



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Ana Paula Campos Rodrigues

O papel da helicase mitocondrial Twinkle em tecidos muscular e nervoso de *Drosophila melanogaster*

São José do Rio Preto
2022

Ana Paula Campos Rodrigues

O papel da helicase mitocondrial Twinkle em tecidos muscular e nervoso de *Drosophila melanogaster*

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, área de concentração: Genética e Evolução, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq – Proc. 140788/2018-2
EDUFI – OPH-4426-2020

Orientador: Prof. Dr. Marcos Túlio de Oliveira

São José do Rio Preto
2022

R696p Rodrigues, Ana Paula Campos
O papel da helicase mitocondrial Twinkle em tecidos muscular e nervoso de *Drosophila melanogaster* / Ana Paula Campos Rodrigues. -- São José do Rio Preto, 2022
161 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto
Orientador: Marcos Túlio de Oliveira

1. Genética animal. 2. *Drosophila melanogaster*. 3. DNA mitocondrial. 4. Mutação (Biologia). 5. Análise de DNA. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Ana Paula Campos Rodrigues

O papel da helicase mitocondrial Twinkle em tecidos muscular e nervoso de *Drosophila melanogaster*

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, área de concentração: Genética e Evolução, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq – Proc. 140788/2018-2
EDUFI – OPH-4426-2020

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Marcos Túlio de Oliveira
UNESP – Câmpus de Jaboticabal
Orientador

Profa. Dra. Maria Isabel Nogueira Cano
UNESP – Câmpus de Botucatu

Dr. Gustavo Carvalho Dias
Umeå University – Suécia

Dra. Suzana Ulian Benitez
Buck Institute for Research on Aging – Estados Unidos

Dr. Felipe Berti Valer
USP – Câmpus de Ribeirão Preto

São José do Rio Preto
10 de novembro de 2022

Aos que me apoiam e me confortam. À minha família. Ao grupo de Pesquisa em Biologia Mitochondrial. Àqueles que acreditam na Educação como principal meio de transformação social.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe, à minha irmã, ao meu pai, ao Luis, ao Marcos e ao meu afilhado, Gael, por terem me fornecido suporte emocional, amor e inspiração durante todo esse tempo. Em especial, reitero meu agradecimento à minha mãe, Elvira, que nunca mediu esforços para que eu pudesse me dedicar aos estudos – jamais me esquecerei o que simbolizava as marmitinhas que ela preparava carinhosamente para eu levar às segundas-feiras ao laboratório. E também ao Marcos, que por inúmeras vezes me escutou, apoiou e incentivou quando eu mais precisei. Agradeço ainda aos demais familiares por todo afeto compartilhado.

Ao Professor Marcos Túlio de Oliveira pelos ensinamentos desde o mestrado. Agradeço por ter me mostrado a importância do pensamento crítico dentro da nossa área e por ter me propiciado a oportunidade de trabalhar com excelentes pessoas.

À equipe do Laboratório de Biologia Mitochondrial da Unesp. Todas as conversas descontraídas, cafezinhos e aprendizados foram essenciais. Em especial, agradeço à Geovana, à Marina, ao André, ao Murilo e ao Ailton pelo companheirismo e amizade que levarei por toda a vida. Agradeço também àqueles que já passaram pelo laboratório e que deixaram sua contribuição de alguma forma.

À Steffi Goffart e ao Jaakko Pohjoismäki por terem me acolhido tão bem em seu laboratório. Não tenho palavras para expressar a minha admiração por eles. Agradeço também à sua equipe de doutorandos e pós-doutorandos por todo auxílio, por se mostrarem sempre solícitos, bem-humorados e munidos de chocolate.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias e à *University of Eastern Finland* por terem contribuído com a minha formação profissional e pessoal.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de doutorado (Proc. 140788/2018-2) e à *Finnish National Agency for Education* (EDUFI) pelo financiamento para realização de parte desta pesquisa no exterior (OPH-4426-2020).

À Audrey, aluna de iniciação científica do nosso grupo, por ter contribuído com as análises de bioinformática relacionadas a esta pesquisa.

Agradeço aos membros da banca avaliadora pelas contribuições e sugestões feitas para a melhoria deste trabalho.

Às meninas que morei em Jaboticabal, em especial, à Mari, e a todas as amigas da graduação e da vida.

Finalmente, agradeço aos grandes docentes que me instigaram a acreditar que uma estudante de escola estadual pública poderia – e deveria – ocupar espaços que a permitissem atuar na fronteira do conhecimento. Espero em breve também poder inspirar e motivar pessoas, assim como o fizeram comigo.

Acredito que este trabalho tenha uma parte de cada um que estive ao meu lado durante esses últimos anos, seja presencialmente ou à distância. Portanto, meu muito obrigada!

“Minha esperança é necessária mas não é suficiente. Ela, só,
não ganha a luta, mas sem ela a luta fraqueja e titubeia”.

Paulo Freire (1992, p. 5)

RESUMO

Mutações no gene humano *TWINK*, responsável por codificar a helicase mitocondrial Twinkle, frequentemente causam doenças mitocondriais que afetam o sistema neurolocomotor de pacientes. No caso da Oftalmoplegia Progressiva Externa (PEO), a principal característica é o acúmulo de múltiplas deleções no DNA mitocondrial (DNAm). Em tecidos altamente energéticos, tais como o nervoso e o muscular, deleções e/ou depleção no DNAm podem afetar a função mitocondrial, uma vez que esse genoma codifica subunidades proteicas primordiais para a produção de ATP via fosforilação oxidativa. Neste trabalho, utilizamos *Drosophila melanogaster* como modelo para compreender o papel tecido-específico da Twinkle em neurônios e na musculatura de moscas adultas. Diferentemente da letalidade larval observada com a superexpressão ubíqua de Twinkle K388A, uma variante disfuncional incapaz de hidrolisar ATP, a superexpressão músculo-específica não alterou nenhum parâmetro de viabilidade dos adultos avaliados. A superexpressão neurônio-específica também não afetou o desenvolvimento de *Drosophila*, mas causou redução drástica na atividade locomotora e na longevidade de indivíduos adultos, bem como depleção severa no DNAm. A superexpressão de Twinkle tipo selvagem (WT) nesses tecidos não alterou nenhum fenótipo analisado, mas foi capaz de aumentar o número de cópias do DNAm cerca de 30%. Análises preliminares dos intermediários da replicação do DNAm em células musculares e neuronais de *D. melanogaster*, sob superexpressão de Twinkle WT ou K388A, evidenciaram aumento de uma das pausas replicativas que ocorrem naturalmente no genoma mitocondrial associadas ao fator de terminação transcricional (DmTTF). Além disso, possíveis deleções relacionadas à superexpressão de Twinkle K388A e WT foram encontradas em miócitos, apesar de não haver efeitos negativos ao fenótipo ou ao número de cópias de DNAm nessas moscas. Determinar os mecanismos de manutenção do DNAm envolvendo Twinkle pode fornecer ideias sobre como regular suas funções para melhorar as condições de disfunção mitocondrial que acometem tecidos nervoso e muscular durante o envelhecimento e o desenvolvimento de doenças mitocondriais.

