	R162	D183	A187	L191	HAO et al., 2015
5DLY	P61	S63	C69	Q71	G72	Q76	L103	L132	G135	L136	K138	-	D161	R164	D185	A189	M193	HAO el al., 2015

Pode-se observar que entre as 17 estruturas comparadas com o modelo de Coq3p (Tabela 11) o resíduo G134 apareceu conservado em todas, enquanto o resíduo C131 apareceu em 10 estruturas.

A análise comparativa dos resíduos nas estruturas em diferentes proteínas das famílias de metiltransferases, utilizando o programa PyMol, permitiu, por exemplo, medir a distância entre os átomos e verificar as interações polares entre as cadeias dos resíduos selecionados, o que auxiliou na elaboração das hipóteses sobre as possíveis funções dos resíduos de Coq3p que foram selecionados para mutação, a partir da análise por DRCN (Tabela 12).

Tabela 12 -	Hipóteses	para interação	o dos resíduos	conservados e/ou	correlacionados.
-------------	-----------	----------------	----------------	------------------	------------------

Resíduo	Mutação	Fenótipo em vetor multicópia	Fenótipo em vetor integrativo	Expressão – Western Blot	Hipóteses	Interação molecular
E197	E197A	-	_*	-	E197 é altamente conservado, localizado entre a alfa-hélice 8 e alfa- hélice 9. Possivelmente interage com E200, também	H11
E200	E200A	-	_*	-	localizado na alfa-helice 9. Este por sua vez, é altamente conservado, e parece interagir com T227, localizado na fita 5,	
T227	T227A	-	_*	- mantem preservada nas estruturas 1JQD e 2AOT.		E200 H9
H201	H201A	-	<u></u> *	-	Altamente conservado, localizado na hélice 9, e próxima à hélice 12, H201 é membro da Comunidade 3.	H12 H201 H9

Resíduo	Mutação	Fenótipo em vetor multicópia	Fenótipo em vetor integrativo	Expressão – Western Blot	Hipóteses	Interação molecular
H254	H254A	-	_ *	+	Altamente conservado, dentro da Comunidade 3, está localizado próximo às hélices 12 e 13, possivelmente interage com D203 (localizado na hélice 9 e vizinho ao resíduo H201, membro da comunidade 3). A interação entre esses resíduos, possivelmente, posiciona a hélice com o resíduo H201. Essa interação é conservada no moledo 1KYZ.	H12 H9 D203 H254
E123	E123A	+/-	+/-	+	Localizado próximo as hélices 4 e 7, possivelmente interage com os resíduos W144 e K147.	H4 W144 E123 K147 H7

Resíduo	Mutação	Fenótipo em vetor multicópia	Fenótipo em vetor integrativo	Expressão – Western Blot	Hipóteses	Interação molecular
S125	S125A	+/-	+/-*	+/-*	Localizado em β1, é, provavelmente, um resíduo altamente fosforilado (NetPhos 0,869), próximo ao resíduo D191 (altamente conservado). Possivelmente S125 interage com D191 e com N148 localizados em B2.	S125 21 D191 S125 21 N148 H5 H4
E219	E219A	+/-	+/-	+	Próximo à hélice 10 e β5, é altamente conservado e possivelmente interage com algum outro fator, uma vez que está totalmente exposto ao meio.	H9 B5 E219

Resíduo	Mutação	Fenótipo em vetor multicópia	Fenótipo em vetor integrativo	Expressão – Western Blot	Hipóteses	Interação molecular
R230	R230	-	_*	+	Resíduo conservado, localizado em uma alça ligada à hélice 11. Possivelmente interage com V301, Porém, é mais provável que interaja com algum outro fator, uma vez que R230 está totalmente exposto ao solvente.	R230 V301
S262	S262A	+/-	-	+	Localizado na hélice 13, possivelmente interage com N229 e D300.	H13 S262 D300

Resíduo	Mutação	Fenótipo em vetor multicópia	Fenótipo em vetor integrativo	Expressão – Western Blot	Hipóteses	Interação molecular	
E138	E138 A	-	_*	-	Altamente conservado, localizado na hélice 5, possivelmente faz ponte salina com H165, outro resíduo altamente conservado, localizado na hélice 6.	H165	
H165	H165A	+/-	+	+		H5 E138 H6	
D203	D203	+/-	+/-	-	Localizado na hélice 10, o resíduo D203 possivelmente forma ponte salina com H201	K258	
K258	K258A	+/-	+/-	+	altamente conservado, localizado próximo à hélice 13.	D203 H10	

Resíduo	Mutação	Fenótipo em vetor multicópia	Fenótipo em vetor integrativo	Expressão – Western Blot	Hipóteses	Interação molecular
C131	C131A	+/-	+/-*	+	Altamente conservado e localizado entre as hélices 5 e 6, o resíduo C131 (membro da	
G133	G133A	+/-	+/-*	+/-*	comunidade 1) faz parte de uma alça onde se encontram os G130 e G132 (membros da	G133 H6
G134	G134A	+/-	-	+/-*	os G130 e G132 (membros da comunidade 1), além dos resíduos G133 e G134, altamente conservados. Essa alça é conservada em diferentes estruturas de metiltransferases.	G132 G134 H5 G130 C131

4.2.7 Análise da expressão de Coq3p

Coq3p é uma proteína periférica, localizada ao lado da matriz da membrana mitocondrial interna, e atua como O-metiltransferase (POON et al., 1999), sendo esta função modulada e estabilizada por fosforilações mediadas por Coq8p (TAUCHE et al., 2008, XIE et al., 2011; ZAMPOL et al., 2010).

Após a análise do efeito das mutações sítio-dirigidas sobre a atividade respiratória em meio seletivo, investigou-se a estabilidade da expressão de Coq3p pelos diferentes alelos gerados neste estudo (Figura 28). As diferentes linhagens expressando os alelos mutantes em vetores multicópia foram inoculadas em meio YPGal e, após 16 horas de crescimento, fez-se o isolamento de mitocôndrias por centrifugação diferencial. Extratos proteicos das mitocôndrias foram separados para avaliação em SDS-PAGE.

Coq3p apresentou apenas uma banda no extrato proteico da linhagem parental, enquanto os mutantes *coq3*^{E123A}, *coq3*^{C131A}, coq3^{H165A}, coq3^{E219A}, *coq3*^{K258A} e coq3^{S262A} por estarem sendo expressos em múltiplas cópias, apresentaram maior intensidade de sinal, com o acúmulo de bandas de menor peso molecular que podem indicar produtos de degradação de Coq3p. Esses resultados estão de acordo com o fenótipo verificado quando as linhagens foram crescidas em meio com fonte de carbono não fermentável, e com os níveis de Q₆ apresentados na análise do extrato lipídico por HPLC (Tabela 13).

Já, nos mutantes que apresentaram deficiência fenotípica de crescimento em meio seletivo para a atividade respiratória (*coq3*^{E138A}, *coq3*^{E197A}, *coq3*^{E200A}, *coq3*^{H201A}, *coq3*^{T227A}) não foi possível detectar o produto Coq3p resultante de cada mutante. É possível que essas mutações desestabilizem Coq3p a ponto de ser rapidamente degradada. Por outro lado, *coq3*^{R230A,} que apresentou níveis de Coq3p similar aos mutantes com competência respiratória, seria a exceção entre os mutantes respiratórios em vetor multicópia.

Coq3p faz parte do complexo multi-enzimático envolvido na biossíntese de Q₆ e como a falta de um dos componentes do complexo desestabiliza seus outros componentes (GIN; CLARKE, 2005; HSIE et al., 2007; MARBOIS et al., 2005; ZAMPOL et al., 2011), decidimos avaliar a expressão proteíca de Coq4p e Coq5p (Figura 28) para verificar a estabilidade do complexo proteico multiunidades, formado durante a síntese de Q₆, utilizando a anti-Porina, (Invitrogen®), como controle de carregamento. Coq4p faz parte do complexo multi-enzimático e fica instável na ausência de um dos componentes do complexo, já Coq5p não se desestabiliza na ausência do complexo (GIN; CLARKE, 2005). Conforme o esperado, os mutantes que não acumulam Coq3p também apresentam redução considerável do nível endógeno de Coq4p, mas não de Coq5p.

Para os mutantes *coq3*^{E123A}, *coq3*^{C131A}, coq3^{H165A}, coq3^{E219A}, *coq3*^{K258A} e coq3^{S262A}, que apresentaram crescimento respiratório em fonte de carbono não fermentável à temperatura permissiva e níveis que indicam a síntese de Q₆, também há a presença de Coq4p e Coq5p em níveis similares ao expresso pela linhagem selvagem.

Figura 28 - Avaliação dos níveis de expressão proteica em mutantes *coq3* expressos em vetor epissomal.

Extrato proteico obtido de mitocôndrias isoladas das linhagens selvagens; mutantes *coq3* expressos em plasmídeo multicópia (*coq3*^{E123A}, *coq3*^{C131A}, *coq3*^{C133A}, *coq3*^{G134A}, *coq3*^{E138A}, *coq3*^{E197A}, *coq3*^{H165A}, *coq3*^{E200A}, *coq3*^{H201A}, *coq3*^{D203A}, *coq3*^{E19A}, *coq3*^{T227A}, *coq3* ^{R230A}, *coq3*^{H254A}, *coq3*^{K258A}, *coq3*^{S262A}). As células foram crescidas a 30 °C, em meio de galactose. 20µg de proteína mitocondrial foram separadas por SDS-PAGE, transferidas para membrana de nitrocelulose e a presença das proteínas Coq3p, Coq4p, Coq5p foi verificada com anticorpos anti-Coq3p, anti-Coq4p, anti-Coq5p, e anti-Porina (Invitrogen®) como controle.



Como os mutantes que apresentaram fenótipo de crescimento respiratório também foram clonados em plasmídeo integrativo simples cópia, o mesmo teste de estabilidade para Coq3p, Coq4 e Coq5 foi executado, a fim de avaliar os produtos proteicos de Coq3p e o complexo multiunidades (Figura 29).

Todos os mutantes apresentaram níves de Coq3p, Coq4p e Coq5p dentro do esperado, incluindo o mutante S262A, que além de apresentar uma deficiência de crescimento em meio contendo fonte de carbono não fermentável (Figura 26),

também apresentou uma discreta redução nos níveis de Coq4 e Coq5p, devido à presença de menos cópias do alelo mutante.

Figura 29 - Avaliação dos níveis de expressão proteica em mutantes *coq*3 expressos em vetor integrativo.

Extrato proteico obtido de mitocôndrias isoladas das linhagens selvagens; mutantes *coq3* expressos em plasmídeo integrativo (*coq3*^{C131A}, coq3^{H165A}, coq3^{D203A}, coq3^{E219A}, *coq3*^{K258A}, coq3^{S262A}). As células foram crescidas a 30 °C, em meio de galactose. 20µg de proteína mitocondrial foram separadas por SDS-PAGE, transferidas para membrana de nitrocelulose e a presença das proteínas Coq3p, Coq4p, Coq5p foi verificada com anticorpos anti-Coq3p, anti-Coq4p, anti-Coq5p, e anti-Porina (Invitrogen®) como controle.



