Universidade Estadual Paulista – UNESP
Faculdade De Ciências Agrárias e Veterinárias
Câmpus de Jaboticabal

MECANISMOS TECIDO-ESPECÍFICOS DE MANUTENÇÃO DO DNA MITOCONDRIAL DE DROSÓFILA

AUDREY CAROLINA NOVAES

Orientador: Prof. Dr. Marcos Túlio de Oliveira

Trabalho apresentado à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Câmpus de Jaboticabal, para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Jaboticabal – SP
2º semestre de 2023

N935m

Novaes, Audrey Carolina
Mecanismos tecido-específicos de manutenção do DNA mitocondrial de drosófila / Audrey Carolina Novaes. -- Jaboticabal, 2023
32 p. : il., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Marcos Túlio de Oliveira

1. Mitocôndria. 2. Drosophila melanogaster. 3. Transcriptoma. 4. Expressão gênica. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CÂMPUS DE JABOTICABAL

DEPARTAMENTO: BIOTECNOLOGIA AGROPECUÁRIA E AMBIENTAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TÍTULO : MECANISMOS TECIDO-ESPECÍFICOS DE MANUTENÇÃO DO DNA MITOCONDRIAL DE DROSÓFILA

ACADÊMICO: Audrey Carolina Novaes

CURSO: Ciências Biológicas

ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Marcos Tulio de Oliveira

Aprovado e corrigido de acordo com as sugestões da Banca Examinadora

BANCA EXAMINADORA:

	(Nomes)	(Assinaturas)
Presidente	Prof. Dr. Marcos Tulio de Oliveira	
Membro	Dr. Carlos Antonio Couto Lima	
Membro	Dr. Mauro de Medeiros Oliveira	

Jaboticabal 09 / 11 / 2023

Aprovado em reunião do Conselho do Departamento em: 09 / 11 / 2023

Chefe do Departamento

SUMÁRIO

RESUMO V
ABSTRACT VI
INTRODUÇÃO 7
OBJETIVO 8
REVISÃO DE LITERATURA 9
Mitocôndrias 9
Manutenção do DNA mitocondrial 10
Replicação do DNA mitocondrial 11
Transcrição do DNA mitocondrial 13
Reparo do DNA mitocondrial 14
Fosforilação oxidativa (OXPHOS) 15
O modelo *D. melanogaster* 16
MATERIAIS E MÉTODOS 17
Obtenção dos dados de expressão dos genes 17
Elaboração dos materiais para análise 19
RESULTADOS E DISCUSSÃO 20
CONCLUSÃO 29
REFERÊNCIAS 30

RESUMO

As mitocôndrias são organelas importantes para diversos processos celulares, como por exemplo a produção de energia através do processo de fosforilação oxidativa. Elas são formadas por uma membrana externa, uma membrana interna que possui invaginações projetadas para o interior, chamadas de cristas mitocondriais, e a matriz mitocondrial localizada internamente à membrana interna. A mitocôndria é a única organela da célula animal que possui um genoma próprio, que fica dentro da matriz mitocondrial. A manutenção do DNA mitocondrial, que se divide em replicação e reparo, é de extrema importância, pois o número de cópias e a integridade do mtDNA devem ser mantidos para proteger a função mitocondrial. A mosca *Drosophila melanogaster* é um organismo modelo interessante para estudar a manutenção do DNA mitocondrial devido ao seu genoma mitocondrial ser semelhante ao dos vertebrados em sua estrutura geral e modo de organização. Neste estudo foram realizadas análises a partir de dados transcriptômicos de expressão de genes de manutenção e reparo do DNA mitocondrial e de genes presentes no processo OXPHOS de *D. melanogaster*, para que fossem investigados mecanismos e correlações entre eles. Foram encontrados padrões de correlações bastante inesperados, negativamente entre PolG2 e os outros genes envolvidos na replicação do mtDNA, e positivamente entre PolG2 e genes envolvidos na transcrição do mtDNA. Os resultados sugerem papéis adicionais aos já relatados para PolG2.

Palavras-chave: mitocôndria, *Drosophila melanogaster*, transcriptoma, expressão gênica.

ABSTRACT

Mitochondria are important organelles for several cellular processes, such as energy production through the process of oxidative phosphorylation. They consist of an outer membrane, an inner membrane with invaginations projecting towards the interior, known as mitochondrial cristae, and the mitochondrial matrix located inside the inner membrane. Mitochondria are the only organelles in animal cells that have their own genome, which is located within the mitochondrial matrix. The maintenance of mitochondrial DNA, which involves replication and repair, holds significant importance, as the number of copies and the integrity of mtDNA must be preserved to protect mitochondrial function. The fly *Drosophila melanogaster* serves as an interesting model organism for the study of mitochondrial DNA maintenance, due to its mitochondrial genome's structural similarity and organization to that of vertebrates. In this study, analyses were conducted using transcriptomic data on the expression of mitochondrial DNA maintenance and repair genes, and OXPHOS related genes in *D. melanogaster*, so that mechanisms and correlations between them could be investigated. Quite unexpected patterns of correlations were found, negatively between PolG2 and the other genes involved in mtDNA replication, and positively between PolG2 and genes involved in mtDNA transcription. These results suggest additional roles to those previously documented for PolG2.

Keywords: mitochondria, *Drosophila melanogaster*, transcriptome, gene expression.

INTRODUÇÃO

As mitocôndrias são as únicas organelas da célula animal que possuem um genoma próprio, denominado DNA mitocondrial (mtDNA), que é altamente conservado entre a maioria das espécies animais. Entre os animais multicelulares, o mtDNA quase sempre é uma molécula circular fechada, de dupla fita, contendo 37 genes e é herdado maternalmente (BOORE, 1999).

Mutações no mtDNA são uma das principais causas de doenças genéticas. A herança exclusivamente materna e a presença de até milhares de cópias de mtDNA em cada célula de mamífero resultam em uma complexidade no controle destas mutações (ELLIOTT et al., 2008). A maioria das mutações patogênicas do mtDNA são heteroplásmicas (presença de dois ou mais genomas mitocondriais diferentes dentro de uma célula), e com quantidades diferentes de mtDNA mutado em cada célula (ELLIOTT et al., 2008; TUPPEN et al., 2010). A expressão fenotípica da doença depende da proporção de mtDNA mutado em relação ao de tipo selvagem. O defeito só é desencadeado quando um nível crítico é excedido, e este nível varia de mutação para mutação (ELLIOTT et al., 2008).

Manter a estabilidade do DNA mitocondrial, com relação à quantidade e à qualidade, é importante para que as mitocôndrias possam continuar a realizar as diversas funções que desempenham na geração de ATP, no metabolismo, na morte celular programada por apoptose, etc. Muitos dos mecanismos de manutenção do mtDNA não são bem compreendidos ainda (ALLKANJARI; BALDOCK, 2021; BOORE, 1999; DAHAL; DUBEY; RAGHAVAN, 2018).

Drosophila melanogaster é um organismo modelo promissor para estudar o mtDNA, devido às suas características e à quantidade de ferramentas genéticas disponíveis. Além disto, seu genoma mitocondrial se assemelha ao dos vertebrados e um conjunto semelhante de enzimas e fatores para a manutenção do mtDNA está presente tanto nas mitocôndrias de drosófila como nas dos vertebrados (GONZÁLEZ DE CÓZAR et al., 2019; JÕERS; JACOBS, 2013).

Os resultados obtidos e mostrados neste trabalho foram publicados no artigo “Mitochondrial DNA maintenance in *Drosophila melanogaster*”, de Rodrigues et al. (2022).

OBJETIVO

O objetivo geral deste trabalho é coletar dados transcriptômicos tecido-específicos de expressão de genes relacionados à manutenção do DNA mitocondrial de *D. melanogaster* disponíveis em banco de dados públicos, para inferir mecanismos e padrões através da correlação de seus níveis de expressão.

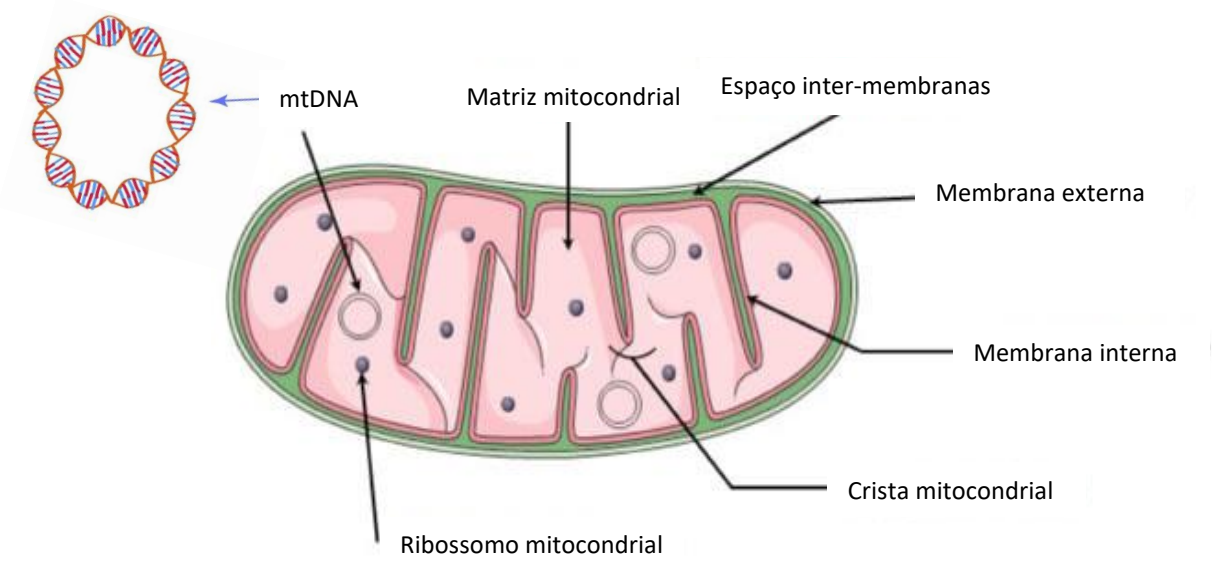
Os objetivos específicos são construção do conjunto de dados do transcriptoma de *D. melanogaster* com transcritos associados ao mtDNA; identificação de genes ortólogos entre *Homo sapiens* e *D. melanogaster*; rotulação e classificação do perfil genético da manutenção do genoma mitocondrial através da expressão gênica em diferentes tecidos e idade fisiológica de *D. melanogaster*.