Palavras-chave: Twinkle. DNA mitocondrial. Disfunção mitocondrial. Replicação de DNA.

ABSTRACT

Mutations in the human *TWINK* gene, responsible for encoding the mitochondrial helicase Twinkle, often cause mitochondrial diseases that affect the neurolocomotor system of patients. In the case of Progressive External Ophthalmoplegia (PEO), the main characteristic is the accumulation of multiple mitochondrial DNA (mtDNA) deletions. In high energy-demanding tissues, such as nervous and muscle, deletions and/or depletion in mtDNA can affect mitochondrial function, since this genome encodes protein subunits essential for ATP production via oxidative phosphorylation. In this research, we have used *Drosophila melanogaster* as a model to understand the tissue-specific role of Twinkle in neurons and musculature of adult flies. Unlike the larval lethality observed with the ubiquitous overexpression of the active-site mutant Twinkle K388A, the muscle-specific overexpression has not harmed any viability of adults. Neuron-specific overexpression also has not affected *Drosophila* development, but caused a drastic reduction in locomotor activity and longevity in adults, as well as severe mtDNA depletion. Wild-type Twinkle (WT) overexpression in these tissues have not changed any analyzed phenotypes, but was able to increase the mtDNA copy number about 30%. Preliminary results on mtDNA replication intermediates in *D. melanogaster* muscle and neuronal cells, overexpressing Twinkle WT and K388A, have shown an increase in one of the replicative pauses that occur naturally in the mitochondrial genome associated with transcriptional termination factor (DmTTF). In addition, potential deletions related to the overexpression of Twinkle K388A or WT were found in myocytes, despite no negative effects on the phenotype or the mtDNA copy number in these flies. The study of the mtDNA maintenance mechanisms involving Twinkle may provide insights into how to regulate its functions in order to improve the conditions of mitochondrial dysfunction that affect neurons and muscle during aging and the development of mitochondrial diseases.

Keywords: Twinkle. Mitochondrial DNA. Mitochondrial dysfunction. DNA replication.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação simplificada da mitocôndria.	20
Figura 2 – Representação didática da CR mitocondrial.	23
Figura 3 – Representação do genoma mitocondrial de <i>D. melanogaster</i> e <i>H. sapiens</i> .	26
Figura 4 – Representação do replissomo mitocondrial mínimo encontrado em humanos, exibindo a estrutura quaternária da Twinkle (mtDNA helicase), Pol γ e mtSSB.	28
Figura 5 – Representação esquemática e modelo estrutural da Twinkle humana.	30
Figura 6 – Representação dos modelos de replicação do DNAm _t .	33
Figura 7 – Fases do ciclo de vida de <i>D. melanogaster</i> .	36
Figura 8 – Representação esquemática do sistema induzível <i>UAS/GAL4</i> .	38
Figura 9 – Esquema evidenciando os principais arcos obtidos pela técnica de 2D-NAGE.	44
Figura 10 – Detecção da superexpressão tecido-específica de Twinkle em <i>D. melanogaster</i> .	49
Figura 11 – Viabilidade das pupas com superexpressão tecido-específica de Twinkle WT ou K388A em <i>D. melanogaster</i> .	50
Figura 12 – Longevidade de moscas superexpressando Twinkle WT ou K388A em neurônios ou na musculatura.	52
Figura 13 – Superexpressão de Twinkle K388A em tecido nervoso causa problemas neurolocomotores em moscas adultas de <i>D. melanogaster</i> .	53
Figura 14 – Quantificação tecido-específica do número relativo de cópias de DNAm _t em <i>D. melanogaster</i> .	54
Figura 15 – Intermediários da replicação (IRs) do DNAm _t de musculatura de <i>D. melanogaster</i> .	56
Figura 16 – Intermediários da replicação (IRs) do DNAm _t do sistema nervoso de <i>D. melanogaster</i> .	59
Figura 17 – Intermediários da replicação (IRs) do DNAm _t de musculatura de <i>D. melanogaster</i> .	61

Figura 18 – Intermediários da replicação (IRs) do DNAm^t do sistema nervoso 64
de *D. melanogaster*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Delineamento experimental.	38
Tabela 2 – Endonucleases, produtos da digestão e concentração dos géis de agarose utilizados na técnica de 2D-NAGE.	45
Tabela 3 – Sondas dos genes <i>COIII</i> e <i>12S</i> usadas para detectar os intermediários da replicação ou recombinação em moscas Twinkle.	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1D	Gel de primeira dimensão
2D	Gel de segunda dimensão
2D-NAGE	Eletroforese bidimensional em gel de agarose neutro
adPEO	Oftalmoplegia Progressiva Externa autossômica dominante
ATP	Trifosfato de adenosina
BrEt	Brometo de etídio
CI	Complexo I
CII	Complexo II
CIII	Complexo III
CIV	Complexo IV
CR	Cadeia respiratória
CV	Complexo V
DmTTF	Fator de terminação transcricional
DNAmt	DNA mitocondrial
DNA_t	DNA total
<i>elavGAL4</i>	<i>embryonic lethal abnormal vision^{C155}-GAL4</i>
EMC	Extrato mitocondrial cru
IRs	Intermediários da replicação ou recombinação
<i>mhcGAL4</i>	<i>myosin heavy chain-GAL4</i>
mtSSB	Proteínas ligantes a DNA fita simples mitocondrial
O_H	Origem da replicação da fita pesada
O_L	Origem da replicação da fita leve
OXPHOS	Fosforilação oxidativa
PEO	Oftalmoplegia Progressiva Externa
Pol γ	DNA polimerase γ
RITOLS	<i>RNA incorporation throughout the lagging strand</i>
ROS	Espécies reativas de oxigênio
TFAM	Fator de transcrição mitocondrial A
UAS	<i>Upstream Activation Sequence</i>
WT	Tipo selvagem
$\alpha^{32}\text{P}$-dCTP	[$\alpha^{32}\text{P}$]-5'-trifosfato de 2'-desoxicitidina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVO GERAL	18
2.1	Objetivos específicos	18
3	REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1	Estrutura e função das mitocôndrias	19
3.2	Cadeia respiratória mitocondrial e fosforilação oxidativa	22
3.3	DNA mitocondrial	24
3.4	Replissomo mitocondrial mínimo	27
3.4.1	Helicase replicativa mitocondrial (Twinkle)	28
3.4.2	DNA polimerase γ (Pol γ)	30
3.4.3	Proteínas ligantes a DNA fita simples mitocondrial (mtSSB)	31
3.5	Replicação do DNA mitocondrial	32
3.6	Doenças mitocondriais	34
3.7	<i>Drosophila melanogaster</i> como organismo modelo	35
4	MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1	Linhagens experimentais	37
4.2	Cultivo de <i>Drosophila</i>	39
4.3	Viabilidade pupal	39
4.4	Ensaio de longevidade	39
4.5	Teste de escalada	40
4.6	Preparação do extrato mitocondrial cru	40
4.7	Western blotting	40
4.8	Extração de DNA total	41
4.9	Extração de DNA mitocondrial	42
4.10	Quantificação do nível de DNAm_t via PCR quantitativo em tempo real	43