4.2.8 Avaliação dos níveis endógenos de Q₆ em mutantes COQ3

De acordo com Wang e Hekimi (2013), a via biossintética da Coenzima Q ocorre na membrana interna mitocondrial, a partir da atividade redox do anel de benzoquinona, seguido por reações de metilações e hidroxilações até a formação da Q₆ madura. Tanto células humanas quanto de levedura utilizam o intermediário ácido 4-hidroxibenzóico (4HB), derivado do corismato e da tirosina, como precurssor da CoQ. No entanto, Marbois e colaboradores (2010) demonstraram que, na ausência de ácido 4-hidroxibenzóico (4HB), as leveduras utilizam o acido p-aminobenzóico (pABA) como anel precurssor (também presente durante a síntese do folato em humanos).

Dentre os intermediários da biossíntese de Q₆, muitos mutantes tendem a acumular o intermediário HHB (ácido 3-hexaprenil-4-hidroxibenzóico) e o ácido 3-hexaprenil-4-aminobenzoico (HAB) (POON et al., 1999). Por outro lado, XIE e colaboradores (2012) demonstraram que a superexpressão de *COQ8* pode levar ao acúmulo de outros intermediários (XIE et al., 2012), por exemplo, mutantes coq5 podem acumular o intermediário DMQ₆, também presente em mutantes pontuais de *coq7* (MARBOIS et al., 2006).

Uma vez que a síntese de Q₆ é afetada pela deleção de genes c*oq*, realizouse uma cultura celular em meio rico em galactose, dos mutantes *coq3*^{E123A}, *coq3*^{C131A}, *coq3*^{C133A}, *coq3*^{G134A}, *coq3*^{E138A}, *coq3*^{E197A}, coq3^{H165A}, *coq3*^{E200A} *coq3*^{H201A}, coq3^{D203A}, coq3^{E219A}, *coq3*^{T227A}, *coq3* ^{R230A}, *coq3*^{H254A} *coq3*^{K258A}, coq3^{S262A} e após posterior extração de lipídeos, avaliou-se a síntese de intermediários de Q₆.

Na região onde há um pico que, provavelmente, indica o acúmulo de Q₆, os mutantes *coq3*^{E138A}, *coq3*^{E197A}, *coq3*^{E200A} (Figura 30) e os mutantes *coq3*^{H201A}, *coq3*^{T227A}, *coq3*^{R230A}, *coq3*^{H254A} (Anexo C) apresentaram picos não considerados estatisticamente diferentes de zero (Tabela 13), estando em acordo com os resultados do teste de diluição seriada, em que esses mutantes não apresentaram complementação, resultando na deficiência respiratória em meio de fonte não fermentativa (YPEG).

Linhagem	30 °C
	Coenzima Q ₆
W303-1A	3,79± 0,08
ΔCOQ3	ND
aW303∆COQ3 ^{E123A}	1,13±0,016
aW303∆COQ3 ^{C131A}	0,85 ±0,005
aW303∆COQ3 ^{C133A}	$0,42 \pm 0,008$
aW303∆COQ3 ^{G134A}	0,32 ± 0,001
aW303∆COQ3 ^{E138A}	ND
aW303∆COQ3 ^{H165A}	0,34±0,004
aW303∆COQ3 ^{E197A}	ND
aW303∆COQ3 ^{E200A}	ND
aW303∆COQ3 ^{H201A}	ND
aW303∆COQ3 ^{D203A}	0,32± 0,002
aW303∆COQ3 ^{E219A}	0,37±0,008
aW303∆COQ3 ^{T227A}	ND
aW303∆COQ3 ^{R230A}	ND
aW303∆COQ3 ^{H254A}	ND
aW303∆COQ3 ^{K258A}	0,57±0,006
aW303∆COQ3 ^{S262A}	0,65±0,003

Tabela 13 - Quantificação de Coenzima Q₆ (μg de Coenzima/mg de proteína mitocondrial) em diferentes mutantes *coq3*, crescidos a 30 °C.

Os dados apresentados foram feitos através da media de quatro aplicações; ± Desvio padrão de 4 extrações independentes; ND, não detectado. Os mutantes *coq3*^{E123A}, *coq3*^{C131A}, *coq3*^{C133A}, *coq3*^{G134A} (Figura 30) e os mutantes coq3^{D203A}, coq3^{E219A}, *coq3*^{K258A}, coq3^{S262A} (Anexo C) apresentaram uma pequena síntese de Q₆, como observado nos cromatogramas da figura 30, sendo a maior concentração de Q₆ encontrada nos mutantes coq3^{E123A} e *coq3*^{C131A} (Tabela 13), sendo estes resultados dentro do esperado para os fenótipos de crescimento respectivamente observados. A exceção foi o mutante *coq3*^{H165A}, que embora tenha apresentado crescimento respiratório similar a linhagem selvagem, não apresentou níveis de Q₆ elevados.

Também foram testados os efeitos de COQ8 nas mesmas linhagens, mas não houve diferença significativa nas quantidades de Q₆ estando de acordo com os resultados descritos por XIE et al., 2012 (dados não mostrados).

Figura 30 - Cromatogramas representativos da detecção de Q_6 e seus intermediários em mutantes *coq3*.

Analisou-se a síntese de Q₆ e seus intermediários por HPLC, como descrito nos materiais e métodos, a partir 2mg de extrato proteico extraído de mitocôndrias obtidas da linhagem selvagem (W303) e mutantes *coq3 (coq3*^{E123A}, *coq3*^{C131A}, *coq3*^{C133A}, *coq3*^{G134A}, *coq3*^{E138A}, *coq3*^{E197A}, coq3^{H165A}, *coq3*^{E200A}) expressos em vetor epissomal, crescidos em meio galactose a 30 °C. As amostras foram comparadas com o padrão de picos produzidos pela análise de 5mg de Coenzima Q₆.



5 DISCUSSÃO

5.1 Resíduos relevantes para a atividade de Coq7p

Os mutantes *coq* de levedura vêm sendo estudados há mais de quarenta anos e a sua identificação é definida por uma deficiência respiratória recuperável pela adição de Q₂ e Q₆ exógenas (TZAGOLOFF et al., 1975; TZAGOLOFF; DIECKMANN, 1990). Em *Saccharomyces cerevisiae*, o nível de Q₆ está diretamente correlacionado com a viabilidade mitocondrial e o oxigênio disponível. Estudos de Lester e Crane (1959) demonstraram que a biosíntese de Q₆ era mais intensa em células cultivadas aerobicamente, e reduzida em células com dificuldades respiratórias.

Neste trabalho, selecionamos dois genes da via de biossíntese da Coenzima Q para estudo funcional visando a identificação de resíduos relevantes para sua atividade biológica: COQ7 e COQ3.

Na primeira parte deste estudo, analisamos o gene *COQ7* e a atividade de seu produto proteico através de mutações em uma região não diretamente associada ao centro de di-ferro catalítico monooxigenase. De acordo com o modelo bioinformático proposto, Coq7p está organizada em quatro hélices, que fornecem glutamato e histidina para o centro de di-ferrico. A fosforilação tem um papel central na regulação da biossíntese Q_{6: u}ma série de evidências vêm indicando que o produto gênico de *COQ8*, considerado como a possível quinase regulatória, pode exercer esse papel estabilizador sobre os produtos dos genes *COQ* (STEFELY et al., 2015; WHEELER et al., 2015; XIE et al., 2011; XIE et al., 2012). Por outro lado, Coq3p, Coq5p, Coq7p são alvos conhecidos de fosforilação (GONZÁLEZ-MARISCAL et al., 2014).

Coq7p não está associada, a princípio, ao complexo biossintético de 700 kDa envolvido na síntese de Q₆, mas se associa a ele após a formação do seu substrato, o intermediário DMQ₆. Ao contrário de estudos anteriores, que indicavam que somente três resíduos na porção N-terminal de Coq7p seriam fosforilados (MARTIN-MONTALVO et al., 2011), nossos achados revelaram um novo resíduo: S114, que também deve ser alvo de fosforilação em Coq7p, como o demonstrado no ensaio de gel 2D-IEF / SDS-PAGE (BUSSO et al., 2015). Inclusive, foi observado que o mutante fosmimético S114E tem a capacidade respiratória diminuída, em comparação ao mutante triplo fosfomimétrico S20D, S28E, T32D, sugerindo que S114 tem um papel central na regulação de Coq7p. A superxpressão

de *COQ8* resgatou parcialmente a capacidade respiratória de S114E, permitindo o crescimento em etanol/glicerol, aumentou a estabilidade de Coq3p e Coq4p e também o acúmulo de de DMQ₆ e Q₆. Por outro lado, nos demais mutantes, a expressão de Coq8p extra não resultou em efeitos benéficos.

A análise bioinformática revelou que os resíduos R57, V111 e S114 são altamente conservados, e V111 e S114 coevoluem em diferentes comunidades, o que sugere sua participação na atividade de Coq7p. Em meio seletivo para deficiencia respiratória, o mutante S114A cresceu tão bem como o mutante D53G à temperatura pemissiva (30 °C) e não-permissiva (37 °C), no entanto, o mutante S114E e o duplo mutante S114A, V111G revelaram uma clara redução de crescimento em meio etanol/glicerol, principalmente à 37 °C, assim como também tiveram redução no acúmulo de DMQ₆ e Q₆. Nossos estudos também demonstraram uma alteração no padrão de expressão proteíca nos mutantes: os deficientes respiratórios, à temperatura não-pemissiva (37 °C), S114E e o duplo mutante S114A, V111G apresentaram uma banda mais proeminente de Coq7p, que migra ligeiramente abaixo da linhagem selvagem.

Corroborando o comportamento de sensibilidade térmica, que levou ao início desse projeto com o isolamento de mutantes coq7-ts, a síntese de Q₆ foi diminuída em todas as cepas mutantes crescidas à temperatura não permissiva (37 °C), e este fenômeno foi acompanhado pela expressão reduzida de Coq4p e Coq3p, evidenciando a presença do complexo multimérico.

Por outro lado, a linhagem referência também apresentou redução no acúmulo de Q₆ à 37° C, sugerindo o efeito da temperatura sob o crescimento e o metabolismo mitocondrial.

Com o intuito de entender melhor o efeito da mutagênese na conformação protéica, fizemos a modelagem molecular de Coq7p, e devido às limitações do modelo computacional, os argumentos aqui são especulativos. D53 está na hélice 1 perto de V111, localizado ao final da hélice 2, sugerindo o contato polar feito com Q106, um resíduo da hélice 2. Acredita-se que a mutação V111G também afete a estabilidade da proteína, provavelmente por interações hidrofóbicas com os resíduos Q106 e R109, presentes na hélice 2. Por outro lado, há uma região com 25 aminoácidos, conectando a hélice 2 e 3, e nesse loop, o resíduo S114 aparece na posição N-terminal.

Se S114 for diretamente fosforilado, a serina carregada negativamente pode interagir com aminoácidos vizinhos, carregados positivamente, como R57. O fosfomimético S114E simula a proteína fosforilada, e a possível interação da posição 114 de Coq7p com R57 seria estável e independente do seu mecanismo regulatório. O mutante S114E, deficiente respiratório, acumula DMQ₆ a 30 °C e a 37 °C, sugerindo que a fosforilação do S114 pode ser responsável pela redução da atividade Coq7p em condições que reprimem a biossíntese de Q₆. Por outro lado, a fosforilação de S114 afetaria a associação de Coq7p com Coq5p e Coq3p no complexo de 700 kDa e seria um resíduo chave na regulação de Coq7p.