REVISÃO DE LITERATURA

Mitocôndrias

As mitocôndrias são organelas importantes para diversos processos celulares, sendo um dos principais a produção de energia na forma de adenosina trifosfato (ATP, do inglês *adenosine triphosphate*) através do processo de fosforilação oxidativa (OXPHOS, do inglês *oxidative phosphorylation*) durante a respiração celular. Estruturalmente, são formadas por uma membrana externa, uma membrana interna que possui invaginações projetadas para o interior, chamadas de cristas mitocondriais, e a matriz mitocondrial localizada internamente à membrana interna (Figura 1) (VAKIFAHMETOGLU-NORBERG; OUCHIDA; NORBERG, 2017).

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura da mitocôndria.



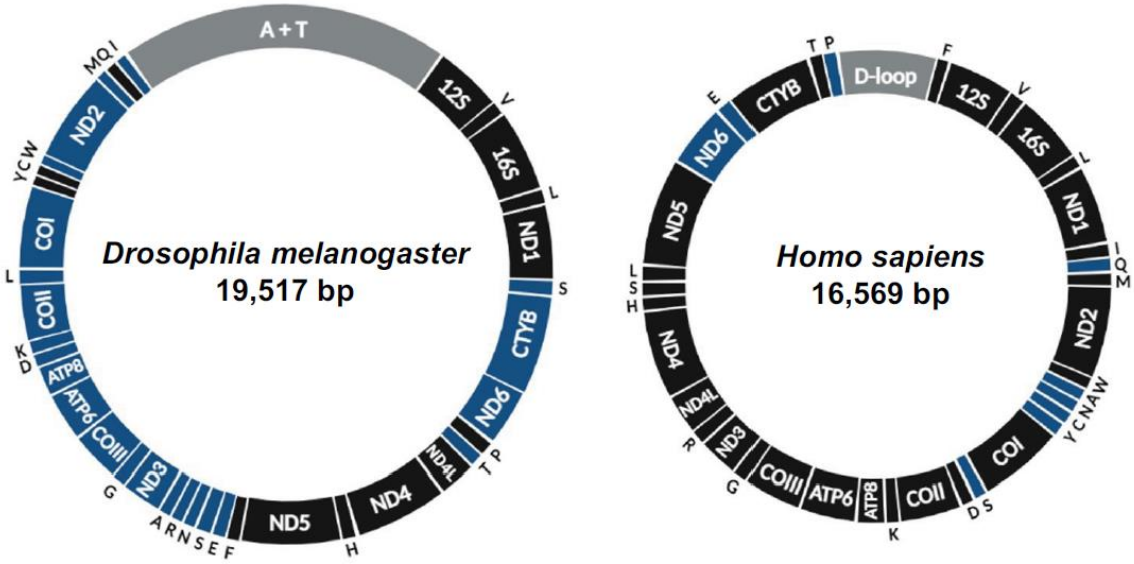
Fonte: adaptado de (ANDRIEUX et al., 2021).

Segundo a teoria endossimbiótica, as mitocôndrias se originaram de procariotos que foram internalizados por células eucarióticas primitivas, e por isto é a única organela da célula animal que possui um genoma próprio. O DNA mitocondrial está presente dentro da matriz mitocondrial, sendo que cada mitocôndria pode possuir até 10 cópias do mtDNA, podendo chegar a até milhares de cópias por célula (ALLKANJARI; BALDOCK, 2021; CIESIELSKI; OLIVEIRA; KAGUNI, 2016; PEARCE et al., 2017).

O genoma original do procarioto endossimbionte sofreu redução ao longo da evolução, pois vários genes foram transferidos para o núcleo ou foram perdidos devido à

redundância. Atualmente o mtDNA da maioria das espécies animais é circular e é composto por 37 genes que codificam 13 proteínas da cadeia respiratória, 22 RNA transportadores e 2 RNA ribossomais (ALLKANJARI; BALDOCK, 2021; PEARCE et al., 2017). Apesar de conter a mesma quantidade de genes, o mtDNA de humanos e de drosófilas difere na quantidade de pares de bases (bp, do inglês *base pair*), sendo que o de humanos possui 16.569 bp (Figura 2) (ANDERSON et al., 1981), enquanto o de drosófila possui 19.517 bp (Figura 2) (LEWIS; FARR; KAGUNI, 1995).

Figura 2 - Representação esquemática dos genomas mitocondriais de *D. melanogaster* e *H. sapiens*. As regiões não codificantes são mostradas em cinza; os genes codificados nas cadeias pesada e leve são mostrados em preto e azul, respectivamente. Os genes de RNA de transferência são indicados por símbolos de uma letra e os genes de RNA ribossômico pequeno e grande por *12S* e *16S*, respectivamente.



Fonte: (RODRIGUES et al., 2022).

Manutenção do DNA mitocondrial

Qualquer genoma está sob a pressão de diversos fatores que podem levar a danos ao material genético se não reparados (DAHAL; DUBEY; RAGHAVAN, 2018). Como a mitocôndria está envolvida na respiração celular, na geração de ATP e na OXPHOS, ela é exposta continuamente a espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*), o que eleva os níveis de dano oxidativo ao DNA mitocondrial (ALLKANJARI; BALDOCK, 2021).

Embora tenha sido relatado um aumento de mais de 50 vezes de mutações no mtDNA, quando comparado com o DNA nuclear, o mecanismo de reparo associado a ele

não é bem estudado, sendo que se acreditava que as mitocôndrias eram desprovidas de tais mecanismos, por conta da ausência dos genes relacionados ao reparo de DNA. Porém, estudos sugeriram que a maioria das proteínas envolvidas no reparo do mtDNA são importadas para as mitocôndrias a partir do citoplasma ou do núcleo (DAHAL; DUBEY; RAGHAVAN, 2018).

A diminuição do genoma mitocondrial, a perda de cópias funcionais de mtDNA ou o acúmulo de mutações estão relacionados com o envelhecimento e diversas doenças e síndromes, como a doença de Parkinson e câncer (ALLKANJARI; BALDOCK, 2021; CHEN, 2013; DAHAL; DUBEY; RAGHAVAN, 2018). Estes danos podem ser reparados na mitocôndria a partir de alguns processos, como o reparo por excisão de base (BER, do inglês *base excision repair*), a recombinação homóloga (HR, do inglês *homologous recombination*) e a junção final mediada por micro homologia (MMEJ, do inglês *microhomology-mediated end joining*) (ALLKANJARI; BALDOCK, 2021).

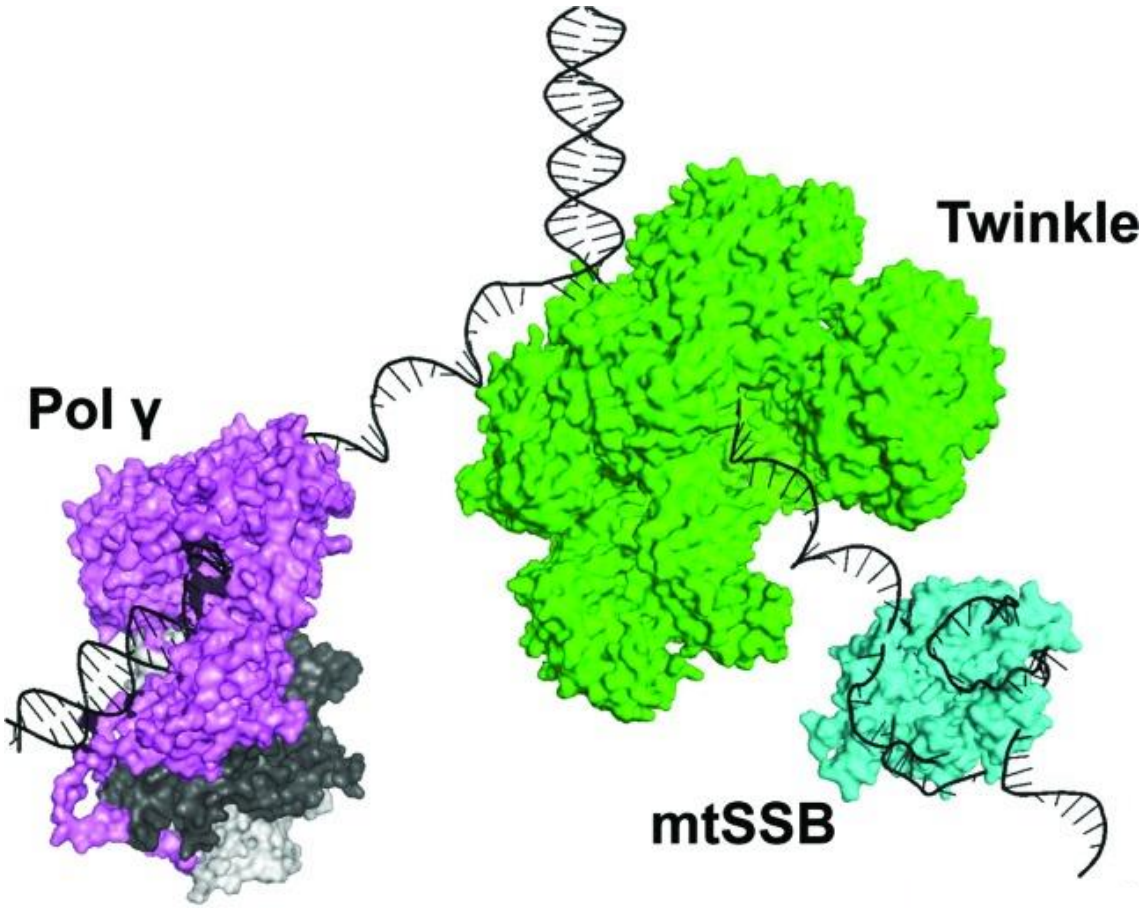
A manutenção do DNA mitocondrial, que se divide em replicação e reparo, é de extrema importância, pois o número de cópias e a integridade do mtDNA devem ser mantidos para proteger a função mitocondrial. (ALLKANJARI; BALDOCK, 2021).