4.11 Eletroforese bidimensional em gel de agarose neutro (2D-NAGE)	44
4.11.1 Southern blotting e reação de hibridização	46
4.11.2 Síntese das sondas aplicadas à técnica de 2D-NAGE.....	47
5 RESULTADOS	48
5.1 Disfunções tecido-específica da Twinkle não afetam a viabilidade pupal de <i>Drosophila</i>.....	48
5.2 A expressão de Twinkle mutada em tecido nervoso, mas não em tecido muscular, causam problemas locomotores e redução da longevidade em adultos de <i>D. melanogaster</i>.....	50
5.3 Disfunções da Twinkle causam depleção severa do DNAm do sistema nervoso central, mas não da musculatura torácica	53
5.4 Disfunções da Twinkle induzem aumento da pausa do replissomo mitocondrial correspondente ao sítio de ligação do DmTTF	55
5.5 Alterações na Twinkle evidenciam deleção e formação de arcos Y de movimento lento em DNAm de musculatura de <i>D. melanogaster</i>	59
5.6 Padrão de intermediários da replicação do DNAm não muda na presença de Twinkle K388A em células neuronais	62
6 DISCUSSÃO	65
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
REFERÊNCIAS.....	70
APÊNDICE A – Artigo publicado na revista <i>Bioscience Reports</i>: Mitochondrial DNA maintenance in <i>Drosophila melanogaster</i>.....	84
ANEXO A – Intermediários da replicação do DNAm provenientes de células S2 de <i>D. melanogaster</i>	161

1 INTRODUÇÃO

O DNA mitocondrial (DNAMt) de animais é uma molécula compacta, circular, fita dupla, composta por 37 genes. Desses, 13 genes codificam subunidades proteicas centrais, constituintes dos complexos envolvidos nas reações de fosforilação oxidativa (OXPHOS) (MCKINNEY; OLIVEIRA, 2013). Esse processo é responsável pela produção de grande parte do trifosfato de adenosina (ATP) consumido pelos diferentes tecidos de um organismo, principalmente aqueles altamente aeróbios, tais como o nervoso e o muscular (VERGARA et al., 2019). Dependendo da demanda energética, o número de cópias do DNAMt pode se ajustar naturalmente dentro da célula, variando de dezenas a centenas de cópias (CHINNERY; HUDSON, 2013; TAYLOR; TURNBULL, 2005). A regulação dos níveis de DNAMt existentes na mitocôndria é importante, pois esses geralmente são positivamente relacionados ao nível da expressão dos genes codificados no DNAMt. Ou seja, além dos processos comumente observados de regulação da expressão gênica em diferentes sistemas biológicos, como por exemplo a iniciação da transcrição ou tradução e estabilidade dos RNAs mensageiros, a elevação ou queda dos níveis de DNAMt afetam proporcionalmente os níveis de transcritos intramitocondriais produzidos (KASIVISWANATHAN; COLLINS; COPELAND, 2012). Nesse contexto, para o funcionamento adequado da OXPHOS, a manutenção do genoma mitocondrial inclui mecanismos que mantêm um número apropriado de moléculas de DNAMt por célula/tecido, além de processos envolvidos com a preservação da integridade dessas moléculas.

Um dos principais processos responsáveis por regular a variação do número de cópias e produzir mais DNAMt é a replicação (FALKENBERG; LARSSON; GUSTAFSSON, 2007; GUSTAFSSON; FALKENBERG; LARSSON, 2016). *In vitro*, a replicação do genoma mitocondrial de animais pode ser realizada por um conjunto mínimo de três proteínas codificadas no DNA nuclear, que atuam na forquilha de replicação e, juntas, recebem o nome de “replissomo mitocondrial mínimo” (KORHONEN et al., 2004). À frente dessa maquinaria, a helicase replicativa mitocondrial, também conhecida como Twinkle, transloca-se em uma das fitas do DNA no sentido 5'-3', hidrolisando ATP e promovendo a abertura da fita dupla de DNA parental. A DNA polimerase γ (Pol γ), usando como molde o DNA fita simples gerado pela ação da Twinkle, pode então promover a síntese de DNAMt *per se*. Esse DNA

fita simples é protegido contra nucleólise através de uma ligação transiente com as proteínas ligantes a DNA fita simples mitocondrial (mtSSB, do inglês, *mitochondrial single stranded DNA-binding protein*), que também são responsáveis por coordenar e estimular as funções da Twinkle e da Pol γ (FALKENBERG; LARSSON; GUSTAFSSON, 2007; MCKINNEY; OLIVEIRA, 2013; OLIVEIRA; KAGUNI, 2011).

A Twinkle possui estrutura homohexamérica/homoheptamérica em forma de anel, cuja abertura central possibilita a passagem do DNA fita simples. Cada subunidade é formada por três domínios distintos: 1) o domínio N-terminal *primase-like*, homólogo ao domínio de primase da enzima gp4 do bacteriófago T7; 2) o domínio C-terminal helicase, relacionado ao papel de helicase propriamente dito; e 3) um domínio chamado de *linker*, que conecta os domínios N- e C-terminal. A interação dos domínios *linker* e C-terminal de uma subunidade com os mesmos domínios da subunidade subjacente fornece as condições estruturais ideais para a formação do sítio de ligação ao ATP e para a consequente hidrólise desse nucleotídeo, que libera a energia química necessária utilizada pela enzima durante sua atividade de helicase (PETER et al., 2019; ZIEBARTH et al., 2010; ZIEBARTH; FARR; KAGUNI, 2007).

Mostramos, anteriormente, que a superexpressão ubíqua de uma Twinkle deficiente em hidrolisar ATP causa letalidade ainda na fase larval da mosca *Drosophila melanogaster*, associada a uma depleção severa no DNAm (RODRIGUES et al., 2018). Esse alelo da Twinkle codifica a substituição K388A no motivo conservado denominado *Walker A*, que é essencial para a ligação e hidrólise do ATP, localizado no domínio C-terminal da enzima. Interessantemente, ao induzir a expressão de Twinkle K388A apenas em neurônios ou na musculatura, os indivíduos completaram o desenvolvimento sem problemas aparentes, atingindo a fase adulta a taxas de emergência tão altas quanto as dos controles (RODRIGUES et al., 2018). Nesta tese de doutorado, buscamos entender o papel da Twinkle na manutenção do DNAm focando no sistema nervoso central e na musculatura torácica de indivíduos adultos de *D. melanogaster*, com a perspectiva de criar um modelo informativo para PEO e outras doenças mitocondriais humanas.