Estudos com Coq7p recombinantes, expressas em *E.coli*, revelaram que a proteína quinase A (PKA) e a proteína quinase C (PKC) eram capazes de fosforilar os resíduos S20, S28 e T32 (MARTÍN-MONTALVO et al., 2011). Após a substituição das serinas por alaninas, a Coq7p resultante não foi fosforilada por PKA nem por PKC. Em nossos estudos, o triplo mutante fosfomimético S20D,S28E,T32D, crescido à temperatura permissiva, apresentou crescimento normal em meio seletivo para a atividade respiratória, acúmulo de 60% de Q₆ em relação a linhagem selvagem, e três vezes menos a 37 °C. No entanto, o acúmulo de DMQ₆ foi muito baixo em comparação com os dados publicados anteriormente (MARTÍN-MONTALVO et al., 2011).

Em resumo, nosso trabalho propõe que Coq7p seja uma proteína de quatro hélices e S114 é um resíduo chave na regulação de Coq7p, no entanto, ainda são necessários novos estudos que forneçam evidências definitivas quanto a fosforilação de S114 e seu posicionamento na estrutura, como reguladores da atividade de Coq7p.

5.2 Resíduos relevantes para a atividade de Coq3p

Na segunda parte deste estudo, descrevemos mutantes do gene COQ3, o qual foi inicialmente identificado como ortólogo ao gene UbiG de E. coli (POON et al., 1999). Nesse estudo inicial de caracterização de Coq3p, também foram identificados genes homólogos de COQ3 em ratos, Arabidopsis thaliana e humanos, e todos eles contém regiões conservadas da família de metiltransferases.

Estudos de Gin e Clarke (2005) demonstraram que Coq4p e Coq3p são localizados na membrana da matriz interna, e sua expressão foi afetada em $\triangle coq1$. Por outro lado, embora as proteínas Coq8p e Coq3p tenham sido encontradas em

complexos separados, observou-se que a perda de Coq8p resulta na desestabilização da proteína Coq3p; além disso, Marbois e colaboradores (2005) demonstraram a formação de um complexo entre Coq3p, Coq6p, e Coq7p, que comigram junto com Coq4p, indicando um possível papel estrutural de Coq4p durante a biossíntese de Q₆, uma vez que a ausência de Coq4p também resulta na instalibilidade de outros produtos dos genes *COQs* (BELOGRUDOV et. al., 2001; TRAN et. al., 2006), confirmando uma interdependência dessas proteínas (TAUCHE et al., 2008).

Uma característica comum aos mutantes *coq3-9* de *S. cerevisiae* é a ausência de Q₆ e o acúmulo do intermediário ácido 3-hexaprenil-4-hidroxibenzóico (HHB) (GIN; CLARKE, 2005), exceto em alguns mutantes pontuais de *coq5 e coq7,* que acumulam demetoxi-Q₆ (DMQ₆) (DO et al., 2001; MARBOIS; CLARKE, 1996; PADILLA et al., 2004). Curiosamente, o acúmulo de DMQ₆ se intensifica nesses mutantes quando Coq8p é superexpressa (XIE et al., 2012), demonstrando a interdependência dessas proteínas para a síntese de Q₆.

A deleção de qualquer gene COQ afeta os níveis de Coq3p (GIN; CLARKE, 2005; HSU et al., 2000; POON et al., 1999), sem contudo afetar os níveis de COQ3 mRNA (HSU et al., 2000; POON et al., 1999), sugerindo que Coq3p é necessária para atividade de outras proteínas, como Coq4p e Coq6p, bem como sua estabilidade e associação com a membrana periférica.

Coq3p, como as demais metiltransferases, requer um cátion divalente e utiliza a S-adenosilmetionina (SAM ou AdoMet) como doador do metil para o anel benzênico (JONASSEN; CLARKE, 2001; KAGAN; CLARKE. 1994. NIEWMIERZYCKA; CLARKE, 1999; TURUNEN et al., 2004). O mecanismo para o acúmulo de S-adenosilmetionina ainda não está totalmente esclarecido, no entanto, sabe-se que ela é sintetizada a partir da L-metionina, e que os genes SAM1, SAM2, ERC1, SAH1, CYS4, ADO1, SLT2 atuam no processo. Além de COQ3, os genes PET56 e MRM2, são essenciais ao crescimento em meio de carbono não fermentável (PINTARD et al., 2002; STRUHL, 1985) e também apresentam atividade da S-adenosilmetiltransferase, que atua no centro da subunidade 21s do rRNA (PINTARD et al., 2002; SIRUM-CONNOLLY; MASON, 1993;).

Através de análises bioinformáticas, identificamos resíduos altamente conservados e/ou que coevoluem em comunidades independentes, no entanto, apresentam participação integrada na função de Coq3p. Neste estudo, foram

selecionados os resíduos para mutagênese sítio-dirigida: E123, S125, C131, G133, G134, E138, H165, E197, E200, H201, E219, D203, T227, R230, H254, K258 e S262A.

Em meio seletivo para deficiencia respiratória, os mutantes E197A, E200A, H201A, T227A e H254A revelaram uma severa deficiência de crescimento em meio contendo etanol, além de não sintetizarem Q₆ e apresentaram baixos níveis endógenos de Coq3p e Coq4p, conforme esperado para mutantes funcionais envolvidos no complexo multienzimático para biossíntese de Q₆ (TRAN; CLARKE, 2007; XIE et al., 2012). Embora existam modelos estruturais de metiltrantransferases com resíduos análogos, em nossos estudos não foram realizadas análises das interações estruturais para os resíduos E197, E200, H201, T227 e H254.

Nossos estudos também demonstraram que os mutantes coq3^{E123A,} coq3^{S125A,} coq3^{C131A,} coq3^{G133A,} coq3^{G134,} coq3^{, E219A,} coq3^{D203A,} coq3^{K258A} e coq3^{S262A} apresentam uma leve redução na capacidade respiratória, quando crescidos à temperatura permissiva em meio contendo etanol, sugerindo possível relevância para a atividade de Coq3p.

Com o intuito de compreender o efeito da mutagênese na conformação protéica, fizemos a modelagem molecular de Coq3p, o que permitiu argumentos especulativos a respeito de nossos achados.

Através da comparação estrutural entre proteínas da família de metiltransferases, foi observado que os 17 modelos analisados apresentam uma alça na mesma região em que no nosso modelo estão localizados os resíduos G130, C131, G132, G133 e G134, entre as hélices 5 e 6. Em nosso estudo, cepas superexpressando as mutações C131A, G133A e G134A, apesar de expressarem Coq3p, Coq4p e Coq5p em níveis similares a cepa selvagem, demonstraram crescimento lento em meio seletivo para a atividade respiratória, enquanto G134A em simples cópia apresenta deficiência total de crescimento nesse meio, dessa forma podemos supor que essa região é de fato o centro catalítico de Coq3p.

Martin e McMillan (2002) demonstram em suas análises uma região contendo os resíduos "GXGXG", sendo as 3 glicinas altamente conservadas nos sítios de ligação da S-adenosilmetionina e em outras proteínas da família de metiltransferases, e por essa razão eles propõem ser este o centro catalítico da família AdoMet. Nossas análises no servidor TopMatch permitiram observar, nos modelos 4QXN e 4KDC, a interação entre os resíduos K110-G130 e R44-G64, respectivamente, sendo esta conservada no nosso modelo, entre os resíduos R68 e G130. Possivelmente, essa interação é o que posiciona a alça contendo os resíduos 130-134, resultando na atração ou repulsão dos resíduos em regiões próximas.

Acredita-se que a mutação H165A também afete a estabilidade protéica, uma vez que o mutante carregando essa mutação apresentou fenótipo com o crescimento similar ao da linhagem de referência, porém não apresentou níveis elevados de Q₆ como esperado. Sugere-se que H165, localizado na hélice 6, faz ponte salina com E138, este localizado na hélice alfa 5, permitindo o posicionamento da alça onde se encontra o sítio-ativo. De fato, na saída da hélice alfa 6, onde está localizado H165 há uma lisina (K168), que também poderia realizar uma ponte salina com E138 em alguma das conformações que estes resíduos assumam na dinâmica desta proteína. Na estrutura 4KDC, os resíduos correspondentes são E72 e H97. Por outro lado, na estrutura 4O29 ocorre uma ponte de hidrogênio entre os resíudos S83 e N116, respectivamente (Tabela 11).

A serina 125, localizada na fita beta 1, é um resíduo com alto potencial de fosforilação (NetPhos 0,869), e possivelmente interage com o resíduo D191, também altamente conservado. Na estrutura 5DLY, S125 corresponde à serina 63 que possivelmente forma uma ponte de hidrogênio com Q125, posicionando a alça contendo as cisteínas e glicinas conservadas (Tabela 11). Juntas, essas observações explicam o discreto crescimento de coq3^{S125A} em meio de fonte de carbono não fermentável.

Em região relativamente distante do centro catalítico aqui proposto, o resíduo E123, localizado entre as hélices 4 e 7, encontra-se na saída da fita beta 1, e, portanto, auxilia em seu posicionamento, através da interação com o resíduo K147, localizado próximo à hélice 5. Essas interações explicam o fenótipo respiratório e os níveis elevados de Q_6 encontrados. Embora não seja um resíduo conservado, a ponte salina é conservada, uma vez que nas estruturas 30U6, 3G5T e 5T64, o resíduo E123 corresponde a R47, R37 e D106, que interagem com os resíduos D109, D31 e R129, respectivamente (Tabela 11).

Assim como E123, os resíduos D203 e K258, localizados nas hélices 10 e 13, respectivamente, encontram-se em região muito distante da alça catalítica conservada, e possivelmente interagem formando uma ponte salina, o que explicaria o discreto crescimento em meio contendo etanol. Corroborando com essa hipótese, observamos que na estrutura 38DL, os resíduos análogos E130 e N176

também interagem formando uma ponte salina, demonstrando assim a conservação da estrutura (Tabela 11).

Os mutantes coq3^{E219A} e coq3^{R230A} apresentaram níveis endógenos de Coq3p, Coq4p e Coq5p similares aos demais mutantes e a linhagem selvagem, e embora tenha sido observado um discreto crescimento em fonte de carbono não fermentável em coq3^{E219A}, o mesmo não ocorreu no mutante coq3^{R230A}. A expressão endógena de Coq3p nesses mutantes, possivelmente ocorre pela interação de E219 e R230 com algum outro fator do complexo da bossíntese de Q₆, uma vez que nosso modelo revelou que, além de estarem distantes da alça contendo os resíduos 130-134, ambos têm a cadeia lateral completamente exposta ao solvente. As estruturas 4O29, 4QNX e 3NDI apresentam os resíduos D165, E219 E D199, respectivamente, análogos ao E219. Já nas estruturas 4KDC, 5DLY e 5DM1, o resíduo R230 corresponde às argininas nas posições 162, 164 e 162, respectivamente (Tabela 11).

A cepa carregando a mutação S262A apresentou discreto crescimento respiratório em meio com fonte de carbono não fermentável a 30 °C. Nosso modelo sugere uma possível interação entre os resíduos S262 e D300, localizados na hélice alfa 13. Na estrutura 5T64, a serina na posição 230 interage com o resíduo E287; por outro lado, na estrutura 1JQD, S262 corresponde a S201. Essas interações sugerem a necessidade de S262 para a atividade de Coq3p.