Replicação do DNA mitocondrial

A síntese e multiplicação rigorosas do genoma mitocondrial são requisitos fundamentais para o funcionamento normal de um organismo. Portanto a replicação do mtDNA tem sido intensamente estudada há décadas (JÕERS; JACOBS, 2013).

Na bifurcação da forquilha de replicação, a helicase replicativa do DNA mitocondrial Twinkle desenrola o DNA de fita dupla, liberando DNA de fita simples, que é estabilizado e protegido da nucleólise pela proteína mitocondrial de ligação ao DNA de fita simples (mtSSB). O DNA de fita simples é então usado como molde pela DNA polimerase gamma (Pol γ) para a síntese de uma nova fita de DNA (Figura 3) (CIESIELSKI; OLIVEIRA; KAGUNI, 2016; MCKINNEY; OLIVEIRA, 2013). Estudos especulam que além de mutações nos componentes do replissoma, a desregulação de seus níveis, alterando a estequiometria na forquilha de replicação, também é prejudicial e pode resultar na formação de deleções de mtDNA (CIESIELSKI et al., 2018; OLIVEIRA; PONTES; CIESIELSKI, 2020).

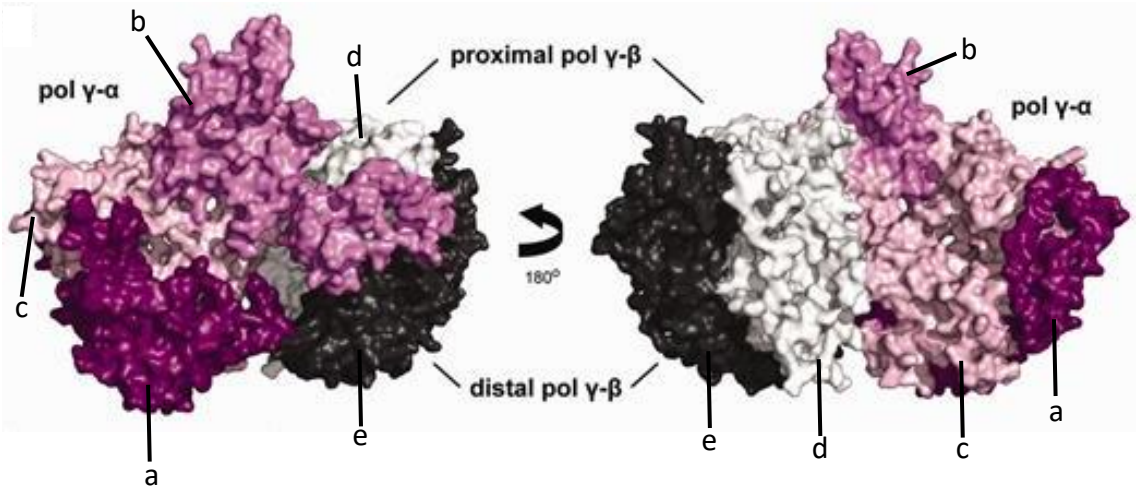
Figura 3 - Proteínas na forquilha de replicação do DNA mitocondrial.



Fonte: adaptado de (OLIVEIRA; PONTES; CIESIELSKI, 2020).

A Pol γ de vertebrados é uma replicase heterotrimérica que compreende uma subunidade catalítica (Pol γ-α, POLG ou PolGA) e duas subunidades acessórias (Pol γ-β, POLG2 ou PolGB) (Figura 4), enquanto a de insetos é um heterodímero formado por um polipeptídeo Pol γ-α e um único Pol γ-β. O núcleo catalítico realiza as atividades 5'-3' DNA polimerase e 3'-5' exonuclease da holoenzima, e a subunidade acessória atua como um fator de processividade, aumentando as interações entre a holoenzima e o substrato de DNA (CIESIELSKI; OLIVEIRA; KAGUNI, 2016; OLIVEIRA; HAUKKA; KAGUNI, 2015). Mutações patogênicas nos genes que codificam as subunidades catalítica e acessória da Pol γ (genes *POLG* e *POLG2* em humanos, respectivamente) associam-se com inúmeras doenças humanas. Por exemplo, uma atividade exonucleotídica prejudicada causa envelhecimento precoce em camundongos e outros modelos de mamíferos (TRIFUNOVIC et al., 2004).

Figura 4 - Representação de superfície da estrutura da Pol γ humana. Rosa escuro (a) indica o domínio responsável pela atividade de exonuclease; rosa médio (b) indica a região espaçadora, que conecta o domínio exonuclease ao domínio polimerase da Pol γ-α; rosa claro (c) representa o domínio responsável pela atividade de polimerase; branco (d) e preto (e) representam a Pol γ-β proximal e distal, respectivamente.



Fonte: adaptado de (OLIVEIRA; HAUKKA; KAGUNI, 2015).

A proteína Twinkle possui grande similaridade com a proteína do gene 4 do bacteriófago T7 (T7 gp4), que contém atividades catalíticas de helicase e primase, sendo que a sequência de aminoácidos do domínio helicase de T7 gp4 é bem conservada na Twinkle, enquanto a do domínio primase não é, o que sugere que ela funciona como uma helicase do mtDNA. Twinkle forma hexâmeros in vitro, semelhantes aos encontrados em T7 gp4, sendo o hexâmero a forma funcional da enzima (MATSUSHIMA; KAGUNI, 2007; SPELBRINK et al., 2001).

Proteínas de ligação ao DNA de fita simples, incluindo mtSSB, são essenciais no metabolismo do DNA, pois têm a função de ligar e proteger o DNA de fita simples durante a replicação, reparo e recombinação. A mtSSB coordena as interações no replissoma, estimulando a função de Pol γ e Twinkle. A proteína mtSSB é homóloga aos SSBs homotetraméricos de eubactérias, o que indica que a mtSSB dos metazoários é homotetramérica (CIESIELSKI; OLIVEIRA; KAGUNI, 2016; MCKINNEY; OLIVEIRA, 2013).

Transcrição do DNA mitocondrial

A maquinaria de transcrição mitocondrial sintetiza os iniciadores de RNA necessários para o início da síntese da cadeia principal de DNA. A transcrição mitocondrial em humanos é realizada pela RNA polimerase mitocondrial (POLRMT) e inicia-se a partir

de dois promotores na região reguladora em cada fita do genoma mitocondrial, resultando em longos transcritos que são processados em suas unidades primárias individuais por enzimas (HOLT, 2019; PAJAK et al., 2019; WANROOIJ et al., 2008).

Todos os genes do mtDNA são transcritos como RNAs precursores longos de dois promotores principais dentro da matriz mitocondrial, e esses transcritos primários sofrem clivagem de forma coordenada. Assim, diferentes RNAs, incluindo mRNAs, rRNAs e tRNAs e uma variedade de RNAs não codificantes e RNAs antisenso são geradas. Uma maquinaria de degradação tem que distinguir entre eles, para garantir a expressão genética controlada (CLEMENTE et al., 2015).

O degradossoma mínimo para a degradação do RNA compreende uma exonuclease e uma helicase. A RNA helicase SUV3 dependente de ATP interage com uma fosforilase para formar o degradossomo mitocondrial. Além disso, foi demonstrado que o SUV3 desenrola fitas duplas de DNA e RNA, bem como heteroduplex de RNA/DNA (CLEMENTE et al., 2015; PAJAK et al., 2019).

Reparo do DNA mitocondrial

O reparo por excisão de base é a principal via para reparar pequenas modificações no DNA, removendo bases danificadas ou inadequadas. Ele começa com o reconhecimento e a remoção da base alvo por uma DNA glicosilase, gerando um sítio abásico. O BER pode ocorrer de duas maneiras: BER de via curta ou longa. A via curta do BER envolve a incorporação de um único nucleotídeo na lacuna pela Pol γ, seguida pela ligação da fita pela DNA ligase III. A via longa do BER envolve a incorporação de vários nucleotídeos (dois a sete) pela Pol γ, seguida pela remoção do retalho restante por proteínas acessórias como a flap endonuclease 1 (FEN1) e ligação pela DNA ligase III (ALLKANJARI; BALDOCK, 2021; GREDILLA et al., 2020; SEKELSKY, 2017).

Entre as milhares de lesões que ocorrem no genoma mitocondrial, as quebras de fita dupla (DSBs) são as mais prejudiciais e a recombinação homóloga é uma das vias de reparo de DSB mais importantes (CHEN, 2013; DAHAL; DUBEY; RAGHAVAN, 2018). No núcleo, HR é um mecanismo de reparo de DNA limitado às fases S e G2 do ciclo celular, pois é quando há a disponibilidade de um modelo de DNA na cromátide irmã, necessário para a recuperação de informação do DNA danificado. Na mitocôndria, a presença de muitas cópias do genoma mitocondrial faz com que a recombinação homóloga possa ocorrer independentemente do ciclo celular (ALLKANJARI; BALDOCK, 2021; CHEN, 2013).