Para tanto, analisamos fenotípica e molecularmente moscas adultas de *D. melanogaster* superexpressando Twinkle K388A ou tipo selvagem (WT) em neurônios ou em células musculares. Observamos, no entanto, que Twinkle K388A causa efeitos negativos severos no nível cópias de DNAm, na longevidade e na habilidade locomotora dos adultos apenas quando superexpressa em neurônios. Análises

preliminares dos intermediários de replicação ou recombinação do DNAm_t na musculatura e no sistema nervoso apresentaram aparente pausa replicativa associada ao sítio de ligação do fator de terminação transcricional (DmTTF), indicando uma possível interação funcional entre Twinkle e DmTTF. Em miócitos, foram relatadas deleções no DNAm_t relacionadas, principalmente, à superexpressão de Twinkle WT e K388A. Enquanto isso, em células neuronais, as quais são mais prejudicadas sob superexpressão de Twinkle K388A, não detectamos aumentos de pausas replicativas que pudessem explicar os prejuízos fenotípicos ou de queda no número de cópias de DNAm_t descritos neste trabalho. Nesse sentido, nossos dados demonstram uma diferença funcional inerente à atividade da Twinkle que reforçam a ideia de que mecanismos distintos de manutenção do genoma mitocondrial operam em tecidos animais.

2 OBJETIVO GERAL

Investigar o papel da helicase mitocondrial Twinkle na manutenção do genoma mitocondrial nos tecidos muscular e nervoso de adultos de *D. melanogaster*.

2.1 Objetivos específicos

Os objetivos específicos desta tese foram: a) caracterizar fenotipicamente as linhagens superexpressando nos tecidos muscular ou nervoso Twinkle tipo selvagem (WT) ou Twinkle deficiente na hidrólise do ATP (Twinkle K388A); b) avaliar o genoma mitocondrial das linhagens citadas acima utilizando a técnica de qPCR para a análise do número relativo de cópias de DNAm_t; c) caracterizar a presença de intermediários de replicação e recombinação do DNAm_t em células musculares e neuronais na presença de Twinkle WT ou Twinkle K388A, além de analisar como os sítios de pausas da replicação se alteram na presença dos diferentes tipos de Twinkle em questão.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Estrutura e função das mitocôndrias

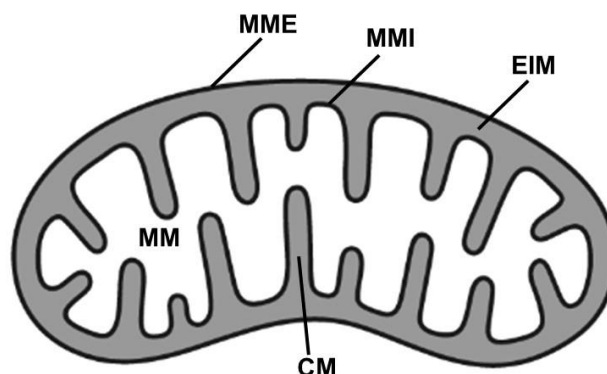
A partir da otimização do processo de síntese de ATP, molécula conhecida como “moeda energética” celular, as mitocôndrias produzem a maior parte da energia utilizada nas mais variadas reações enzimáticas presentes em organismos aeróbios. Além disso, essa organela também atua ativamente na produção de intermediários em diversas vias bioquímicas, tais como ciclo do ácido cítrico, ciclo da ureia e β oxidação de ácidos graxos, bem como no processo de morte celular programada (apoptose), sinalização intracelular, sinalização de cálcio, metabolismo de aminoácidos, dentre outros (JODI; SUOMALAINEN, 2012; PROTASONI; ZEVIANI, 2021). Tendo em mente que as mitocôndrias estão presentes na grande maioria das células eucarióticas de modo a desempenhar papel essencial à manutenção da homeostase celular, compreende-se sua relevância no processo de diversificação da vida eucariótica.

De acordo com a teoria endossimbiótica, descrita por Lynn Margulis em 1970, as mitocôndrias primitivas surgiram e evoluíram a partir de uma bactéria de vida livre (α -proteobactéria) englobada por uma arqueobactéria. A interação foi benéfica para ambos os envolvidos, pois a célula hospedeira fornecia um ambiente seguro para o crescimento da mitocôndria primitiva que, por sua vez, propiciava energia à célula eucariótica precursora (ARCHIBALD, 2015; CAVALIER-SMITH, 2006). A presença do material genético mitocondrial (ver tópico 3.3) e o compartilhamento de algumas características entre procariotos e eucariotos, tais como a composição bioquímica das membranas mitocondriais e membranas bacterianas, forneceram as bases para a elaboração da teoria (CAVALIER-SMITH, 2006).

Também conhecidas por serem organelas membranosas, as mitocôndrias são constituídas por duas membranas fosfolipídicas, denominadas membrana mitocondrial externa e interna, as quais delimitam dois espaços dentro da organela: o espaço intermembranas e a matriz mitocondrial (Figura 1). A permeabilidade das membranas é distinta devido às diferenças na constituição bioquímica observada entre elas. A membrana mitocondrial externa possui diversos poros em sua composição, os quais permitem a passagem de pequenos metabólitos hidrofílicos, íons e precursores de proteínas, sendo então permeável a solutos com massa

molecular de até 5 kDa. Já a membrana mitocondrial interna, por sua vez, mostra-se extremamente seletiva e apenas água, oxigênio (O₂) e dióxido de carbono (CO₂) podem passar passivamente através dela, sendo necessário a presença de proteínas translocases e outros carreadores para realizar o transporte ativo de moléculas pequenas e íons (PALMIERI; LEONARDO, 2010; PROTASONI; ZEVIANI, 2021). Além disso, a membrana mitocondrial interna apresenta cardiolipina em abundância, fosfolípido que também está presente em membranas de bactérias, remetendo à origem endossimbiótica da organela (CAVALIER-SMITH, 2006). A diferença funcional observada entre as membranas mitocondriais interna e externa explica-se, principalmente, pela proporção de lipídios e proteínas existente entre ambas, na qual a taxa fosfolípídica encontrada na membrana externa é de duas a três vezes maior do que na interna (ERNSTER; SCHATZ, 1981; PROTASONI; ZEVIANI, 2021).

Figura 1 – Representação simplificada da mitocôndria. MME: Membrana mitocondrial externa; MMI: Membrana mitocondrial interna; EIM: Espaço intermembranas; MM: Matriz mitocondrial; CM: Crista mitocondrial.



Fonte: Figura elaborada pela aluna com a utilização do software BioRender.com.

Invaginações na membrana interna no sentido da matriz mitocondrial são conhecidas como “cristas mitocondriais” (Figura 1). Embebidas nas cristas encontram-se, entre outras proteínas, aquelas integrais de membrana que compõem os grandes complexos da cadeia respiratória mitocondrial (ver item 3.2). O espaço delimitado entre as membranas externa e interna é denominado espaço intermembranas (Figura 1), onde ocorre a formação do gradiente eletroquímico durante o processo de fosforilação oxidativa (OXPHOS) (ERNSTER; SCHATZ, 1981; FRIEDMAN; NUNNARI, 2014; PROTASONI; ZEVIANI, 2021). A formação e manutenção das cristas mitocondriais é complexa e envolve uma série de proteínas (COGLIATI; ENRIQUEZ; SCORRANO, 2016), mas vale destacar a importância da dimerização da

ATP-sintase na estabilização dessas estruturas, visto que há perda da conformação tubular das cristas quando a oligomerização da ATP-sintase é abolida (PAUMARD, 2002). A importância das dobras da membrana mitocondrial interna no sentido da matriz, isto é, das cristas, se dá pelo fato de haver dentro da mitocôndria um aumento da superfície de contato apta à produção de energia para a célula. Tal afirmação é corroborada ao se observar a presença abundante de cristas mitocondriais em tecidos de alta demanda energética, como por exemplo musculatura do voo de insetos ou musculatura cardíaca de mamíferos (ERNSTER; SCHATZ, 1981).