Assim, propomos um modelo molecular de Coq3p, que revela como centro catalítico a região entre as hélices 5 e 6, onde estão localizados os resíduos C131, G133, G134, essenciais para a atividade de Coq3p durante a síntese de Q₆, no entanto, são necessários estudos complementares para melhor entendimento e elucidação da via catalítica em *COQ3*.

6 CONCLUSÕES 6.1 COQ7

Em relação ao gene COQ7 pode-se concluir que:

 ✓ O duplo mutante S114A, V111G apresenta deficiência respiratória à temperatura não permissiva e acúmulo de níveis DMQ₆ mais altos em relação aos níveis de Q₆;

 \checkmark À temperatura não permissiva (37 °C), a síntese de Q₆ diminui em todas as linhagens, incluindo a selvagem;

✓ O mutante S114E apresenta deficiência respiratória quando em meio de fonte de carbono não fermentável e também apresenta maior acúmulo de DMQ₆ a 30 °C e 37 °C, e, possivelmente, inibe a atividade de Coq7p;

✓ A superexpressão de COQ8 melhorou parcialmente a capacidade respiratória do mutante S114E, além de manter estáveis os níveis de expressão de Coq3p e Coq4p e aumentar o acúmulo de Q₆ e DMQ₆;

 ✓ O sítio de S114 pode ser um alvo para a fosforilação de Coq7p e desenvolver uma atividade central na regulação de Coq7p;

✓ A mutação S114E sugere que S114 interage com R57 quando fosforilada. Para verificar se isso ocorre de fato, um experimento que poderia ser conduzido é medir a Transferência Ressonante de Energia de Fluorescência (FRET, do inglês *Fluorescence Ressonance Energy Transfer*) entre os triptofanos 92 e 120. Quando S114 for fosforilada, ocorre o deslocamento que aumenta a distância entre os triptofanos para um valor acima de 10 Å, quando o sinal de FRET é reduzido.

Os principais resultados referentes ao gene COQ7 estão disponíveis no artigo: "Coq7p relevant residues for protein activity and stability" (ANEXO E).

6.2 COQ3

Em relação ao gene COQ3, até o momento, pode-se concluir:

✓ E138, E197, E200, H201, T227, R230 e H254 são resíduos conservados e essenciais para a atividade de Coq3p, uma vez que linhagens carregando substituições nesses resíduos apresentaram severa deficiência respiratória, mesmo se superexpressos em vetores multi-cópias;

✓ Os mutantes coq3^{E123A}, coq3^{S125A}, coq3^{C131A}, coq3^{G133A}, coq3^{G134A}, coq3^{H165A}, coq3^{D203A}, coq3^{E219A}, coq3^{K258A} e coq3^{S262A} são deficientes respiratórios quando expressos em vetores integrativos ou em vetores multicópia;
✓ Corroborando estudos anteriores, a estabilidade de Coq4p está associada à

 Corroborando estudos anteriores, a estabilidade de Coq4p esta associada a atividade de Coq3p;

✓ Os mutantes coq3^{D203A}, coq3^{E219A}, *coq3^{K258A}* e coq3^{S262A} apresentaram crescimento discreto em fonte de carbono não fermentável etanol/glicerol (YPEG), quando comparados a outros mutantes; esse fato possívelmente ocorre por serem resíduos localizados em região distante da proposta como centro catalítico;

✓ Por outro lado, os mutantes coq3^{E123A}, coq3^{S125A}, coq3^{C131A}, coq3^{G133A}, coq3^{G134A} apresentaram crescimento respiratório em meio contendo fonte de carbono não fermentável, no entanto, o mutante coq3^{H165A} apresentou crescimento similar ao da linhagem selvagem W303, sugerindo a atividade funcional desses resíduos, localizados em regiões próximas;

✓ A alça onde estão localizados os resíduos C131, G133 e G134 é uma região altamente conservada, e pode ser o centro catalítico de Coq3p;

✓ Coq3p é uma o-metiltransferase, cuja atividade catalítica ainda não foi estudada. A coleção de mutantes apresentada aqui, que comprometem a função respiratória celular, poderia ser expressa em bactérias para a realização de ensaios enzimáticos que permitam correlacionar mutação, estrutura e a atividade metiltransferase.

Esses resultados sugerem a relevância desses resíduos para a viabilidade e crescimento das linhagens mutantes *coq3*, sendo necessários novos estudos para tentar elucidar sua função na atividade de *COQ3*.

REFERÊNCIAS*

ALBERTS, B. Molecular biology of the cell. 4^a ed. Editora Artmed. 3786p, 2002.

ALLAN CM1, HILL S, MORVARIDI S, SAIKI R, JOHNSON JS, LIAU WS, HIRANO K, KAWASHIMA T, JI Z, LOO JA, SHEPHERD JN, CLARKE CF. A conserved START domain coenzyme Q-binding polypeptide is required for efficient Q biosynthesis, respiratory electron transport, and antioxidant function in Saccharomyces cerevisiae.**Biochim. Biophys. Acta**, v. 1831, n.4, p.776-91, 2013.

ALLAN CM, AWAD AM, JOHNSON JS, SHIRASAKI DI, WANG C, BLABY-HAAS CE; MERCHANT SS, LOO JA, CLARKE CF. Identification of Coq11, a new coenzyme Q biosynthetic protein in the CoQ-synthome in Saccharomyces cerevisiae. **J. Biol. Chem**, v. 290, n.12, p.7517-7534, 2015.

ALLEN, J. F.; RAVEN, J. A. Free-Radical-Induced Mutation vs Redox Regulation: Costs and Benefits of Genes in Organelles. **J. Mol. Evol**., v. 42, p. 482-492, 1996.

ATCHLEY, W. R.; TERHALLE, W.; DRESS, A. Positional Dependence, Cliques, and Predictive Motifs in the bHLH Protein Domain. **J. Mol. Evol**, v. 48, n. 5, p. 501–516, maio 1999.

ASHBY, MN; EDWARDS, PA. Elucidation of the deficiency in two yeast coenzyme Q mutants. Characterization of the structural gene encoding hexaprenyl pyrophosphate synthetase. **J. Biol. Chem.** v. 265, p. 13157–13164, 1990.

BAKKER, B. M.; OVERKAMP, K. M.; VAN MARIS, A. J. A.; KÖTTER, P.; LUTTICK, M. A. H.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T. Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microb. Rev**, v. 25, p.15-37, 2001.

BARRIENTOS, A. In vivo and in organelle assessment of OXPHOS activities. **Methods**, v. 26, p. 307-316, 2002.

BARRIENTOS, A. Yeast Models of Human Mitochondrial Diseases. **IUBMB Life**, v. 55, p. 83-95, 2003.

BARRIENTOS, A.; BARROS M.H.; VALNOT, I.; RÖTIG, A.; RUSTIN, P.; TZAGOLOFF, A. Cytochrome oxidase in health and disease. **Gene.** v.286, p.53-63, 2003.

BARROS, M. H.; JOHNSON, A.; GIN, P., MARBOIS, B. N.; CLARKE, C. F.; TZAGOLOFF, A. The Saccharomyces cerevisiae COQ10 gene encodes a START domain protein required for function of coenzyme Q in respiration. **J. Biol. Chem**, v. 280, p. 42627-42635, 2005.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002. BARROS, M. H.; DA CUNHA, F. M.; OLIVEIRA, G. A.; TAHARA, E. B.;KOWALTOWSKI, A. J. Yeast as a model to study mitochondrial mechanisms in ageing **Mechanisms of Ageing and Development,** v. 131, n. 7-8, p. 494-502, 2010.

BENTINGER, M.; BRISMAR, K.; DALLNER, G. The antioxidant role of coenzyme Q. **Mitochondrion**, v. 7S, p. S41-S50, 2007.

BENTINGER, M.; TEKLE, M.; DALLNER, G. Coenzyme Q - biosynthesis and functions. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 396, p. 74-79, 2010.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquímica**. 6^a edição: Guanabara Koogan, 2008. p. 1154.

BELOGRUDOV GI, LEE PT, JONASSEN T, HSU AY, GIN P & CLARKE CF Yeast COQ4 encodes a mitochondrial protein required for coenzyme Q synthesis. **Arch. Biochem. Biophys,** v. 392, p. 48–58, 2001.

BLEICHER, L., LEMKE, N., GARRATT, R.C. Using amino acid correlation and community detection algorithms to identify functional determinants in protein families. **PLoS One.** v. 6, n.12, p 27786, 2011.

BIRBOIM, H. C.; DOLLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Res**. v. 7, p. 1513-1523, 1979.

BONAWITZ, N. D.; CHATENAY-LAPOINTE, M.; PAN, Y.; SHADEL, G. S. Reduced TOR signaling extends chronological life span via increased respiration and upregulation of mitochondrial gene expression. **Cell metabolism**, v. 5, n. 4, p. 265–277, 2007.

BOTA DA, DAVIES KJ. Protein degradation in mitochondria: implications for oxidative stress, aging and disease: a novel etiological classification of mitochondrial proteolytic disorders. **Mitochondrion**, **v.** 1, n.1, p. 33-49, 2001.

BOUSQUET I; DUJARDIN G ; SLONIMSKI PP ABC1, a novel yeast nuclear gene has a dual function in mitochondria: it suppresses a cytochrome b mRNA translation defect and is essential for the electron transfer in the bc1 complex. **EMBO J, v.**10, p. 2023–2031, 1991.

BRUENDER, N.A., THODEN, J.B., KAUR, M., AVEY, M.K., HOLDEN, H.M. molecular architecture of a c-3'-methyltransferase involved in the biosynthesis of D-tetronitrose. **Biochem**, v. 49, p. 5891-5898, 2010.

BUSSO C,; TAHARA EB,; OGUSUCU R,; AUGUSTO O,; FERREIRA-JUNIOR JR,; TZAGOLOFF A,; KOWALTOWSKI AJ,; BARROS MH.; Saccharomyces cerevisiae coq10 null mutants are responsive to antimycin A. **FEBS J**. 277(21):4530-8, 2010.

BUSSO, C.; FERREIRA-JUNIOR, J.R.; PAULELA, JANAINA A.; BLEICHER, L.; DEMASI, M.; BARROS, M. H. . Coq7p relevant residues for protein activity and stability. **Biochimie**, v. 119, p. 92-102, 2015.

CLAROS, M. G.; VINCENS, P. Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. **Euro. J. Biochem,** v. 241, n. 3, p. 779-786, 1996.

CHEN, X. J.; BUTOW, R. A. The organization and inheritance of the mitochondrial genome. **Nat. Genet**., v. 6, p. 815-825, 2005.

CHINNERY PF. Inheritance of mitochondrial disorders.**Mitochondrion.** v 2, p. 149-155, 2002.

COVIAN, R.; ZWICKER, K.; ROTSAERT, F. A.; TRUMPOWER, B. L. Asymetric and Redox-specific Binding of Quinone and Quinol at Center N of the Dimeric Yeast Cytochrome *bc*1 Complex. **J. Biol. Chem**, v. 282, n. 33, p. 24198-24208, 2007.

CUI, T. Z.; KAWAMUKAI, M. Coq10, a mitochondrial coenzyme Q binding protein, is required for proper respiration in Sachizosaccharomyces pombe. **FEBS J**, v. 276, p. 748-759, 2008.

DELANO, W. L. Unraveling hot spots in binding interfaces: progress and challenges. **Curr. Opin. Struc. Biol**, v. 12, n. 1, p. 14–20, 2002.