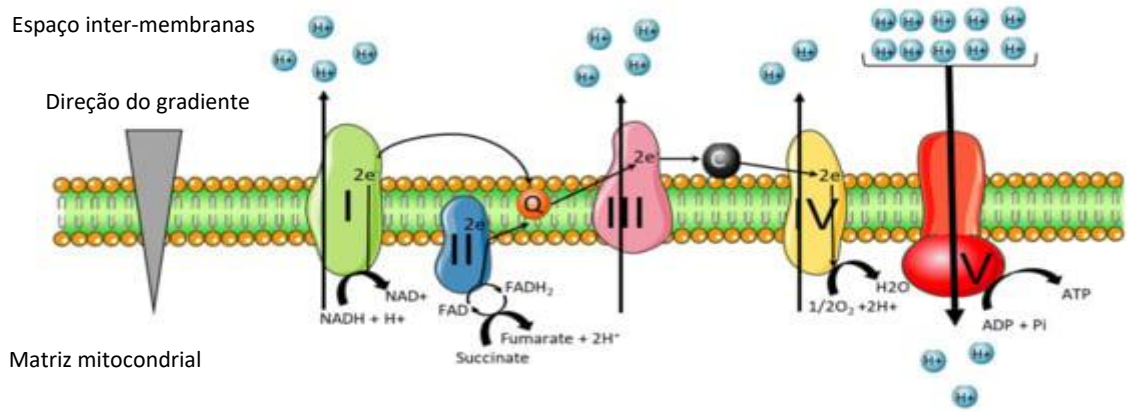
Outra via para o reparo de DSBs a é união de extremidades não homólogas (NHEJ), que é menos preciso do que HR, pois ocorre pela união final do DNA quebrado. O NHEJ ocorre no núcleo da célula, mas é indetectável nas mitocôndrias. Uma via alternativa de NHEJ, que ocorre na mitocôndria, é a junção de extremidade mediada por micro homologia (DAHAL; DUBEY; RAGHAVAN, 2018).

Fosforilação oxidativa (OXPHOS)

As mitocôndrias são um centro de atividade metabólica, encarregadas de produzir a maior parte do substrato energético da célula. O metabolismo celular utiliza carboidratos, gorduras e proteínas para sintetizar energia. As moléculas derivadas dos processos de catabolismo da glicose, ácidos graxos e aminoácidos são utilizadas no ciclo do ácido cítrico para gerar substratos que entram na cadeia transportadora de elétrons para a OXPHOS (HAHN; ZURYN, 2019; NOLFI-DONEGAN; BRAGANZA; SHIVA, 2020).

A OXPHOS ocorre na bicamada lipídica da membrana interna mitocondrial e é composta por cinco complexos enzimáticos (I – V) e dois transportadores de elétrons (coenzima Q e citocromo c) (Figura 5). A principal função deste sistema é o transporte de elétrons e prótons, levando à produção de ATP, pois esta passagem de elétrons libera energia que é armazenada na forma de um gradiente de prótons através da membrana mitocondrial (SMEITINK; VAN DEN HEUVEL; DIMAURO, 2001).

Figura 5 – Representação esquemática dos complexos da OXPHOS.



Fonte: adaptado de (ANDRIEUX et al., 2021).

O modelo *D. melanogaster*

D. melanogaster, no Brasil mais comumente conhecida apenas como drosófila, é um inseto da família Drosophilidae que tem sido usado como modelo genético há mais de 100 anos. Por serem de fácil e barata manutenção, se reproduzirem rapidamente, possuírem tamanho pequeno, alta fertilidade, vida curta, facilidade de amostragem, de criação em laboratório e de manipulação e seus desenvolvimento e fisiologia serem bem compreendidos, esta espécie se tornou um dos modelos mais poderosos para investigar a genética e outros aspectos da evolução e adaptação, de modo que uma grande quantidade de tecnologias genéticas foram criadas ao longo do século passado (BOLUS et al., 2020; FLATT, 2020).

Drosófila possui extensa similaridade genética com humanos, o que a torna um modelo útil para estudo dos processos celulares e moleculares que levam ao desenvolvimento de doenças. Nas últimas décadas muitas doenças humanas foram modeladas nestas moscas (BOLUS et al., 2020). Aproximadamente 65% dos genes que causam doenças humanas possuem um homólogo em drosófilas, e boa parte desses homólogos é expressa em tecidos das moscas que desempenham função equivalente do tecido humano (UGUR; CHEN; BELLEN, 2016).

Esta espécie também é um organismo modelo interessante para estudar a manutenção do mtDNA devido ao seu genoma mitocondrial ser semelhante ao dos vertebrados em sua estrutura geral e modo de organização. Um conjunto semelhante de enzimas e fatores para a manutenção do mtDNA está presente tanto nas mitocôndrias de drosófila como nas dos vertebrados (GONZÁLEZ DE CÓZAR et al., 2019; JÕERS; JACOBS, 2013).

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção dos dados de expressão dos genes

As análises foram feitas a partir dos dados de expressão de genes de manutenção e reparo do DNA mitocondrial (Tabela 1) e de genes presentes no processo OXPHOS (Tabela 2) de *D. melanogaster*. Os dados de Allkanjari e Baldock (2021) sobre as proteínas de reparo do DNA mitocondrial humano foram utilizados para gerar uma lista de homólogos de drosófila.

Tabela 1 - Lista de genes de manutenção do DNA mitocondrial de *D. melanogaster* utilizados neste trabalho.

Gene			Homólogo humano
Símbolo	Nome	FlyBase ID	
DNA2	DNA replication helicase/nuclease 2	FBgn0288690	*DNA2*
DNAlig3	DNA ligase 3	FBgn0286075	*LIG3*
Fen1	flap endonuclease 1	FBgn0025832	*FEN1*
mtDNA-helicase	mitochondrial DNA helicase	FBgn0032154	*TWNK*
mTerf3	mitochondrial transcription termination factor 3	FBgn0037008	*MTERF3*
mTerf5	mitochondrial transcription termination factor 5	FBgn0038584	-
mtSSB	mitochondrial single stranded DNA-binding protein	FBgn0010438	*SSBP1*
mtTFB1	mitochondrial transcription factor B1	FBgn0261381	*TFB1M*
mtTFB2	mitochondrial transcription factor B2	FBgn0037778	*TFB2M*
mTTF	mitochondrial transcription termination factor	FBgn0028530	-
Pif1	Pif1 DNA helicase	FBgn0031540	*PIF1*
PolG1	DNA polymerase gamma subunit 1	FBgn0004406	*POLG*
PolG2	DNA polymerase gamma subunit 2	FBgn0004407	*POLG2*
PolrMT	RNA polymerase mitochondrial	FBgn0261938	*POLRMT*
rnh1	ribonuclease H1	FBgn0023171	*RNASEH1*
Suv3	Suv3 helicase	FBgn0037232	*SUPV3L1*
TFAM	mitochondrial transcription factor A	FBgn0038805	*TFAM*
Top1	topoisomerase 1	FBgn0004924	*TOP1 / TOP1MT*
Top2	topoisomerase 2	FBgn0284220	*TOP2A / TOP2B*
Top3α	topoisomerase 3α	FBgn0040268	*TOP3A*
Top3β	topoisomerase 3β	FBgn0026015	*TOP3B*

Fonte: (RODRIGUES et al., 2022).

Tabela 2 - Lista de genes de OXPHOS de *D. melanogaster* utilizados neste trabalho.

Gene		
Símbolo	Nome	FlyBase ID
ATPsynβ	ATP synthase, β subunit	FBgn0010217
ATPsynγ	ATP synthase, γ subunit	FBgn0020235
COX5A	cytochrome c oxidase subunit 5A	FBgn0019624
COX7A	cytochrome c oxidase subunit 7A	FBgn0040529
Cyt-c-p	cytochrome c proximal	FBgn0284248
kdn	knockdown	FBgn0261955
ND-20	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 20 kDa subunit	FBgn0030718
ND-23	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 23 kDa subunit	FBgn0017567
ND-30	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 30 kDa subunit	FBgn0266582
ox	oxen	FBgn0011227
porin	porin	FBgn0004363
RFeSP	rieske iron-sulfur protein	FBgn0021906
sesB	stress-sensitive B	FBgn0003360

Fonte: próprio autor.

Os valores da expressão destes genes em 20 tecidos, em larvas e adultos machos e fêmeas das moscas foram obtidos dos bancos de dados FlyAtlas2 (https://flyatlas.gla.ac.uk/FlyAtlas2/index.html) (KRAUSE et al., 2022) e FlyBase (http://flybase.org/) (LARKIN et al., 2021), em FPKM (*Fragments Per Kilobase Million*) e RPKM (*Reads Per Kilobase Million*), respectivamente.

Os tecidos amostrados foram: cabeça (*head*), cérebro (*brain*), olho (*eye*), traqueia (*trachea*), glândula salivar (SG), papo (*crop*), coração (*heart*), intestino médio (*midgut*), intestino posterior (*hindgut*), túbulos de Malpighi (MT), células da guirlanda (GC), papilas retais (RP), gânglio toracoabdominal (TAG), corpo gorduroso (FB), carcaça (*carcass*), ovário (*ovary*), espermateca virgem (VS), espermateca acasalada (MS), testículos (*testis*) e glândulas acessórias (AG).

Para a normalização dos dados obtidos, primeiramente foi realizada a razão da expressão de cada gene pela expressão do gene normalizador *Eukaryotic Translation Initiation Factor 1A* (*eIF1A*, FBgn0026250), mantendo-se as subdivisões de cada gene, ou seja, o valor da expressão de um gene foi divido pelo valor da expressão do gene normalizador no mesmo tecido, mesma fase da vida e mesmo sexo. A partir deste primeiro resultado foi calculada a média, e então cada valor da razão realizada anteriormente foi dividido pela média. E, por último, realizou-se o logaritmo de base 2.

Elaboração dos materiais para análise

Os dados das expressões dos genes obtidos no FlyAtlas2 e normalizados foram organizados em dois grupos, sendo o primeiro apenas com os genes de manutenção e reparo do DNA mitocondrial, e o segundo adicionando os genes da OXPHOS.

Estes grupos foram inseridos separadamente no programa EXPANDER (http://acgt.cs.tau.ac.il/expander/) (HAIT et al., 2019), e nele foram realizados uma análise hierárquica e um mapa de calor (heatmap) através do método de agrupamento completo (complete linkage) e da medida de similaridade correlação de Pearson. No mesmo programa também foi realizada uma Análise de Componentes Principais (PCA).