Delimitada pela membrana interna está a matriz mitocondrial, onde se localiza o genoma mitocondrial (ver tópico 3.3), bem como diversas enzimas relacionadas ao ciclo do ácido cítrico, à β -oxidação e à oxidação de aminoácidos. Há também a presença de RNAs mensageiros, RNAs transportadores, RNAs ribossômicos, chaperonas e proteínas constituintes da maquinaria replicativa do DNAm (ERNSTER; SCHATZ, 1981; PROTASONI; ZEVIANI, 2021).

Sabe-se que a arquitetura mitocondrial é dinâmica e pode ser modificada segundo estímulos do meio, principalmente aqueles ligados ao estado bioenergético celular. Com isso, as mitocôndrias geralmente são encontradas nos tecidos como grânulos isolados ou como uma ampla rede contínua (HOITZING; JOHNSTON; JONES, 2015; ZHENG; ZHANG; CHEN, 2019). Podem estar também em movimento dentro da célula como é visto em neurônios. Neste caso, a organela se move por longas distâncias através do axônio até o terminal pré-sináptico a fim de garantir o suprimento constante de ATP por meio da reposição de mitocôndrias danificadas por mitocôndrias saudáveis (ZHENG; ZHANG; CHEN, 2019).

Alguns eventos são fundamentais à manutenção do formato, distribuição e viabilidade mitocondrial, tais como a fissão (divisão) e a fusão (união) mitocondrial. Por exemplo, quando a mitocôndria tem aparência fragmentada, infere-se que a maquinaria de fissão esteja atuando sobre ela como resposta à divisão celular ou a danos estruturais na organela, visto que esse processo antecede a mitofagia. Em contrapartida, mitocôndrias com alto grau de fusão ajudam a prevenir a mitofagia, especialmente em condições de estresse bioenergético, de modo que mitocôndrias saudáveis mesclariam seu material genético ao de mitocôndrias parcialmente danificadas, o que garantiria a manutenção da organela (HOITZING; JOHNSTON; JONES, 2015; RAHMAN; QUADRILATERO, 2021; TILOKANI et al., 2018). A alta adaptabilidade morfológica das mitocôndrias é essencial à homeostase celular. Assim,

problemas na maquinaria de fissão/fusão mitocondrial podem levar a danos principalmente em células de alta demanda energética, tais como neurônios e fibras musculares.

Como já mencionado, um dos papéis metabólicos primordiais das mitocôndrias é o seu envolvimento na produção de ATP. O primeiro passo para a geração de energia é denominado glicólise. Esse processo é anaeróbico, acontece no citosol (independente da mitocôndria) e gera duas moléculas de ATP e duas de piruvato, a partir de uma molécula de glicose. O ciclo do ácido cítrico, também conhecido como ciclo de Krebs, por sua vez, ocorre na matriz mitocondrial e interage com a glicólise a partir do momento em que as moléculas de piruvato são transportadas à matriz e são convertidas à acetil-CoA. Assim, dentro da mitocôndria, dá-se início ao ciclo do ácido cítrico, que é marcado por oito reações enzimáticas oxidativas que geram, como saldo total, moléculas carreadoras de elétrons altamente energéticas (seis NADH e dois FADH_2), além de dois GTP e quatro moléculas de CO_2 . Os carreadores de elétrons podem ser utilizados em um processo subsequente eficaz em produção de energia, denominado OXPHOS, responsável por sintetizar 30 moléculas de ATP para cada molécula de glicose oxidada (PROTASONI; ZEVIANI, 2021).

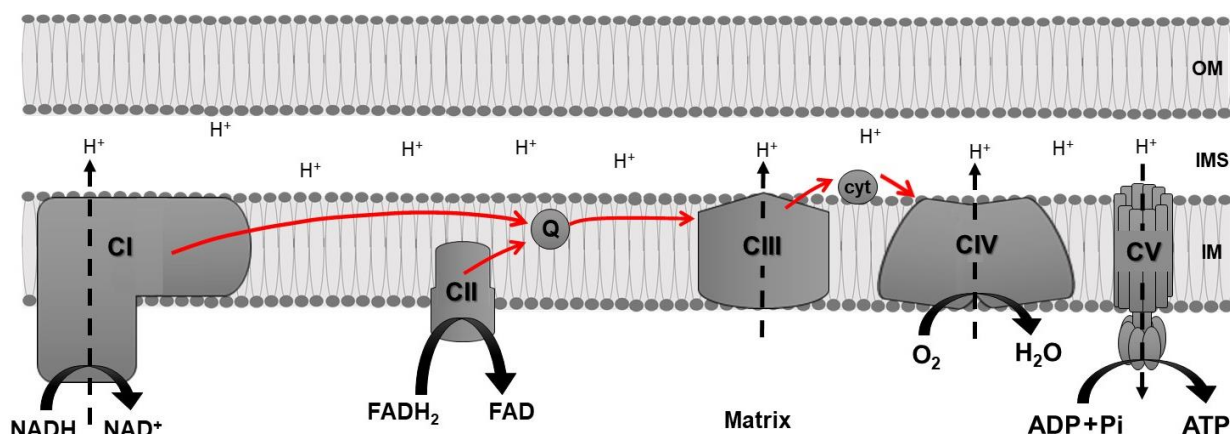
3.2 Cadeia respiratória mitocondrial e fosforilação oxidativa

A cadeia respiratória (CR) mitocondrial ou cadeia transportadora de elétrons é composta por quatro complexos proteicos e pela ATP-sintase, inseridos na membrana interna da mitocôndria, e por dois carreadores de elétrons móveis: coenzima Q (ou ubiquinona/ubiquinol) e citocromo c (PROTASONI; ZEVIANI, 2021). Em suma, o papel primordial da CR é realizar reações de óxido-redução a fim de criar no espaço intermembranas o gradiente eletroquímico de prótons ideal à geração de ATP pela ATP-sintase (Figura 2).

O ponto inicial da CR é o complexo I (CI), também conhecido como NADH desidrogenase. Esse grande complexo é composto por 44 subunidades proteicas diferentes organizadas em duas regiões distintas: domínio hidrofóbico (inserido na membrana mitocondrial interna) e domínio hidrofílico (projetado para a matriz mitocondrial). Sete subunidades do domínio hidrofílico, codificadas pelo genoma nuclear, fazem parte do sítio catalítico responsável por oxidar NADH a NAD^+ e por transferir esses elétrons com alta energia à coenzima Q, reduzindo-a (PROTASONI;

ZEVIANI, 2021). Outras 30 subunidades acessórias são necessárias para estabilizar e proteger o complexo de possíveis degradações causadas por ROS (VARTAK; SEMWAL; BAI, 2014). Já o domínio hidrofóbico possui sete proteínas codificadas pelo DNAm (Figura 3) e está mais relacionado ao bombeamento de prótons da matriz mitocondrial em direção ao espaço intermembranar (BARADARAN et al., 2013; PROTASONI; ZEVIANI, 2021).