DIMMER, K. S., FRITZ, S., FUCHS, F., MESSERSCHMITT, M., WEINBACH, N., NEUPERT, W. AND WESTERMANN, B. Genetic basis of mitochondrial function and morphology in Saccharomyces cerevisiae. **Mol. Biol. Cell**, v.13, p. 847-853, 2002.

DO TQ, HSU AY, JONASSEN T, LEE PT & CLARKE CF. A defect in coenzyme Q biosynthesis is responsible for the respiratory deficiency in Saccharomyces cerevisiae abc1 mutants. **J. Biol. Chem,** v. 276, p. 18161–18168, 2001.

DOLEZAL, P.; LIKIC, V.; TACHEZY, J.; LITHGOW, T. Evolution of the molecular machines for protein import into mitochondria. **Science**, v. 313, p. 314-318, 2006.

DUINA, A. A.; MILLER, M. E.; KEENEY, J. B. Budding Yeast for Budding Geneticists: A Primer on the Saccharomyces cerevisiae Model System. **Genetics**, v. 197, n. 1, p. 33–48, 2014.

DUNCAN, A. J.; BITNER-GLINDZICZ, M.; MEUNIER, B.; COSTELLO, H.; HARGREAVES, P.; LÓPEZ, L. C.; HIRANO, M.; QUINZII, C. M.; SADOWSKI, M. I.; HARDY, J.; SINGLETON, A.; CLAYTON, P. T.; RAHMAN, S. A nonsense mutation in COQ9 causes autosomal-recessive neonatal-onset primary coenzyme Q10 deficiency: a potentially treatable form of mitochondrial disease. **Am. J. Hum. Genet**, v. 84, n. 5, p. 558-566, 2009.

EMMANUELE, V.; LOPEZ, L.C.; BERARDO, A.; NAINI, A.; TADESSE, S.; WEN, B.; D'AGOSTINO, E.; SOLOMON, M.; DIMAURO,S.; QUINZII, C.; HIRANO, M. Heterogeneity of coenzyme Q10 deficiency: patient study and literature review, **Arch. Neurol**, v.69, p. 978–983, 2012.

EPHRUSSI, B.; HOTTINGER, H. Action de l'acylamin sur les levures. Il Etude genetique du mutant "petite colonie". **Annales de l'Institut Pasteur,** v. 76, p. 419-450, 1949.

FALKENBERG, M.; LARSSON, N.G.; GUSTAFSSON, C.M. DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. **Annu. Rev. Biochem**., v. 76, p. 679- 699, 2007.

FAYE, G.; KUJAWA, C.; FUKUHARA, H. Physical and genetic organization of petite and grande yeast mitochondrial DNA: IV.^{††} Paper III in this series is Michel et al., 1974. In vivo Transcription Products of Mitochondrial DNA and Localization of 23 S Ribosomal RNA in Petite Mutants of Saccharo. **J. Mol. Biol**, v. 88, n. 1, p. 185–203, 1974.

FELDMANN, H. **Yeast**: Molecular and Cell Biology. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2010.

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

FESTENSTEIN, G. N.; HEATON, F. W.; LOWE, J. S.; MORTON, R. A. A constituent of the Unsaponifiable Portion of Animal Tissue Lipids (λ max. 272 mµ.). **Biochem. J**, v. 59, p. 558-566, 1955.

FINN, R. D., COGGILL, P., EBERHARDT, R. Y., The Pfam protein families database: towards a more sustainable future., **Nucleic Acids research**, v. 44, p D279–285, 2016.

FOTINO, A.D.; THOMPSON-PAUL, A.M.; BAZZANO, L.A. Effect of coenzyme Q10 supplementation on heart failure: a meta-analysis, **Am. J. Clin. Nutr.** 97 : 268–275, 2013,

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

FOURY, F.; TALIBI, D. Mitochondrial control of iron homeostasis. A genome wide analysis of gene expression in a yeast frataxin-deficient strain, **J. Biol. Chem**, v. 276, p. 7762-7768, 2001.

GASSER, D.L.; WINKLER, C.A.; PENG, M.; AN, P.; MCKENZIE, L.A.; KIRK, G.D.; SHI, Y.; XIE, L.X.; MARBOIS, B. .N. CLARKE, C.F.; KOPP, J.B. Focal segmental glomerulosclerosis is associated with a PDSS2 haplotype and independently, with a decreased content of coenzyme Q10, **Am. J. Physiol. Renal Physiol, v.** 305, p. 1228–1238, 2013.

GERSHON, H.; GERSHON, D. The budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, as a model for aging research: a critical review. **Mech. Ageing Dev**, v. 120, p. 1-22, 2000.

GESTELAND, R.F.; WOLFNER, M.; GRISAFI, P.; FINK, G.; BOTSTEIN, D.; ROTH, J.R. Yeast suppressors of UAA and UAG nonsense codons work efficiently in vitro via tRNA, **Cell, v.** 7, p. 381- 390, 1976.

GIN, P.; HSU, A. Y.; ROTHMAN, S. C.; JONASSEN, T.; LEE, P. T.; TZAGOLOFF,
A.; CLARKE, C. F. The *Saccharomyces cerevisiae* COQ6 gene encodes a mitochondrial flavin-dependent monooxygenase required for coenzyme Q biosynthesis. **J. Biol. Chem,** v. 278, p. 25308–25316, 2003.

GIN, P. AND CLARKE, C. F. Genetic Evidence for a Multi-subunit Complex in Coenzyme Q Biosynthesis in Yeast and the Role of the Coq1 Hexaprenyl Diphosphate Synthase. J. Biol. Chem, v. 280, n.4, p. 2676 – 2678, 2005.

GLOOR U, WISS O. The biosynthesis of ubiquinone. **Experientia**, v. 14, n.11, p. 410-411, 1958.

GÖBEL, U.; SANDER, C.; SCHNEIDER, R.; VALENCIA, A. Correlated mutations and residue contacts in proteins. **Prot. Struc. Func. Gen**, v. 18, n. 4, p. 309–317, 1994.

GOEWERT, R. R. **Studies on the Biosynthesis of Ubiquinone**. St. Louis, MO: Saint Louis University, 1980.

GOFFEAU A1, BARRELL BG, BUSSEY H, DAVIS RW, DUJON B, FELDMANN H, GALIBERT F, HOHEISEL JD, JACQ C, JOHNSTON M, LOUIS EJ, MEWES HW, MURAKAMI Y, PHILIPPSEN P, TETTELIN H, OLIVER SG. Life with 6000 genes. **Science**, v. 274, n.5287.p.546-567, 1996.

GONZÁLEZ-MARISCAL, I., GARCÍA-TESTÓN, E., PADILLA, S., MARTÍN-MONTALVO, A., POMARES-VICIANA, T., VAZQUEZ-FONSECA, L., GANDOLFO-DOMÍNGUEZ, P., SANTOS-OCAÑA, C. Regulation of coenzyme Q biosynthesis in yeast: a new complex in the block. **IUBMB Life**, v. 66, p. 63-70, 2014.

GRANDIER-VAZEILLE, X.; BATHANY, K.; CHAIGNEPAIN, S.; CAMOUGRAND, N.; MANON, S.; SCHMITTER, J. M. Yeast mitochondrial dehydrogenases are associated in a supramolecular complex. **Biochem**, v. 40, n. 33, p. 9758-9769, 2001.

GREEN, D. E.; HATEFI, Y. The Mitochondrial and Biochemical Machines. **Science**, v. 3445, n. 133, p. 13-19, 1961.

GRUNLER, J.; ERICSSON, J.; DALLNER, G. Branch-point reactions in the biosynthesis of cholesterol, dolichol, ubiquinona and prenylated proteins. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1212, p. 259-277, 1994.

HAO, Y., BLAIR, P.M., SHARMA, A., MITCHELL, D.A., NAIR, S.K. Insights into methyltransferase specificity and bioactivity of derivatives of the antibiotic plantazolicin. **Acs Chem.Biol.** 10: 1209-1216, 2015.

HANAHAN, D. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. J. Mol. Biol, v. 166, n. 4, p. 557-580, 1983.

HATEFI H. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. **Annu. Rev. Biochem**., v. 54, p. 1015-1069, 1985.

HEERINGA, S.F., et al., . COQ6 mutations in human patients produce nephrotic syndrome with sensorineural deafness. **J. Clin. Invest**, v.121, p. 2013-2024, 2011.

HECKMAN, K.L.; PEASE, L.R. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. **Nature Protocols**, v.2, p.924 – 932, 2007.

HERSKOWITZ, I. Life-cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbio. I Rev,** v. 52, n. 4, p. 536-553, 1988.

HILDEBRANDT, T.M.; GRIESHABER, M.K. Three enzymatic activities catalyze the oxidation of sulfide to thiosulfatethiosulfate in mammalian and invertebrate mitochondria, **FEBS J**. v. 275, p. 3352–3361, 2007.

HILL, J.E; MYERS, A.M.; KOERNER, T.J.; TZAGOLOFF, A., Yeast/E. coli shuttle vectors with multiple unique restriction sites, **Yeast, v.** 2, p. 163- 167, 1986.

HOLZENBERGER, M.; DUPONT, J.; DUCOS, B.; LENEUVE, P.; GÉLOËN, A.; EVEN, P. C.; CERVERA, P.; LE BOUC, Y. IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. **Nature**, v. 421, n. 6919, p. 182–187, 2003.

HORTON, J.R., SAWADA, K., NISHIBORI, M., ZHANG, X., CHENG, X.Two polymorphic forms of human histamine methyltransferase: structural, thermal, and kinetic comparisons. **Structure**, v. 9, p. 837-849, 2001.

HORTON, J.R., SAWADA, K., NISHIBORI, M., CHENG, X. Structural basis for inhibition of histamine N-methyltransferase by diverse drugs **J.Mol.Biol**. v. 353, p. 334-344, 2005.

HSIEH, E. J.; GIN, P.; GULMEZIAN, M.; TRAN, U. C.; SAIKI, R.; MARBOIS, B. N.; CLARKE, C. F. Saccharomyces cerevisiae Coq9 polypeptide is a subunit of the mitochondrial coenzyme Q biosynthetic complex. **Arch. Biochem. Biophys**., v. 463, p. 19-26, 2007.

HSU, A. Y., DO, T. Q., LEE, P. T. AND CLARKE, C. F.). Genetic evidence for a multisubunit complex in the O-methyltransferase steps of coenzyme Q biosynthesis. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1484, p. 287 – 297, 2000.

JAZWINSKI, S. M. Yeast longevity and aging – the mitochondrial connection. **Mech. Ageing Dev,** v. 126, p. 243-248, 2005.

JONAŠSEN T, PROFT M, RANDEZ-GIL F, SCHULTZ JR, MARBOIS BN, ENTIAN KD & CLARKE CF Yeast Clk-1 homologue (Coq7/Cat5) is a mitochondrial protein in coenzyme Q synthesis. **J. Biol. Chem,** v. 273, p. 3351–3357, 1998.

JONASSEN, T.; CLARKE, CF. Genetic Analysis of Coenzyme Q Biosynthesis. In: Kagan, VE.; Quinn, PJ., editors. Coenzyme Q: Molecular Mechanisms in Health and Disease. Boca Raton, FL: CRC **PRESS**; 2001.