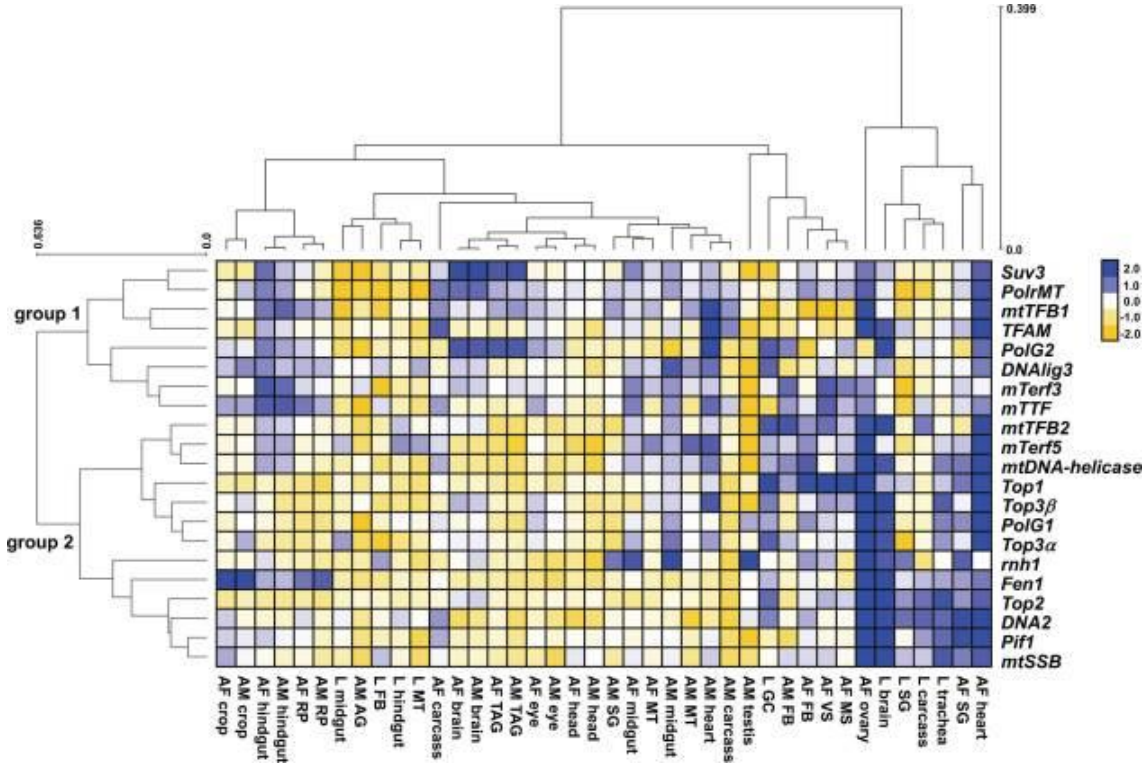
Além disto, foram produzidos gráficos de correlação XY, desta vez utilizando os dados obtidos no FlyBase também, através da plataforma Microsoft Excel 365, correlacionando o gene *PolG2* com *PolrMT*, *mTTF* e *Suv3*, além de correlacionar *PolG1*, *PolG2*, *mtDNA-helicase* e *mtSSB* entre si. Nestes gráficos foram também calculados R^2, r de Pearson e significância F a partir de análises de regressão linear (o programa R foi utilizado para realizar o teste de Kolmogorov–Smirnov para verificar a distribuição dos dados e foi calculada correlação ρ de Spearman para os dados que não seguem distribuição normal).

Por último, utilizando os valores de expressão absoluta obtidos no FlyAtlas 2, assumindo que estes valores se correlacionam com os níveis de proteína dentro das mitocôndrias, foram calculadas as proporções entre os transcritos (e estimada as proporções proteicas) de *PolG2* (Pol γ-β) e *PolG1* (Pol γ-α), *PolG1* (Pol γ-α) e *mtSSB* (mtSSB), *PolG1* (Pol γ-α) e *mtDNA-helicase* (Twinkle), em cada tecido amostrado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise hierárquica e o heatmap dos genes de manutenção e reparo do DNA mitocondrial (Figura 6) demonstram que os genes se organizaram em dois grupos, sendo um principalmente de fatores relacionados à transcrição mitocondrial (grupo 1), e o outro de fatores de replicação (grupo 2). Os genes do grupo 1 em geral possuem maior expressão no intestino posterior, intestino médio, cérebro e gânglio toracoabdominal de adultos machos e fêmeas e no coração de machos adultos. Os genes do grupo 2 são expressos em níveis mais baixos, exceto no cérebro de larvas, traqueia, carcaça e glândula salivar de larvas e fêmeas adultas.

Figura 6 - Análise hierárquica e heatmap dos níveis relativos de expressão dos genes de manutenção do mtDNA de drosófila em diferentes tecidos. L, AM e AF indicam larvas, adultos machos e adultos fêmeas, respectivamente.

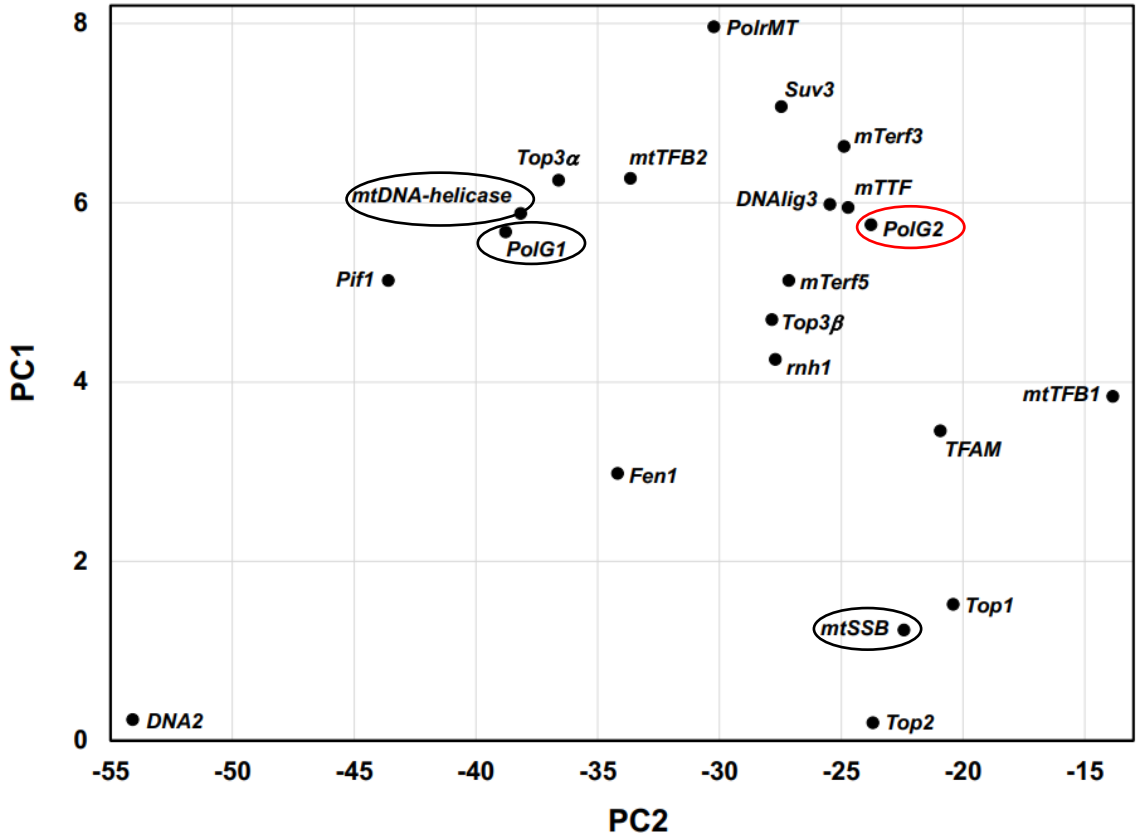


Fonte: (RODRIGUES et al., 2022).

O coração e os ovários de fêmeas adultas apresentam expressão alta de quase todos os genes, enquanto o intestino posterior, intestino médio, corpo gorduroso e túbulo de Malpighi de larvas, o testículo e a glândula acessória de machos adultos e a cabeça de machos e fêmeas adultos possuem baixos níveis de expressão de quase todos os genes.

O que mais chama a atenção nestes dados é o fato de que *PolG2* ficou inserido no grupo 1, junto com genes relacionados à transcrição, enquanto os outros genes do replissoma do mtDNA pertencem ao grupo 2. A PCA também demonstra esta separação de PolG2 dos outros fatores de replicação (Figura 7).