Figura 2 – Representação didática da CR mitocondrial. O fluxo de elétrons proveniente da oxidação dos carreadores NADH e FADH₂ é indicado pelas setas em vermelho. CI-V: representam os complexos I-V; Q: citocromo Q; cyt: citocromo c; OM: membrana mitocondrial externa; IM: membrana mitocondrial interna; IMS: espaço intermembranar; Matrix: matriz mitocondrial.



Fonte: Adaptado de CAMARGO et al. (2018, p. 665).

O Complexo II (CII), denominado succinato desidrogenase, participa tanto do ciclo do ácido cítrico quanto da CR, ou seja, catalisa a oxidação de succinato a fumarato, reduzindo o centro FAD a FADH₂ (no ciclo do ácido cítrico), ao passo que também oxida FADH₂ a FAD, transferindo esses elétrons à coenzima Q (que seguirá fornecendo à CR). O CII é o único que não possui subunidades codificadas pelo genoma mitocondrial, além de também não bombear prótons ao espaço intermembranar. É composto por quatro subunidades (A, B, C e D) organizadas em dois domínios: cabeça hidrofílica (subunidades A e B, voltadas à matriz, responsáveis por oxidar succinato) e domínio hidrofóbico transmembrana (subunidades C e D, onde ocorre a ligação da coenzima Q) (PROTASONI; ZEVIANI, 2021).

O Complexo III (CIII), ou ubiquinona-citocromo c oxirredutase, apresenta estrutura dimérica com 11 subunidades em humanos, na qual apenas uma é codificada pelo DNAm (citocromo b), cujo papel é o de se ligar à coenzima Q. O CIII tem a função de oxidar a coenzima Q, transferindo os elétrons provenientes dos CI e

CII ao citocromo c, além de realizar o bombeamento de prótons através da membrana mitocondrial interna até o espaço intermembranas (PROTASONI; ZEVIANI, 2021).

O Complexo IV (CIV), também chamado de citocromo c oxidase, é um dímero composto por 13 subunidades em mamíferos, das quais 10 são codificadas pelo genoma nuclear e três pelo DNAm (Figura 3). As subunidades codificadas pelo genoma mitocondrial compõem o centro catalítico da enzima, enquanto as demais subunidades atuam na estabilização estrutural do complexo. O CIV realiza a oxidação do citocromo c acoplada à transferência coordenada desses elétrons ao oxigênio molecular (aceptor final de elétrons da CR) que, ao se associar a H^+ , forma água. Ao mesmo tempo, há também bombeamento de prótons através da membrana mitocondrial interna, contribuindo assim, junto com os complexos I e III, com a geração do gradiente eletroquímico criado pela CR (PROTASONI; ZEVIANI, 2021).

A ATP-sintase, ou complexo V (CV), é composta por 29 proteínas em humanos, sendo apenas duas dessas codificadas pelo DNAm (Figura 3) (PROTASONI; ZEVIANI, 2021). Como já mencionado, é a enzima capaz de catalisar a síntese de ATP a partir da fosforilação de ADP. Neste ponto, vale ressaltar que a impermeabilidade da membrana mitocondrial interna (ver tópico 3.1) é essencial à manutenção do gradiente eletroquímico no espaço intermembranas. Isso implica dizer que a energia conservada no espaço intermembranas, também denominada força próton-motriz, favorece o retorno dos prótons do espaço intermembranas em direção à matriz mitocondrial pela ATP-sintase, a favor do gradiente eletroquímico, o que fornece a energia necessária para a síntese de ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico (P_i). O fluxo de H^+ passa através da ATP-sintase pelo seu canal formado no domínio de membrana F_o , enquanto a reação de catálise de ATP ocorre no domínio voltado à matriz, F_1 .

3.3 DNA mitocondrial

Além de serem popularmente conhecidas como “casa de força” das células, as mitocôndrias são singulares por possuírem DNA próprio, distinto do genoma nuclear. Assim como no caso do genoma bacteriano - e diferente do DNA nuclear - o DNAm da maioria dos metazoários consiste em uma molécula circular compacta. Além disso, o DNAm é envolto principalmente pelo fator de transcrição mitocondrial A (TFAM), responsável por empacotá-lo e por formar a estrutura denominada nucleóide (ALAM

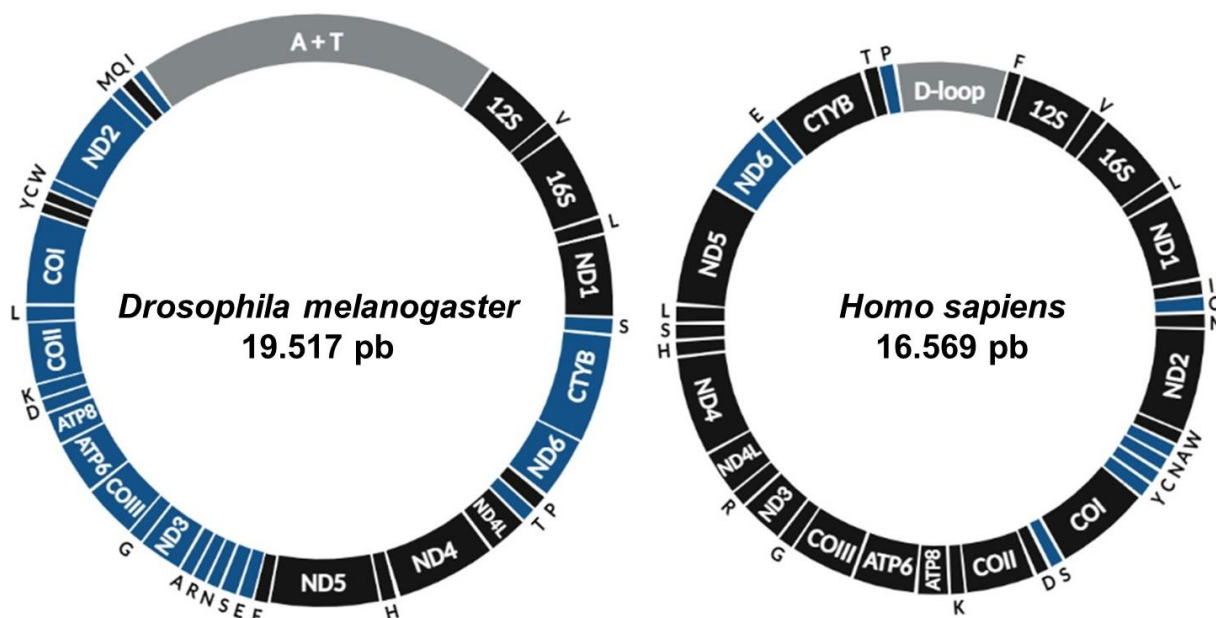
et al., 2003). Os nucleóides localizam-se na matriz da mitocôndria, próximos às cristas e à CR, e têm como papel primordial proteger o genoma mitocondrial da possível degradação causada pela produção de ROS inerente à atividade de OXPHOS (KANG D, KIM SH, 2007). A interação não coordenada entre o oxigênio e os elétrons provenientes, principalmente, dos complexos I e III, pode produzir ânion superóxido, uma das principais formas de ROS prejudiciais à organela (CHECA; ARAN, 2020; SUMEGI et al., 2017). Uma das hipóteses para explicar a proximidade física entre o DNAm t e a maior fonte geradora de ROS celular seria a regulação local da expressão gênica exercida pela mudança do potencial de membrana e/ou pelo estado de óxido-redução criados pela OXPHOS (GUSTAFSSON; FALKENBERG; LARSSON, 2016).