JOHNSON, A.; GIN, P.; MARBOIS, B. N.; HSIEH, E. J.; WU, M.; BARROS, M. H.; CLARKE, C. F.; TZAGOLOFF, A. COQ9, a new gene required for the biosynthesis of coenzyme Q in Saccharomyces cerevisiae. **A. S. B. M. B.**, v. 36, p. 31397-31404, 2005.

KAGAN, R.M; CLARKE, S.Widespread occurrence of three sequence motifs in

diverse S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases suggests a common structure for these enzymes. **Arch. Biochem. Biophys, v.** 310, n.2, p.417-27, 1994.

KELLEY, L. A; STERNBERG, M. J. E. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. **Nature protocols**, v. 4, n. 3, p. 363–371, 2009.

KELLEY, L. A.; MEZULIS, S.; YATES, C. M.; WASS, M. N.; STERNBERG, M. J. E. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nature Protocols**. v. 10, n. 6, p. 845–858, 2015.

KELLY, D. P. AND SCARPULLA, R. C. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. **Genes. Dev**, v. 18, p. 357-368, 2004.

KIM, D. E.; CHIVIAN, D.; BAKER, D. Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p. W526–W531, 2004.

KIRINO, Y.; MOURELATOS, Z. 2'-O-methyl modification in mouse piRNAs and its methylase. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 51, p. 417–418, 2007.

KRUFT, V.; EUBEL, H.; JÄNSCH, L.; WERHAHN, W.; BRAUN, H. P. Proteomic Approach to Identify Novel Mitochondrial Proteins in Arabidospsis. **Plant Physiol**, v. 127, p. 1694-1710, 2001.

LAGIER-TOURENNE, C.; TAZIR, M.; LÓPEZ, L.C.; QUINZII, C.M.; ASSOUM, M.; DROUOT, N.; BUSSO, C.; MAKRI, S.; ALI-PACHA, L.; BENHASSINE, T.; ANHEIM, M.; LYNCH, D.R.; THIBAULT, C.; PLEWNIAK, F.; BIANCHETTI, L.; TRANCHANT, C.; POCH, O.; DIMAURO, S.; MANDEL, J.L.; BARROS, M.H.; HIRANO, M.; KOENIG, M. ADCK3, an ancestral kinase, is mutated in a form of recessive ataxia associated with coenzyme Q10 deficiency. **Am. J. Hum. Genet,** v. 82, n. 3, p. 661 – 672, 2008.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LARSSON, N. G. Somatic mitochondrial DNA mutations in mammalian aging. **Annu. Rev. Biochem**., v. 79, p. 683-706, 2010.

LEE, J.H., BAE, B., KUEMIN, M., CIRCELLO, B.T., METCALF, W.W., NAIR, S.K., VAN DER DONK, W.A. characterization and structure of dhpi, a phosphonated o-methyltransferase involved in Dehydrophos biosynthesis. **PROC.NATL.ACAD.SCI.USA**, v. 107, p. 17557-17562, 2010.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 4^a edição. São Paulo: Servier. 1202p, 2007.

LENAZ, G.; DE SANTIS, A. A survey of the function and specificity of ubiquinone in the mitochondrial respiratory chain, in: G. Lenaz (Ed.), **Coenzyme Q Biochemistry**, **Bioenergetics and Clinical Applications of Ubiquinone**, John Wiley & Sons, New York, p. 165–199, 1985.

LENAZ, G. ; FATO, R.; FORMIGGINI, G.;, GENOVA, M.L. The role of Coenzyme Q in mitochondrial electron transport. **Mitochondrion.** p.S8-S33, 2007. LENAZ, G.; GENOVA, M. L. Structure and organization of mitochondrial respiratory

complexes: a new understanding of an old subject. **Antioxidants & Redox Signaling,** v. 12, n. 8, p. 961-1008, 2009.

LESTER RL, CRANE FL. The natural occurrence of coenzyme Q and related compounds. J. Biol. Chem, v.234, p. 2169–2175, 1959.

LITTARRU GP, TIANO L. Clinical aspects of coenzyme Q10: an update. **Rev. Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.** v. 8, n. 6, p.:641-646, 2005.

LOCKLESS, S. W.; RANGANATHAN, R.; KUKIC, P.; MIRABELLO, C.; TRADIGO, G.; WALSH, I.; VELTRI, P.; POLLASTRI, G.; SOCOLICH, M.; LOCKLESS, S. W.; RUSS, W. P.; LEE, H.; GARDNER, K. H.; RANGANATHAN, R.; KRETH, K. E.; FODOR, A. a; BALAKRISHNAN, S.; KAMISETTY, H.; CARBONELL, J. G.; LEE, S.-I.; LANGMEAD, C. J.; THORNTON, J. M.; ORENGO, C. a; TODD, a E.; PEARL, F. M. Evolutionarily conserved pathways of energetic connectivity in protein families. **BMC Bioinformatics**, v. 15, n. 5438, p. 295–299, 1999.

LOHMAN, D.C.; FOROUHAR, F.; BEEBE, E.T. STEFELY, M.S.; MINOGUE, C.E.; ULBRICH, A.; STEFELY, J.A. SUKUMAR, S.; LUNA-S_ANCHEZ, M.; JOCHEM, A.; LEW, S.; SEETHARAMAN, J; XIAO, R.; WANG, H.; WESTPHALL, M.S. WROBEL, R.L.; EVERETT, J.K.; MITCHELL, J.C.; L_OPEZ, L.C.; COON, J.J.; TONG, L.; PAGLIARINI, D.J. Mitochondrial COQ9 is a lipidbinding protein that associates with COQ7 to enable coenzyme Q biosynthesis, **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** v. 111, n. 44, p. E4697-4705, 2014.

LÓPEZ-LLUCH G, RODRÍGUEZ-AGUILERA JC, SANTOS-OCAÑA C, NAVAS P. Is coenzyme Q a key factor in aging? **Mech. Ageing Dev**, v. 131, n. 4, p. 225-35, 2010.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., v. 193, p. 265-275, 1951.

LÜTHY, R.; BOWIE, J. U.; EISENBERG, D. Assessment of protein models with three- dimensional profiles. **Nature**, v. 356, n. 6364, p. 83–85, 1992.

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. **J. Biol. Chem,** v. 273, n. 38, p. 24529-24534, 1998.

MARTÍN-MONTALVO, A., GONZÁLEZ-MARISCAL, I., PADILLA-LÓPEZ, S., BALLESTEROS, M. Respiratory- induced coenzyme Q biosynthesis is regulated by a phosphorylation cycle of Cat5p/Coq7p, **Biochem. J**. v.440, p. 104-114, 2011

MARTÍN-MONTALVO, A., GONZÁLEZ-MARISCAL, I., POMARES-VICIANA, T., PADILLA-LÓPEZ, S., BALLESTEROS, M., VAZQUEZ-FONSECA, L., GANDOLFO, P., BRAUTIGAN, D. L., NAVAS, P., SANTOS-OCAÑA, C. The phosphatase Ptc7 induces coenzyme Q biosynthesis by activating the hydroxylase Coq7 in yeast. J Biol. Chem, v.288, p. 28126-28137, 2013. MARBOIS, B. N.; CLARKE, C. F. The COQ7 gene encodes a protein in *Saccharomyces cerevisiae* necessary for ubiquinone biosynthesis. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 2995–3004, 1996.

MARBOIS, B.; GIN, P.; FAULL, K, F.; POON, W. W.; LEE, P. T.; STRAHAN, J. Coq3 and Coq4 Define a Polypepetide Complex in Yeast Mitochondria for the Biosynthesis of Coenzyme Q. **J. Biol. Chem**, v. 280, n. 21, p. 20231-20238, 2005.

MARBOIS, B.; XLE, L. X.; CHOL, S.; HIRANO, K.; HYMAN, K.; CLARKE, C. F. para-Aminobenzoic Acid is a precursor in coenzyme Q_6 biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae. **J. Biol. Chem,** v. 285, p. 27827-27838, 2010.

MARRES, C. A. M.; DE VRIES, S.; GRIVEL, L. A. Isolation and inactivation of the nuclear gene encoding the rotenone-insensitive internal NADH: ubiquinone oxidoreductase of mitochondria from Saccharomyces cerevisiae. **Eur. J. Biochem**, v. 195, p. 857-862, 1991.

MEGANATHAM, R. Ubiquinone biosynthesis in microorganisms. **FEMS Microbiol.** Lett., v. 203, p. 131-139, 2001.

MITCHELL, P. The protonmotive Q cycle: a general formulation. **FEBS Lett.**, v. 59, n. 2, p. 137-139, 1975.

MONTERO, R.; GRAZINA, M.; LOPEZ-GALLARDO, E.; MONTOYA, J.; BRIONES, P.; NAVARRO-SASTRE, A.; LAND, J.M.; HARGREAVES, I.P.; ARTUCH, R.; Q.D.S.G. COENZYME, Coenzyme Q10 deficiency in mitochondrial DNA depletion syndromes. **Mitochondrion**, v. 13, p. 337–341, 2013.

MUHLRAD D., HUNTER R., PARKER R. A rapid method for localized mutagenesis of yeast genes. **Yeast**, v. 8, p. 79–82, 1992.

MUI CHAN, C., ZHOU, C., BRUNZELLE, J.S., HUANG, R.H. Structural and biochemical insights into 2'-O-methylation at the 3'-terminal nucleotide of RNA by Hen1. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, v.106, p. 17699-17704, 2009.

MURAI M, MATSUNOBU K, KUDO S, IFUKU K, KAWAMUKAI M, MIYOSHI H.Identification of the binding site of the quinone-head group in mitochondrial Cog10 by photoaffinity labeling. Biochemistry. v. 53, n.24, p.3995-4003, 2014.

MUSTER, B.; KOHL, W.; WITTIG, I.; STRECKER, V.; JOOS, F.; HAASE, W.; BEREITER-HAHN, J.; BUSCH, K.Respiratory chain complexes in dynamic mitochondria display a patchy distribution in life cells. **Plos One.** v. 5, n. 7, p 1-13, 2010.

NEWMAN, M. E. J.; GIRVAN, M. Finding and evaluating community structure in networks. **Physical Rev,** v. 69, n. 2, p. 026113, 2004.

NIEWMIERZYCKA A, CLARKE S. S-Adenosylmethionine-dependent methylation in Saccharomyces cerevisiae. Identification of a novel protein arginine methyltransferase. **J. Biol. Chem**, v. 274, p. 814–824, 1999.

OHLMEIER, S.; KASTANIOTIS, A.J.; HILTUNEN, J.K.; BERGMANN, U. The Yeast mitochondrial proteome, a study of fermentative and respiratory growth. **The Journal of Biological Chemistry.** v. 279, n. 6, p.3956-3979, 2004.

OZEIR,M.; MUHLENHOFF, U. ; WEBERT, H.; LILL,R.; FONTECAVE, M.; PIERREL,F. Coenzyme Q biosynthesis: Coq6 is required for the C5-hydroxylation reaction and substrate analogs rescue Coq6 deficiency, **Chem. Biol**, v. 18, p. 1134–1142, 2011.

PADILLA, S.; JONASSEN, T.; JIMENEZ-HIDALGO, M. A.; FERNANDEZ- AYALA, D. J.; JOPEZ-LLUCH, G.; MARBOIS, B.; NAVAS, P.; CLARKE, C. F.;

SANTOS-OCAÑA, C. Demethoxy-Q, an intermediate of coenzyme Q biosynthesis, fails to support respiration in Saccharomyces cerevisiae and lacks antioxidant activity. **J. Biol. Chem,** v. 279, p. 25995-26004, 2004.