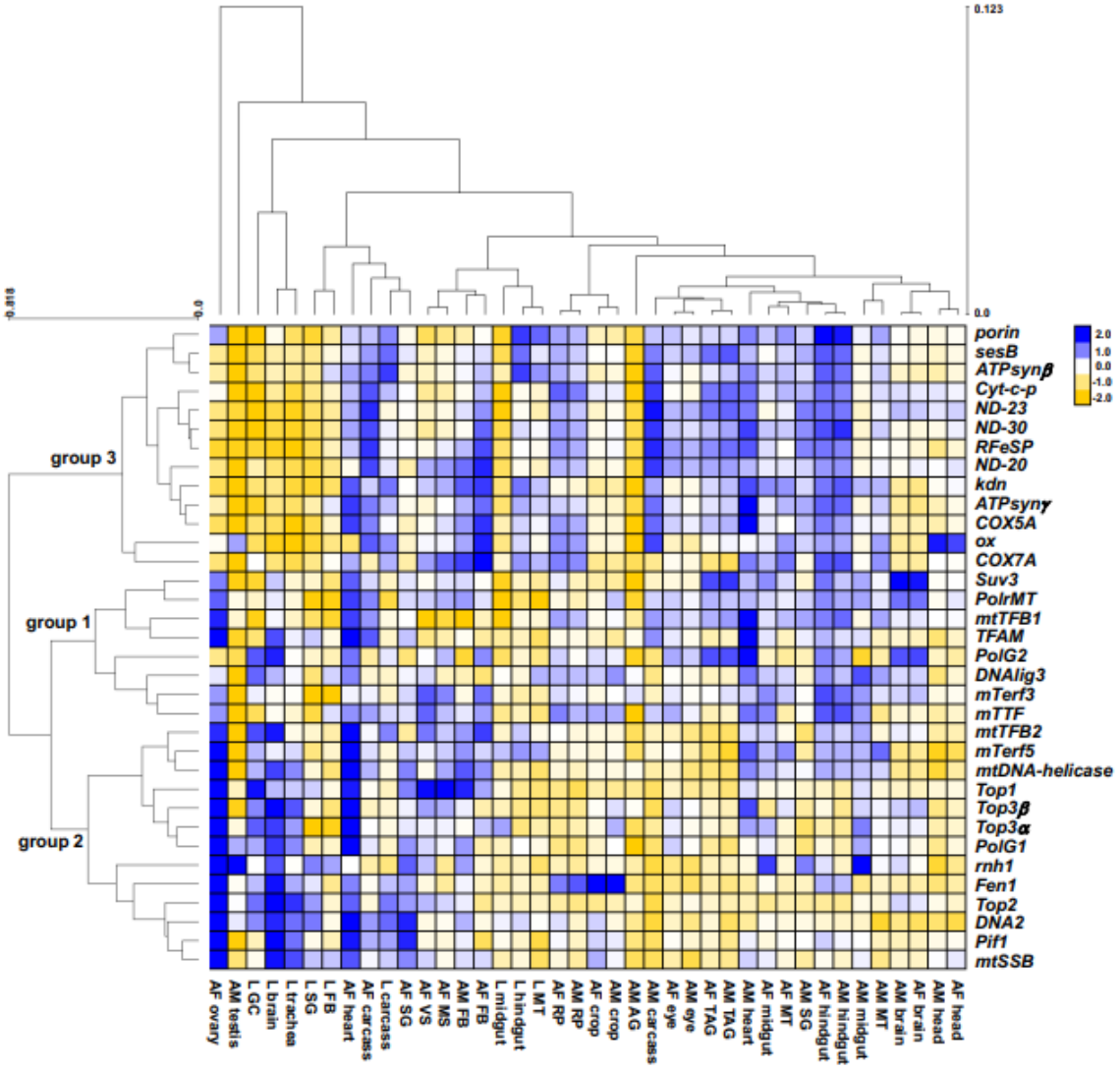
Figura 7 – Análise de componentes principais dos níveis relativos de expressão dos genes de manutenção do mtDNA de drosófila.



Fonte: (RODRIGUES et al., 2022).

Quando realizada análise hierárquica e o heatmap incluindo os genes envolvidos na OXPHOS (Figura 8), os genes dos grupos anteriores se juntaram, mantendo os genes da OXPHOS separados em um terceiro grupo (grupo 3). Isto demonstra que as diferenças no padrão de expressão entre os grupos 1 e 2 não são explicadas por correlações com a expressão dos genes que participam da OXPHOS.

Figura 8 - Análise hierárquica e heatmap dos níveis relativos de expressão dos genes de manutenção e OXPHOS do mtDNA de drosófila em diferentes tecidos. L, AM e AF indicam larvas, adultos machos e adultos fêmeas, respectivamente.

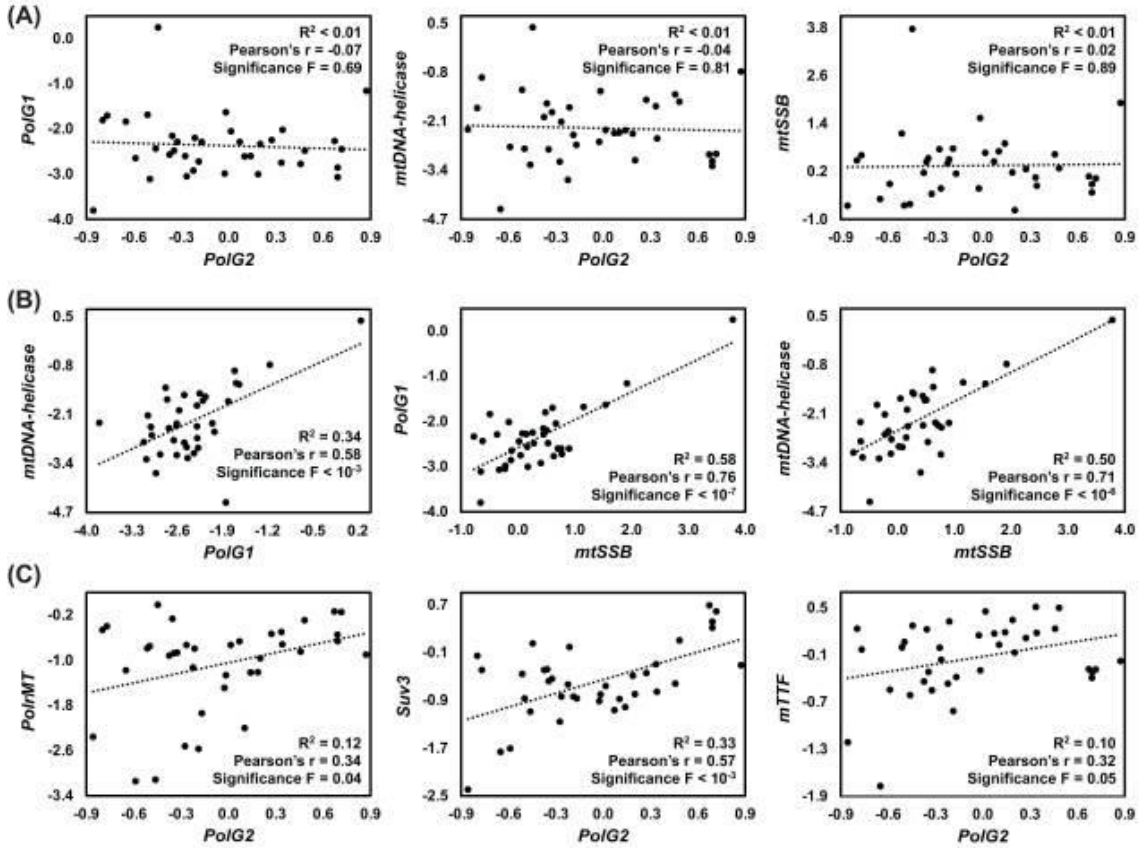


Fonte: (RODRIGUES et al., 2022).

Os gráficos de correlação demonstram que a expressão de *PolG2* não está correlacionada com a expressão dos genes cujos produtos atuam na forquilha de replicação: *mtDNA-helicase*, *PolG1* e *mtSSB* (Figuras 9-A e 10-A), mas estes se correlacionam entre si (Figuras 9-B e 10-B). Os níveis de transcrição de *PolG2* correlacionaram-se com os dos genes do metabolismo de RNA mitocondrial: *PolrMT*, *mTTF* e *Suv3* (Figuras 9-C e 10-C).

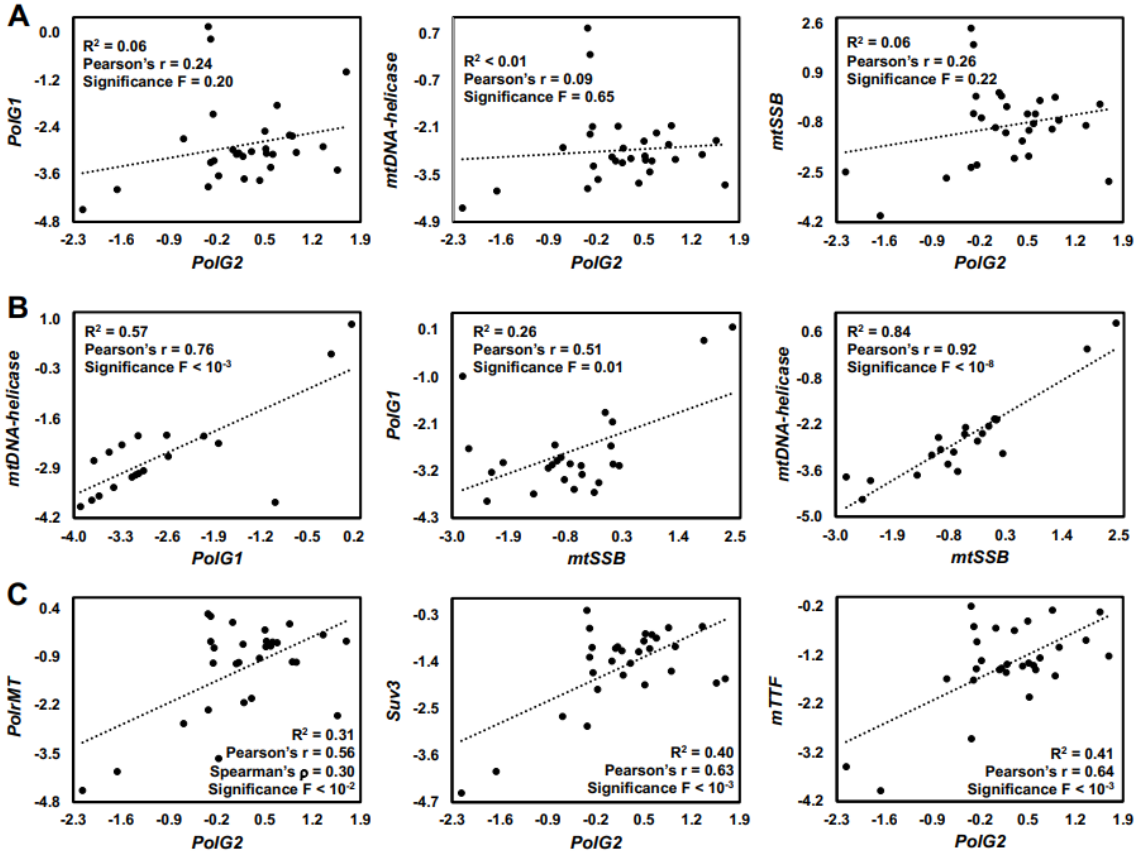
A falta de correlação de *PolG2* com os outros fatores de replicação do DNA mitocondrial e sua forte correlação com fatores da transcrição do mtDNA podem indicar um segundo papel desconhecido de Pol γ-β nas mitocôndrias.

Figura 9 – Gráficos de correlação da expressão relativa dos genes *PolG1, PolG2, mtDNA-helicase, mtSSB, PolrMT, Suv3* e *mTTF*, obtidas no FlyAtlas. A mostra a falta de correlação de *PolG2* com os outros genes envolvidos na forquilha de replicação; B mostra a forte correlação de *mtDNA-helicase*, *PolG1* e *mtSSB* entre si; C mostra que *PolG2* correlaciona-se mais com *PolrMT*, *Suv3* e *mTTF*.