O DNAm t é uma molécula fita dupla conservada entre os animais, herdada maternamente, com aproximadamente 16 kb em humanos e 19 kb em *Drosophila* (Figura 3) (ANDERSON et al., 1981; LEWIS et al., 1994). É responsável por codificar 13 subunidades proteicas constituintes dos complexos da CR (CI, CIII e CIV) e da ATP-sintase (CV), além de dois RNAs ribossômicos e 22 RNAs transportadores, que são necessários durante o processo de tradução intra-mitocondrial. Estima-se que haja aproximadamente 1.200 polipeptídeos diferentes nas mitocôndrias, e que cerca de 90 desses formam o sistema OXPHOS (GUSTAFSSON; FALKENBERG; LARSSON, 2016). Isso significa dizer que as proteínas mitocondriais possuem origem mista, isto é, são codificadas tanto pelo DNAm t quanto nuclear. Consequentemente, tais proteínas podem ser traduzidas em ribossomos mitocondriais (no caso de RNAs mensageiros transcritos a partir do genoma mitocondrial) ou ribossomos citosólicos (quando provenientes de transcritos nucleares), sendo posteriormente direcionadas às mitocôndrias. Apesar do genoma mitocondrial contribuir com um pequeno número de proteínas constituintes do sistema OXPHOS, danos à expressão do DNAm t podem levar à falha grave na OXPHOS e consequente prejuízos ao organismo, como observado em camundongos (LARSSON et al., 1998) e em doenças mitocondriais humanas (ver tópicos 3.5).

O genoma mitocondrial não possui íntrons (é extremamente compacto) e apresenta sobreposição de alguns genes. Devido à alta proporção do nucleotídeo desoxiguanilato, uma das fitas do DNAm t é conhecida por fita pesada (*heavy strand*), enquanto a outra é denominada fita leve (*light strand*), pois acumula desoxicitidilato (GUSTAFSSON; FALKENBERG; LARSSON, 2016; MCKINNEY; OLIVEIRA, 2013). Há poucas e pequenas regiões intergênicas no DNAm t, com excessão da região não-

codificadora (Figura 3), em que estão presentes elementos *cis*-regulatórios capazes de coordenar eventos de replicação e tradução, e onde se encontra também a maior variação de sequências entre os animais (BOORE, 1999; GUSTAFSSON; FALKENBERG; LARSSON, 2016; MCKINNEY; OLIVEIRA, 2013). Em *D. melanogaster*, a região não-codificadora é denominada A+T devido à alta presença de desoxiadenilato e desoxitimidilato, os quais chegam a 96% dentro dessa região (LEWIS et al., 1994). Na região rica em A+T encontra-se a origem da replicação (Ori) das fitas pesada e leve, enquanto na região *D-loop* (presente em humanos) há apenas a origem da replicação da fita pesada (O_H). A origem da síntese da fita leve (O_L) em humanos localiza-se entre os genes *COI* e *ND2* (OLIVEIRA; GARESSE; KAGUNI, 2010).

Figura 3 – Representação do genoma mitocondrial de *D. melanogaster* e *H. sapiens*. A região não-codificadora de *Drosophila* (rica em A+T) e de humanos (*D-loop*) está ilustrada em cinza. Os genes codificados na fita pesada (*heavy strand*) e fita leve (*light strand*) estão mostrados em preto e azul, respectivamente. Genes que codificam RNAs transportadores aparecem como letras, e os genes da subunidade pequena e grande do RNA ribossômico estão representados como 12S e 16S, respectivamente. Genes que codificam subunidades pertencentes ao Complexo I da cadeia transportadora de elétrons: *ND1*, *ND2*, *ND3*, *ND4*, *ND4L*, *ND5*, *ND6*; Complexo III: *CTYB*; Complexo IV: *COI*, *COII*, *COIII*; Complexo V (ATP-sintase): *ATP6*, *ATP8*.



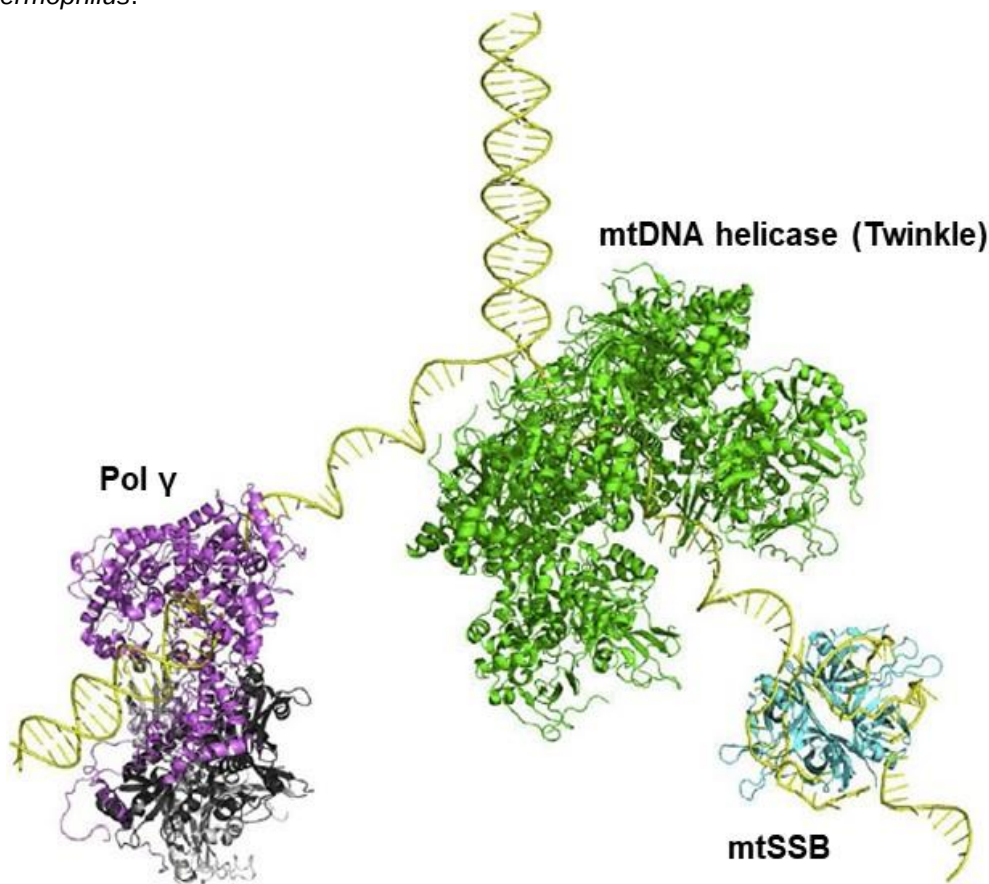
Fonte: Figura elaborada pela aluna com a utilização do software BioRender.com.