PIERREL, F., HAMELIN, O., DOUKI, T., KIEFFER-JAQUINOD, S., MÜHLENHOFF, U., OZEIR, M., LILL, R., FONTECAVE, M. Involvement of mitochondrial ferredoxin and para-aminobenzoic acid in yeast coenzyme Q biosynthesis. **Chem. Biol**. v. 17, p. 449-459, 2010.

PINTARD,L., BUJNICKI,J.M., Lapeyre,B. and Bonnerot,C. (2002) MRM2 encodes a novel yeast mitochondrial 21S rRNA methyltransferase. **EMBO J**, v. 21, p. 1139 – 1147, 2002.

POON, W. W.; BARKOVICH, R. J.; HSU, A.Y.; FRANKEL, A.; LEE, P. T.; SHEPHERD, J. N.; MYLES, D. C.; CLARKE, C. F. Yeast and rat Coq3 and Escherichia coli UbiG polypeptides catalyze both O-methyltransferase steps in coenzyme Q biosynthesis. **J. Biol. Chem**, v. 274, p. 21665-21672, 1999.

QUINONES-PARRA, S., GRANT, E., LOH, L., NGUYEN, T.H., CAMPBELL, K.A., TONG, S.Y., MILLER, A., DOHERTY, P.C., VIJAYKRISHNA, D., ROSSJOHN, J., GRAS, S., KEDZIERSKA, K. Preexisting cd8+ t-cell immunity to the h7n9 influenza a virus varies across ethnicities. **PROC.NATL.ACAD.SCI.USA**, v. 111, p.: 1049-1054, 2014.

QUINZII, C., NAINI, A., SALVIATI, L., TREVISSON, E., NAVAS, P., DIMAURO, S., HIRANO, M A mutation in para-hydroxybenzoate-polyprenyl transferase (COQ2) causes primary coenzyme Q10 deficiency. **Am J Hum Genet**. v. 78, p. 345-349, 2006.

RABILLOUD, T.; KIEFFER, S.; PROCACCIO, V.; LOUWAGIE, M.; COURCHESNE, P. L.; PATTERSON, S. D.; MARTINEZ, P.; GARIN, J.; LUNARDI, J. Twodimensional electrophoresis of human placental mitochondria and protein identification by mass spectrometry: toward a human mitochondrial proteome. **Electrophoresis**, v.19, p. 1006-1014, 1998.

RYAN, M.T.; HOOGENRAAD, N.J. Mitochondrial-Nuclear Comunications. **Annu. Rev. Biochem**, v.76, p 701-722, 2007.

ROSE, M.; WINSTON, F.; HIETER, P. Methods in Yeast Genetics: A Laboratory

Course Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1990.

RÖTIG A. Genetic bases of mitochondrial respiratory chain disorders. **Diabets & Metabolism**. v. 36, p. 97-107, 2009.

SAGAN, L. On the origin of mitosing cells. **J. Theor. Biol, v.** 1, n. 3, p. 255-274, 1967.

SALVIATI L, TREVISSON E, RODRIGUEZ HERNANDEZ MA, CASARIN A, PERTEGATO V, DOIMO M, CASSINA M, AGOSTO C, DESBATS MA, SARTORI G, SACCONI S, MEMO L, ZUFFARDI O, ARTUCH R, QUINZII C, DIMAURO S, HIRANO M, SANTOS-OCAÑA C, NAVAS P. Haploinsufficiency of COQ4 causes coenzyme Q10 deficiency. J. Med. Genet, v. 49, p.187-191, 2012.

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

SARASTE, M. Oxidative phosphorylation at the *fin de siècle*. **Science**, v.283, p. 1488 – 1492, 1999.

SAZANOV, L.A. A giant molecular proton pump: structure and mechanism of respiratory complex I. **Nature Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 16, p. 375–388, 2015.

SCHAFFER, S. W.; SULEIMAN, M. S. **Mitochondria:** The dynamic organelle. New York: Springer, 2007. 359 p.

SCHATZ, G.; HASLBRUNNER, E.; TUPPY, H. Desoxyribonucleic acid associated with yeast mitochondria. **Bioc. and Biophy. Res. Com.,** v. 15 p. 127-131, 1964.

SHARMA, S.; MOON, C.S.; KHOGALI, A.; HAIDOUS, A.; CHABENNE, A.; OJO, C.; JELEBINKOV, M.; KURDI, Y.; EBADI, M. Biomarkers in Parkinson's disease (recent update), **Neurochem. Int,** v. 63, p. 201–229, 2013.

SCHWIMMER, C.; RAK, M.; LEFEBVRE-LEGENDRE, L.; DUVEZIN-CAUBET, S.; PLANE, G.; DI RAGO, J.P. Yeast models of human mitochondrial diseases:From molecular mechanisms to drug screening. **Biotechnol. J**, v. 1, p. 270–281, 2006.

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

SHERMAN, F.; HICKS, J. Micromanipulation and dissection of asci. **Methods in Enzymology**, v. 194, p. 21-37, 1992.

SIRUM-CONNOLLY K, MASON TL The role of nucleotide modifications in the yeast mitochondrial ribosome. **Nucleic Acids Symp Ser**, v. 33, p.73-75, 1995.

STEFELY, J.A.; REIDENBACH, A.G.; ULBRICH, A.; ORUGANTY, K.; FLOYD, B.J.; JOCHEM, A.; SAUNDERS, J.M.; JOHNSON, I.E.; MINOGUE, C.E.; . WROBEL, R.L; BARBER, G.E.; LEE, D.; LI, S.; KANNAN, N.; COON, J.J.; BINGMAN, C.A.; PAGLIARINI, D.J. Mitochondrial ADCK3 employs an atypical protein kinase-like fold to enable coenzyme Q biosynthesis, **Mol. Cell,** v. 57, p. 83-94, 2015.

STENMARK, P.; GRUNLER, J.; MATTSSON, J.; SINDELAR, P. J.; NORDLUND, P.; BERTHOLD, D. A. A new member of the family of di-iron carboxylate proteins. Coq7 (clk-1), a membrane-bound hydroxylase involved in ubiquinone biosynthesis. **J. Biol. Chem,** v. 276, n. 36, p. 33297-33300. 2001.

STRUHL K. Nucleotide sequence and transcriptional mapping of the yeast pet56his3-ded1 gene region. **Nucleic Acids Res**, v. 13, n. 23, p. 8587-601, 1985.

SUEL, G.M.; LOCKLESS, S.W.; WALL, M.A.; RANGANATHAN, R. Evolutionarily conserved networks of residues mediate allosteric communication in proteins. **Nat. Struct. Biol**, v. 10, p. 59-68, 2003.

SUSIN, S. A.; LORENZO, H. K.; ZAMZAMI, N.; MARZO, I.; SNOW, B. E.; BROTHERS, G. M.; MANGION, J.; JACOTOT, E.; COSTANTINI, P.; LOEFFLER, M. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. **Nature**, v. 397, n. 6718, p. 441–446, 1999.

SUZUKI K, UEDA M, YUASA M, NAKAGAWA T, KAWAMUKAI M, MATSUDA H. Evidence that Escherichia coli ubiA product is a functional homolog of yeast COQ2, and the regulation of ubiA gene expression. **Biosci. Biotechnol. Biochem,** v. 58, n.10, p. 1814-1819, 1994.

TAIT, S. W.; GREEN, D. R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol**, v. 11, p. 621-632, 2010.

TAUCHE, A.; KRAUSE-BUCHHOLZ, U.; RÖDEL, G. Ubiquinone biosynthesis in Saccharomyces cerevisiae: the molecular organization of O-methylase Coq3 depends on Abc1p/Coq8p. **FEMS Yeast Res**, v. 8, p. 1263-1275, 2008.

TRAN, U. C.; MARBOIS, B.; GIN, P.; GULMEZIAN, M.; JONASSEN, T.; CLARKE, C. F. Complementation of Saccharomyces cerevisiae coq7 mutants by mitochondrial targeting of the Escherichia coli UbiF Polypeptide: two functions of yeast Coq7 polypepide in coenzyme Q biosynthesis. **J. Biol. Chem**, v. 281, p. 16401-16409, 2006.

TRAN, Y. C.; CLARKE, C. F. Endogenous synthesis of coenzyme Q in eukaryotes. **Mitochondrion**, v. 7, p. S62-S71, 2007.

TRAN, P.H., KORSZUN, Z.R., CERRITELLI, S., SPRINGHORN, S.S., LACKS, S.A. Crystal structure of the DpnM DNA adenine methyltransferase from the DpnII restriction system of streptococcus pneumoniae bound to S-adenosylmethionine. **Structure**, v. 6, p. 1563-1575, 1998.

TRUMPOWER, B. L. The Protonmotive Q Cycle. **J. Biol. Chem**, v. 265, n. 20, p. 11409-11412, 1990.

TURUNEN, M.; OLSSON, J.; DALLNER, G. Metabolism and function of coenzyme Q. **Biochim. Biophys. Acta**,v. 1660, p. 171-199, 2004.

TZAGOLOFF, A.; AKAI, A.; NEEDLEMAN, R. B. Assembly of the mitochondrial membrane system. Characterization of nuclear mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with defects in mitochondrial ATPase and respiratory enzymes. J. Biol. Chem, v. 250, p. 8228-8235, 1975.

TZAGOLOFF, A. Mitochondria. 1st. New York: Plenum Press, 1982.

TZAGOLOFF, A.; DIECKMANN, C. L. *PET* Genes of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol. Rev,** v. 54, n. 9, p. 211-225, 1990.

TZAGOLOFF, A.; MYERS, A. M. Genetics of mitochondrial biogenesis. **Ann. Rev. Biochem**, v. 55, p. 249–285, 1986.

VANLERBERGHE, G. C.; MCINTOSH, L. Alternative oxidase: from gene to function. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol**., v. 48, p. 703-734, 1997.

WALLACE, D. C. A mitochondrial Paradigm of Metabolic and Degenerative Diseases, Aging, and Cancer: A Dawn for Evolutionary Medicine. **Annu. Rev. Genet.**, v. 39, p. 359–407, 2005.

WANG Y, HEKIMI S. Mitochondrial respiration without ubiquinone biosynthesis. **Hum. Mol. Genet,** v. 22, n. 23, p. 4768-4783, 2013.

WHEELER, B., JIA, Z. Preparation and characterization of human ADCK3, a putative atypical kinase. **Protein Expr. Purif**, v.108, p. 13-17, 2015.

WINDE, J.H.; GRIVELL, L.A. Global regulation of mitochondria biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Bio,** v. 45, p. 51-91, 1993.

WONG, L.C. Molecular genetics of mitochondrial disorders. **Develop. Disab. Res. Rev,** v.16, p.154 – 162, 2010.

XIE, L. X., HSIEH, E. J., WATANABE, S., ALLAN, C. M., CHEN, J. Y., TRAN, U. C., CLARKE, C. F. Expression of the human atypical kinase ADCK3 rescues coenzyme Q biosynthesis and phosphorylation of Coq polypeptides in yeast coq8 mutants. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1811, p. 348-360, 2011.