Fonte: (RODRIGUES et al., 2022).

Figura 10 - Gráficos de correlação da expressão relativa dos genes *PolG1, PolG2, mtDNA-helicase, mtSSB, PolrMT, Suv3* e *mTTF*, obtidas no projeto modENCODE através do FlyBase. A mostra a pouca correlação de *PolG2* com os outros genes envolvidos na forquilha de replicação; B mostra a forte correlação de *mtDNA-helicase*, *PolG1* e *mtSSB* entre si; C mostra que *PolG2* correlaciona-se mais com *PolrMT*, *Suv3* e *mTTF*.



Fonte: (RODRIGUES et al., 2022).

Como discutido anteriormente, acredita-se que alterações na estequiometria da forquilha de replicação pode resultar na formação de deleções de mtDNA (CIESIELSKI et al., 2018; OLIVEIRA; PONTES; CIESIELSKI, 2020). Sendo assim, a fim de obter uma estimativa da estequiometria entre os componentes proteicos do replissomo mitocondrial, foram calculadas as proporções entre os transcritos e, assumindo que estes valores se correlacionam com os níveis de proteína dentro das mitocôndrias, foram estimadas as proporções das proteínas que atuam na forquilha de replicação. Nestas proporções calculadas, os níveis de Pol γ-β são mais altos (~5,8 vezes, ±2,7) do que os de Pol γ-α em quase todos os tecidos, sendo que os níveis de Pol γ-α foram maiores que os de Pol γ-β apenas nos ovários (tecido que possui expressão elevada de quase todos os genes de manutenção do mtDNA devido aos altos níveis de replicação do mtDNA que ocorrem durante a oogênese) (Tabela 3). Os motivos que levam os níveis de Pol γ-β serem mais baixos

neste tecido que possui alta produção de mitocôndrias e mtDNA são desconhecidos e merecem uma investigação mais aprofundada.

Já o nível de mtSSB é superior ao de Pol γ-α ~1,8 vezes (±0,6), considerando que mtSSB é uma proteína homotetramérica (Tabela 4). A última proporção realizada indicou um excesso de ~5,8 vezes (±2,3) de Pol γ-α sobre Twinkle, considerando que Twinkle é uma proteína homohexamérica (Tabela 5).

Tabela 3 - Níveis absolutos de transcrição e proporções proteicas estimadas de *PolG1* e *PolG2* em tecidos de drosófila. L, AM e AF indicam larvas, adultos machos e fêmeas, respectivamente. SD é o desvio padrão.

Tecidos	*PolG1*	*PolG2*	*PolG2* / *PolG1*	Pol γ-β / Pol γ-α	Tecidos	*PolG1*	*PolG2*	*PolG2* / *PolG1*	Pol γ-β / Pol γ-α
AM AG	0,88	6,8	7,73	7,73	L intestino posterior	1,49	6,47	4,34	4,34
AF cérebro	1,08	9,68	8,96	8,96	AF MT	1,46	6,65	4,55	4,55
AM cérebro	1,27	9,75	7,68	7,68	AM MT	1,6	6,25	3,91	3,91
L cérebro	2,45	10,02	4,09	4,09	L MT	1,57	6,18	3,94	3,94
AF carcaça	1,93	6,71	3,48	3,48	AF intestino médio	1,27	5,03	3,96	3,96
AM carcaça	1,19	7,31	6,14	6,14	AM intestino médio	1,66	3,32	2,00	2,00
L carcaça	1,11	7,23	6,51	6,51	L intestino médio	1,25	5,23	4,18	4,18
AF papo	1,25	8,28	6,62	6,62	AF ovário	6,13	3,78	0,62	0,62
AM papo	1,48	7,62	5,15	5,15	AF RP	0,84	7,62	9,07	9,07
AF olho	1,84	9,46	5,14	5,14	AM RP	0,89	6,96	7,82	7,82
AM olho	1,56	9,06	5,81	5,81	AF SG	2,04	4,58	2,25	2,25
AF FB	1,42	2,73	1,92	1,92	AM SG	1,05	7,23	6,89	6,89
AM FB	0,64	5,93	9,27	9,27	L SG	1,55	8,96	5,78	5,78
L FB	1,9	9,54	5,02	5,02	AF VS	0,84	3,54	4,21	4,21
L GC	1,26	6,94	5,51	5,51	AF MS	0,86	4,89	5,69	5,69
AF cabeça	1,34	5,87	4,38	4,38	AF TAG	1,15	13,45	11,70	11,70
AM cabeça	0,91	5,97	6,56	6,56	AM TAG	1,06	14,41	13,59	13,59
AF coração	3,83	6,58	1,72	1,72	AM testículos	4,39	10	2,28	2,28
AM coração	1,07	10,9	10,19	10,19	L traqueia	1,93	5,93	3,07	3,07
AF intestino posterior	1,2	9,35	7,79	7,79	Média (+/- sd)	-	-	5,70 (+/- 2,81)	5,70 (+/- 2,81)
AM intestino posterior	1,05	8,83	8,41	8,41	Média - ovário	-	-	5,83 (+/- 2,73)	5,83 (+/- 2,73)

Fonte: adaptado de (RODRIGUES et al., 2022).

Tabela 4 - Níveis absolutos de transcrição e proporções proteicas estimadas de *PolG1* e *mtSSB* em tecidos de drosófila. L, AM e AF indicam larvas, adultos machos e fêmeas, respectivamente. SD é o desvio padrão. Considerando que mtSSB é uma proteína homotetramérica.

Tecidos	*PolG1*	*mtSSB*	*mtSSB* / *PolG1*	mtSSB / Pol γ-α	Tecidos	*PolG1*	*mtSSB*	*mtSSB* / *PolG1*	mtSSB / Pol γ-α
AM AG	0,88	7,82	8,89	2,22	AF MT	1,46	9,68	6,63	1,66
AF cérebro	1,08	5,99	5,55	1,39	AM MT	1,6	6,09	3,81	0,95
AM cérebro	1,27	6,48	5,10	1,28	L MT	1,57	5,55	3,54	0,88
L cérebro	2,45	20,69	8,44	2,11	AF intestino médio	1,27	8,28	6,52	1,63
AF carcaça	1,93	11,72	6,07	1,52	AM intestino médio	1,66	8,07	4,86	1,22
AM carcaça	1,19	6,59	5,54	1,38	L intestino médio	1,25	7,31	5,85	1,46
L carcaça	1,11	11	9,91	2,48	AF ovário	6,13	70,81	11,55	2,89
AF papo	1,25	14,04	11,23	2,81	AF RP	0,84	7,57	9,01	2,25
AM papo	1,48	9,91	6,70	1,67	AM RP	0,89	6,07	6,82	1,71
AF olho	1,84	6,69	3,64	0,91	AF SG	2,04	14,56	7,14	1,78
AM olho	1,56	4,62	2,96	0,74	AM SG	1,05	7,45	7,10	1,77
AF FB	1,42	7,09	4,99	1,25	L SG	1,55	17,46	11,26	2,82
AM FB	0,64	6,69	10,45	2,61	AF VS	0,84	5,56	6,62	1,65
L FB	1,9	19,6	10,32	2,58	AF MS	0,86	4,87	5,66	1,42
L GC	1,26	5,35	4,25	1,06	AF TAG	1,15	7,67	6,67	1,67
AF cabeça	1,34	10,8	8,06	2,01	AM TAG	1,06	7,12	6,72	1,68
AM cabeça	0,91	9,23	10,14	2,54	AM testículos	4,39	11,18	2,55	0,64
AF coração	3,83	12,67	3,31	0,83	L traqueia	1,93	17,46	9,05	2,26
AM coração	1,07	8,92	8,34	2,08	Média (+/- sd)	-	-	6,86 (+/- 2,42)	1,71 (+/- 0,61)
AF intestino posterior	1,2	8,16	6,80	1,70	Média - testículos	-	-	6,97 (+/- 2,35)	1,74 (+/- 0,59)
AM intestino posterior	1,05	7,25	6,90	1,73	Média - testículos e olhos	-	-	7,17 (+/- 2,24)	1,79 (+/- 0,56)
L intestino posterior	1,49	8,06	5,41	1,35					

Fonte: adaptado de (RODRIGUES et al., 2022).

Tabela 5 - Níveis absolutos de transcrição e proporções proteicas estimadas de *PolG1* e *mtDNA-helicase* em tecidos de drosófila. L, AM e AF indicam larvas, adultos machos e fêmeas, respectivamente. SD é o desvio padrão. Considerando que Twinkle é uma proteína homohexamérica.

Tecidos	*PolG1*	*mtDNA-helicase*	*mtDNA-helicase* / PolG1	Pol γ-α / Twinkle	Tecidos	*PolG1*	*mtDNA-helicase*	*mtDNA-helicase* / *PolG1*	Pol γ-α / Twinkle
AM AG	0,88	2,47	2,81	2,14	AF MT	1,46	2,17	1,49	4,04
AF cérebro	1,08	0,76	0,70	8,53	AM MT	1,6	2,16	1,35	4,44
AM cérebro	1,27	0,77	0,61	9,90	L MT	1,57	0,89	0,57	10,58
L cérebro	2,45	3,2	1,31	4,59	AF intestino médio	1,27	1,75	1,38	4,35
AF carcaça	1,93	2,78	1,44	4,17	AM intestino médio	1,66	1,73	1,04	5,76
AM carcaça	1,19	1,45	1,22	4,92	L intestino médio	1,25	1,15	0,92	6,52
L carcaça	1,11	1,28	1,15	5,20	AF ovário	6,13	6,79	1,11	5,42
AF papo	1,25	1,48	1,18	5,07	AF RP	0,84	1,24	1,48	4,06
AM papo	1,48	1,37	0,93	6,48	AM RP	0,89	1,13	1,27	4,73
AF olho	1,84	1,27	0,69	8,69	AF SG	2,04	2,72	1,33	4,50
AM olho	1,56	0,9	0,58	10,40	AM SG	1,05	2	1,90	3,15
AF FB	1,42	2,43	1,71	3,51	L SG	1,55	1,85	1,19	5,03
AM FB	0,64	1,66	2,59	2,31	AF VS	0,84	0,7	0,83	7,20
L FB	1,9	1,28	0,67	8,91	AF MS	0,86	1,4	1,63	3,69
L GC	1,26	1,43	1,13	5,29	AF TAG	1,15	0,94	0,82	7,34
AF cabeça	1,34	1,04	0,78	7,73	AM TAG	1,06	0,92	0,87	6,91
AM cabeça	0,91	0,56	0,62	9,75	AM testículos	4,39	0,73	0,17	36,08
AF coração	3,83	3,85	1,01	5,97	L traqueia	1,93	2,43	1,26	4,77
AM coração	1,07	2,25	2,10	2,85	Média (+/- sd)	-	-	1,21 (+/- 0,56)	6,48 (+/- 5,32)
AF intestino posterior	1,2	2,25	1,88	3,20	Média - testículos	-	-	1,24 (+/- 0,54)	5,72 (+/- 2,32)
AM intestino posterior	1,05	2,16	2,06	2,92	Média - testículos e AG	-	-	1,20 (+/- 0,48)	5,82 (+/- 2,27)
L intestino posterior	1,49	1,09	0,73	8,20					

Fonte: adaptado de (RODRIGUES et al., 2022).

CONCLUSÃO

As correlações do gene *PolG2* demonstradas neste trabalho são realmente inesperadas e merecem ser melhor investigadas. A falta de correlação de *PolG1* e *PolG2* já havia sido demonstrada anteriormente (LEFAI et al., 2000), pois suas expressões são reguladas por diferentes mecanismos e, ainda segundo Lefai et al. (2000), a proteína Pol γ-β desempenha um papel fundamental no controle da replicação do mtDNA. Isto pode explicar a quantidade extra de Pol γ-β com relação à Pol γ-α.

Já a correlação significativa de *PolG2* com *Suv3* (um gene que codifica uma helicase que participa da degradação de RNA mensageiros e RNA antisenso, da modulação da poliadenilação de mRNA mitocondriais, é capaz de desenrolar DNA e RNA de fita dupla e é necessário para o processamento de tRNA mitocondriais (CLEMENTE et al., 2015; PAJAK et al., 2019)) pode indicar um papel adicional para a proteína Pol γ-β.

Ainda há muito a se esclarecer sobre os mecanismos de manutenção do DNA mitocondrial, que tem se demonstrado muito diverso, e as moscas são modelos importantes para isto (levando-se em consideração suas peculiaridades), devido à alta conservação do mtDNA entre a maioria dos animais. Este trabalho levantou algumas hipóteses que poderão ser estudadas e testadas experimentalmente no futuro.

REFERÊNCIAS

ALLKANJARI, K.; BALDOCK, R. A. Beyond base excision repair: an evolving picture of mitochondrial DNA repair. **Bioscience Reports**, v. 41, n. 10, 29 out. 2021.

ANDERSON, S. et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. **Nature**, v. 290, n. 5806, p. 457–465, abr. 1981.

ANDRIEUX, P. et al. Mitochondria as a Cellular Hub in Infection and Inflammation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 21, p. 11338, 20 out. 2021.

BOLUS, H. et al. Modeling Neurodegenerative Disorders in Drosophila melanogaster. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 9, p. 3055, 26 abr. 2020.

BOORE, J. L. Animal mitochondrial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 8, p. 1767–1780, 1 abr. 1999.

CHEN, X. J. Mechanism of Homologous Recombination and Implications for Aging-Related Deletions in Mitochondrial DNA. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 77, n. 3, p. 476–496, set. 2013.

CIESIELSKI, G. L. et al. Structural rearrangements in the mitochondrial genome of Drosophila melanogaster induced by elevated levels of the replicative DNA helicase. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. 6, p. 3034–3046, 6 abr. 2018.

CIESIELSKI, G. L.; OLIVEIRA, M. T.; KAGUNI, L. S. Animal Mitochondrial DNA Replication. Em: **The Enzymes**. [s.l: s.n.]. v. 39p. 255–292.

CLEMENTE, P. et al. SUV3 helicase is required for correct processing of mitochondrial transcripts. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 15, p. 7398–7413, 3 set. 2015.

DAHAL, S.; DUBEY, S.; RAGHAVAN, S. C. Homologous recombination-mediated repair of DNA double-strand breaks operates in mammalian mitochondria. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 75, n. 9, p. 1641–1655, 7 maio 2018.

ELLIOTT, H. R. et al. Pathogenic Mitochondrial DNA Mutations Are Common in the General Population. **The American Journal of Human Genetics**, v. 83, n. 2, p. 254–260, ago. 2008.

FLATT, T. Life-History Evolution and the Genetics of Fitness Components in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v. 214, n. 1, p. 3–48, 1 jan. 2020.

GONZÁLEZ DE CÓZAR, J. M. et al. RNase H1 promotes replication fork progression through oppositely transcribed regions of Drosophila mitochondrial DNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 12, p. 4331–4344, mar. 2019.

GREDILLA, R. et al. Mitochondrial base excision repair positively correlates with longevity in the liver and heart of mammals. **GeroScience**, v. 42, n. 2, p. 653–665, 22 abr. 2020.

HAHN; ZURYN. Mitochondrial Genome (mtDNA) Mutations that Generate Reactive Oxygen Species. **Antioxidants**, v. 8, n. 9, p. 392, 11 set. 2019.

HAIT, T. A. et al. The EXPANDER Integrated Platform for Transcriptome Analysis. **Journal of Molecular Biology**, v. 431, n. 13, p. 2398–2406, jun. 2019.

HOLT, I. J. The mitochondrial R-loop. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. 11, p. 5480–5489, 20 jun. 2019.

JÕERS, P.; JACOBS, H. T. Analysis of Replication Intermediates Indicates That Drosophila melanogaster Mitochondrial DNA Replicates by a Strand-Coupled Theta Mechanism. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. e53249, 4 jan. 2013.

KRAUSE, S. A. et al. FlyAtlas 2 in 2022: enhancements to the *Drosophila melanogaster* expression atlas. **Nucleic Acids Research**, v. 50, n. D1, p. D1010–D1015, 7 jan. 2022.

LARKIN, A. et al. FlyBase: updates to the *Drosophila melanogaster* knowledge base. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. D1, p. D899–D907, 8 jan. 2021.

LEFAI, E. et al. Differential Regulation of the Catalytic and Accessory Subunit Genes of Drosophila Mitochondrial DNA Polymerase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 42, p. 33123–33133, out. 2000.

LEWIS, O. L.; FARR, C. L.; KAGUNI, L. S. Drosophila melanogaster mitochondrial DNA: completion of the nucleotide sequence and evolutionary comparisons. **Insect Molecular Biology**, v. 4, n. 4, p. 263–278, nov. 1995.

MATSUSHIMA, Y.; KAGUNI, L. S. Differential Phenotypes of Active Site and Human Autosomal Dominant Progressive External Ophthalmoplegia Mutations in Drosophila Mitochondrial DNA Helicase Expressed in Schneider Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 13, p. 9436–9444, mar. 2007.

MCKINNEY, E. A.; OLIVEIRA, M. T. Replicating animal mitochondrial DNA. **Genetics and Molecular Biology**, v. 36, n. 3, p. 308–315, 2013.

NOLFI-DONEGAN, D.; BRAGANZA, A.; SHIVA, S. Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. **Redox Biology**, v. 37, p. 101674, out. 2020.

OLIVEIRA, M. T.; HAUKKA, J.; KAGUNI, L. S. Evolution of the Metazoan Mitochondrial Replicase. **Genome Biology and Evolution**, v. 7, n. 4, p. 943–959, abr. 2015.

OLIVEIRA, M. T.; PONTES, C. DE B.; CIESIELSKI, G. L. Roles of the mitochondrial replisome in mitochondrial DNA deletion formation. **Genetics and Molecular Biology**, v. 43, n. 1 suppl 1, 2020.

PAJAK, A. et al. Defects of mitochondrial RNA turnover lead to the accumulation of double-stranded RNA in vivo. **PLOS Genetics**, v. 15, n. 7, p. e1008240, 31 jul. 2019.

PEARCE, S. F. et al. Regulation of Mammalian Mitochondrial Gene Expression: Recent Advances. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 42, n. 8, p. 625–639, ago. 2017.

RODRIGUES, A. P. C. et al. Mitochondrial DNA maintenance in *Drosophila melanogaster*. **Bioscience Reports**, v. 42, n. 11, 30 nov. 2022.

SEKELSKY, J. DNA Repair in *Drosophila*: Mutagens, Models, and Missing Genes. **Genetics**, v. 205, n. 2, p. 471–490, 1 fev. 2017.

SMEITINK, J.; VAN DEN HEUVEL, L.; DIMAURO, S. The genetics and pathology of oxidative phosphorylation. **Nature Reviews Genetics**, v. 2, n. 5, p. 342–352, maio 2001.

SPELBRINK, J. N. et al. Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria. **Nature Genetics**, v. 28, n. 3, p. 223–231, jul. 2001.

TRIFUNOVIC, A. et al. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. **Nature**, v. 429, n. 6990, p. 417–423, maio 2004.

TUPPEN, H. A. L. et al. Mitochondrial DNA mutations and human disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1797, n. 2, p. 113–128, fev. 2010.

UGUR, B.; CHEN, K.; BELLEN, H. J. *Drosophila* tools and assays for the study of human diseases. **Disease Models & Mechanisms**, v. 9, n. 3, p. 235–244, 1 mar. 2016.

VAKIFAHMETOGLU-NORBERG, H.; OUCHIDA, A. T.; NORBERG, E. The role of mitochondria in metabolism and cell death. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 482, n. 3, p. 426–431, jan. 2017.

WANROOIJ, S. et al. Human mitochondrial RNA polymerase primes lagging-strand DNA synthesis *in vitro*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 32, p. 11122–11127, 12 ago. 2008.