XIE, L. X., OZEIR, M., TANG, J. Y., CHEN, J. Y., JAQUINOD, S. K., FONTECAVE, M., CLARKE, C.F., PIERREL, F. Overexpression of the Coq8 Kinase in Saccharomyces cerevisiae coq Null Mutants Allows for Accumulation of Diagnostic Intermediates of the Coenzyme Q₆ Biosynthetic Pathway. **J. Biol. Chem**, *v*. 287, p. 23571-23581, 2012.

XING, G.; CHEN, Z.; CAO, X. Mitochondrial rRNA and tRNA and hearing function. **Cell Research**, v.17, p. 227-239, 2007.

YANISCH-PERRON ,C., VIEIRA, J. ; MESSING , J..Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors, **Gene**, v. 33, p. 103-119, 1985.

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

ZHANG, F.; PRACHEIL, T.; THORNTON, J.; LIU, Z. Adenosine Triphosphate (ATP) Is a Candidate Signaling Molecule in the Mitochondria-to-Nucleus Retrograde Response Pathway. **Genes**, v. 4, n. 1, p. 86–100, 2013.

ZUBIETA, C., KOTA, P., FERRER, J.L., DIXON, R.A., NOEL, J.P. Structural basis for the modulation of lignin monomer methylation by caffeic acid/5-hydroxyferulic acid 3/5-O-methyltransferase. **Plant Cell**, v. 14, p 1265-1277, 2002.

ANEXOS

A - Primers utilizados para a amplificação dos fragmentos de Coq7.

Linhagem	Primer	Sequência 5'-3'	Tamanho amplificado
pCOQ7/TS3	YEP351F	GGAATTGTGAGCGGATAA	2500 mb
coq7D53G	YEP351R	GGGTAACGCCAGGGTTTTCCC	2500 pb
pCOQ7/ST40	YEP351R	GGGTAACGCCAGGGTTTTCCC	720 ph
coq7S114A	S114A	GGAGAGTCAGGCCTGCCTTAA	720 pb
pCOQ7/ST41	YEP351F	GGAATTGTGAGCGGATAA	1422 hn
coq7V111G	V111G	GGAAGGCCTGCCTCTCCTTTC	1432 bp
pCOQ7/ST51	YEP351R	GGGTAACGCCAGGGTTTTCCC	720 pb
	C11/E	GGCAGGCCTGAGTTATTAACGCCTTTGTGGAAG	
000751141	3114L	GC	
pCOQ7/ST56	YEP351F	GGAATTGTGAGCGGATAA	700 pb
coq7T32D,S28E	S20D, S28E, T32D	GGAGCATGCTCAGGTTTTTCGGCGTGTTTTGCTG	
,S20D		CTGTATGTTCTGTTATCTTTAAAGC	
nCOO7/STE0	YEP351R	GGGTAACGCCAGGGTTTTCCC	
cog78570	R57	TGAGCATGCTCCCAAGTGTCAGAATTTATCAGAT	720 pb
COUTROTA		GCTCAGGCTGCATTTTTGGACCGTGTTATTGCT	

Reação	Primer	Sequência	Posição relativa de anelamento /tamanho amplificado
1	Coq3-S33A-F	ACG AGA TGT AAG GCC ACA GAT GCT	1085 pb /590 pb
2	Coq3-S33A-R	AGC ATC TGT GGC CTT ACA TCT CGT	1108 pb/1218 pb
5	Coq3-Y101A-F	GTT TCT ACC AGA AGC CGT CTG CGA C	1287 pb /794 pb
6	Coq3-Y101A-R	GTC GCA GAC GGC TTC TGG TAG AAA C	1312 pb /978 pb
7	Coq3-S113A-F	GAA ATG CAG GAA GCC ATA GAG ACT AAT C	1325 pb/834 pb
8	Coq3-S113A-R	GAT TAG TCT CTA TGG CTT CCT GCA TTT C	1352 pb /948 pb
9	Coq3-E123A-F	GAT AAG AGG CCA GCA GTG AGC GTC	1354 pb /860 pb
10	Coq3-E123A-R	GAC GCT CAC TGC TGG CCT CTT ATC	1378 pb /939 pb
11	Coq3-S125A-F	CCA GAA GTG GCC GTC TTG GAT GTT G	1364 pb /870 pb
12	Coq3-S125A-R	CAA CAT CCA AGA CGG CCA CTT CTG G	1389 pb /931 pb
13	Coq3-D128A-F	G AGC GTC TTG GCT GTT GGA TGC	1378 pb /875 pb
14	Coq3-D128A-R	GCA TCC AAC AGC CAA GAC GCT C	1393 pb/927 pb
19	Coq3-H165A-F	GTA GCA AAA GAG GCT GCC AAG AAA G	1481 pb/987 pb
20	Coq3-H165A-R	CTT TCT TGG CAG CCT CTT TTG CTA C	1505 pb /783 pb
22	Coq3-Y178A-R	CTT GCA CTC AGC ATT TAT CTT TCC	1543 pb /1025 pb
23	Coq3-D191A-F	ACT GGA CAA TTT GCT ATT ATC ACC	1558 pb /744 pb
24	Coq3D191A-R	GGT GAT AAT AGC AAA TTG TCC AGT	1582 pb/1064 pb
25	Coq3-E200A-F	GAA ATG CTA GCG CAC GTG GAT ATG	1589 pb /714 pb
26	Coq3-E200A-R	CAT ATC CAC GTG CGC TAG CAT TTC	1613 pb /1094 pb
27	Coq3-E203A-F	CTA GAG CAC GTG GCT ATG CCT AGT G	1595 pb /708 pb
28	Coq3-E203A-R	CAC TAG GCA TAG CCA CGT GCT CTA G	1619 pb/1101 pb
29	Coq3-E219A-F	AGG TTA AAT CCC GCA AAA GGT ATA C	1642 pb /660 pb
30	Coq3-E219A-R	GTA TAC CTT TTG CGG GAT TTA ACC T	1667 pb/1149 pb
31	Coq3-G221A-F	AAT CCC GAA AAA GCG ATA CTC TTT	654
32	Coq3-G221A-R	AAA GAG TAT CGC TTT TTC GGG ATT	1154
33	Coq3-E227A-F	GGT ATC CTC TTC TTA AGT GCT ATC AAC AGA GAT CTC	642
34	Coq3-E227A-R	GAG ATC TCT GTT GAT AGC ACT TAA GAA GAG	1178
35	Cog3-1228G-E		634
36	Cog3-1228G-R		1176
37	Cog3-T238A-F		604
38	Cog3-T238A-R		1205
39	Cog3-G252A-F	GTC CCA AAG GCT ACT CAT CAT TTG	558
40	Cog3-G252A-R	CAA ATG ATG AGT AGC CTT TGG GAC	1250
41	Cog3-T253A-F	GTC CCA AAG GGT GCT CAT CAT TTG	558
42	Cog3-T253A-R	CAA ATG ATG AGC ACC CTT TGG GAC	1250
43	Coq3-K258A-F	CAT CAT TTG AGC GCA TAC ATA AAC	543

B - Primers utilizados para a amplificação dos fragmentos de *Coq3* a serem utilizados para posterior reação de sobreposição.

40 47 48	Coq3-S262A-R	GAT TTC CTT TGC GTT TAT GTA TTT G	1795 pb/1277 pb
46			
40	Coq3-S262A-F	CAA ATA CAT AAA CGC AAA GGA AAT C	1771 pb/532 pb
10	Coq3-T259A-R	CTT TGA GTT TAT GGC TTT GCT CAA ATG	1271
45	Coq3-T259A-F	CAT TTG AGC AAA GCC ATA AAC TCA AAG	540
44	Coq3-K258A-R	GTT TAT GTA TGC GCT CAA ATG ATG	1265

*Considerando o ATG inicial do respectivo gene na posição 1001.

C - Cromatogramas representativos da detecção de Q₆ e seus intermediários e mutantes coq3.

Analisou-se a síntese de Q₆ e seus intermediários por HPLC, como descrito nos materiais e métodos, a partir 2mg de extrato proteico extraído de mitocôndrias obtidas da linhagem selvagem (W303) e mutantes *coq3 (coq3*^{H201A}, coq3^{D203A}, coq3^{E219A}, *coq3*^{T227A}, *coq3*^{R230A}, *coq3*^{H254A}, *coq3*^{K258A}, coq3^{S262A}) crescidas em meio galactose a 30 °C. Foram comparados com o padrão de picos produzidos pela análise de 5mg de Coenzima Q₆.



D - Modelos representativos do alinhamento para comparação estrutural entre o modelo de Coq3p e outras proteínas da família PF1349, através do servidor TopMatch.

O painel A é referente ao alinhamento com o pdb 5dly, o painel B pode-se observar o alinhameto com o pdb 5dm1, e o painel C, o alinhamento com o pdb 4O29. Os painéis D,E, F e G referem-se ao alinhamento com as estruturas 2DPM, 4RFQ E 2AOT, respectivamente.

Em todos os esquemas é possível verificar o alinhamento estrutural entre o modelo de Coq3p, feito através do servidor Robetta, colorido laranja e azul, alinhado com o pdb de outros modelos da família, coloridos em vermelho e verde. Entre os 17 resíduos analisados (Tabela 11) há uma alça conservada em forma de "w", que em nosso modelo é composta pelos resíduos G130, C131, G133 e G134, localizados entre as hélices 5 e 6.



E - Coq7p relevant residues for protein activity and strability.

29/11/2017	Coq7p relevant residues for protein activity and stability PubMed - NC	ВІ
PubMed v		
Format: Abstract		Full text links
Biochimie. 2015 Dec;119:92-102. d	bi: 10.1016/j.biochi.2015.10.016. Epub 2015 Oct 21.	ELSEVIER FULLTEXT ARTICLE

Coq7p relevant residues for protein activity and stability.

Busso C¹, Ferreira-Júnior JR², Paulela JA³, Bleicher L⁴, Demasi M⁵, Barros MH⁶.

Author information

Abstract

Coenzyme Q (Q) is an isoprenylated benzoquinone electron carrier required for electronic transport in the mitochondrial respiratory chain, shuttling electrons from complexes I and II to complex III. Q synthesis requires proteins termed Coq (Coq1-Coq11). Coq7p is part of the multimeric complex involved in Q synthesis catalyzing the hydroxylation of demethoxy-Q6 (DMQ6), the last monooxygenase step in Q synthesis with a catalytic center containing a carboxylate-bridged di-iron at the active site of the enzyme. Here we indicate a group of Coq7p residues that modulate protein activity: D53, R57, V111 and S114. R57, V111 and S114 are very conserved residues; V111 and S114 are present in separated communities of amino acid correlation analysis. The coq7 double mutant V111G/S114A and S114E show respiratory deficiency at non permissive temperature, DMQ6 accumulation and lower content of Q6. Therefore we conclude that phosphomimetic S114E inhibit Coq7p activity, and propose that S114 phosphorylation is required to move a non-structured loop of 25 amino acids between helix 2 and 3, and that affects the di-iron coordination in Coq7p catalytic center.

KEYWORDS: Coenzyme Q; Coq7p; Phosphorylation

PMID: 26497406 DOI: <u>10.1016/j.biochi.2015.10.016</u> [Indexed for MEDLINE]

Publication type, MeSH terms, Substances

LinkOut - more resources

PubMed Commons

0 comments

PubMed Commons home

How to join PubMed Commons

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26497406