3.4 Replissomo mitocondrial mínimo

A replicação do DNAm_t pode ser conduzida por um conjunto de pelo menos três proteínas, codificadas pelo genoma nuclear, que atuam diretamente na forquilha replicativa e constituem o chamado “replissomo mitocondrial mínimo” (Figura 4). A associação entre a helicase replicativa mitocondrial (Twinkle) e a DNA polimerase γ (Pol γ) é capaz de replicar até 2 kb de um fragmento de DNA circular *in vitro*. Contudo, quando há adição da proteína ligante a DNA fita simples mitocondrial (mtSSB) à Twinkle e à Pol γ , o fragmento de DNA replicado chega a 16 kb, que consiste no tamanho encontrado para o genoma mitocondrial de mamíferos. Associado ao fato de que tanto Twinkle quanto Pol γ só desempenham suas funções propriamente ditas quando trabalham em conjunto (KORHONEN et al., 2004), assume-se que ambas as enzimas somadas à mtSSB são suficientes para a replicação da molécula de DNA na mitocôndria.

À frente do replissomo mitocondrial está a Twinkle, cujo papel primordial é promover a abertura da dupla-fita de DNAm_t parental durante a replicação. Para tanto, Twinkle hidrolisa ATP para se translocar no sentido 5'-3' sobre uma das fitas de DNA, expondo assim o DNA simples-fita parental para que a Pol γ possa atuar. Utilizando como molde o DNA simples-fita gerado pela atividade de helicase da Twinkle, Pol γ , por sua vez, sintetiza uma nova fita de DNA, papel esse que requer a ação equilibrada de suas atividades enzimáticas de polimerase 5'-3' e exonuclease 3'-5'. A mtSSB é responsável por se ligar ao DNA fita simples parental prevenindo possíveis degradações causadas por nucleólise, além de também coordenar e potencializar a atividade de abertura do DNA feita pela Twinkle, e de síntese de DNA pela Pol γ (FALKENBERG; GUSTAFSSON, 2020; MCKINNEY; OLIVEIRA, 2013). O funcionamento correto da maquinaria replicativa mitocondrial é necessário para a manutenção da integridade do DNAm_t.

Figura 4 – Representação do replissomo mitocondrial mínimo encontrado em humanos, exibindo a estrutura quaternária da Twinkle (mtDNA helicase), Pol γ e mtSSB. A representação está em escala, mas não mostra as interações proteína-proteína específicas que ocorrem durante a replicação do DNAm. As estruturas da Pol γ e mtSSB foram baseadas nas estruturas cristalográficas publicadas para tais proteínas. A representação da Twinkle é baseada na estrutura da helicase DnaB de *Bacillus stearothermophilus*.



Fonte: CIESIELSKI; OLIVEIRA; KAGUNI, 2016, p. 257.

3.4.1 Helicase replicativa mitocondrial (Twinkle)

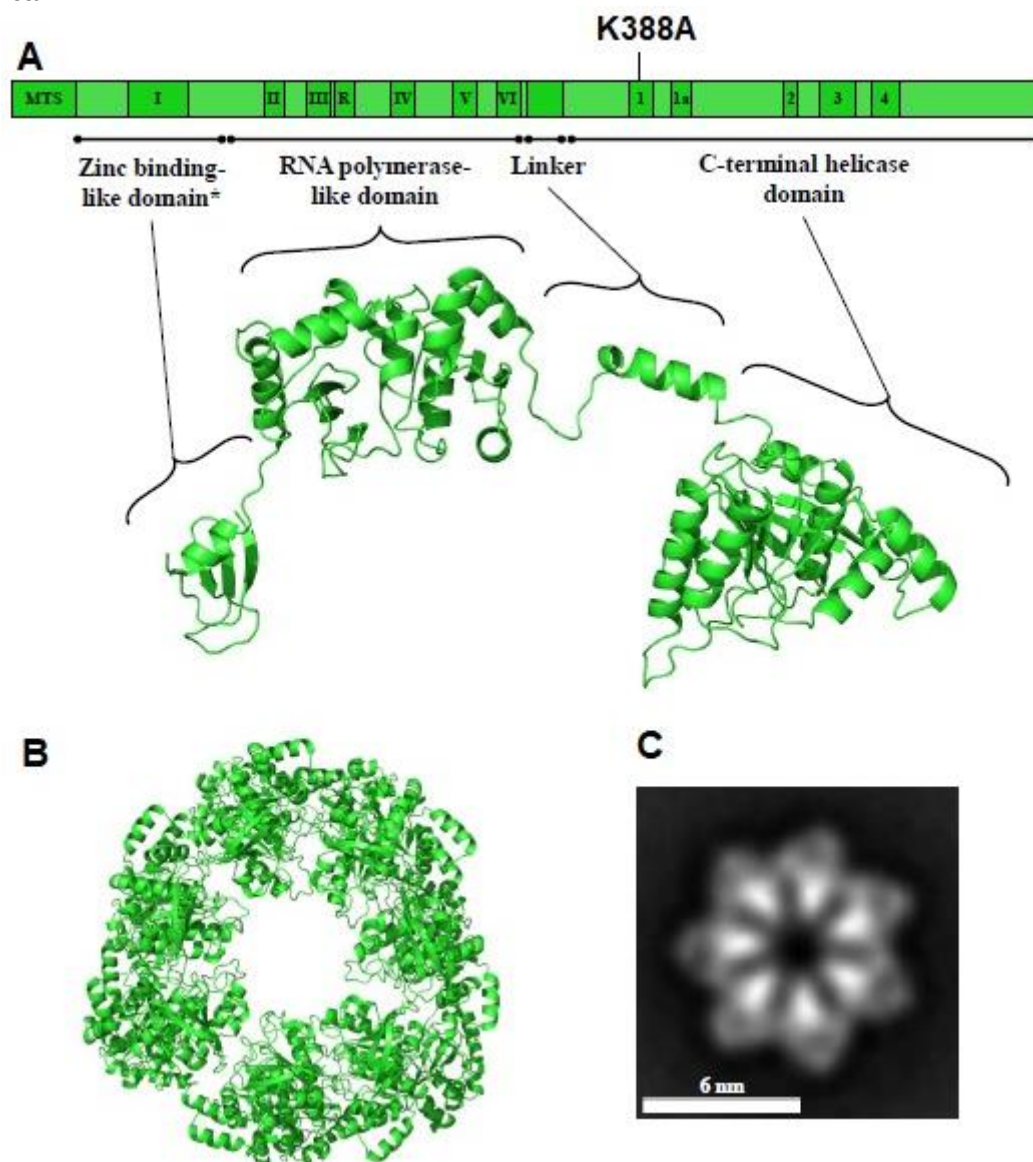
A Twinkle foi identificada pela primeira vez em pacientes acometidos pela doença Oftalmoplegia Progressiva Externa de herança autossômica dominante (adPEO) (SPELBRINK et al., 2001). Quando descrita, Twinkle foi proposta como sendo uma helicase replicativa por compartilhar alta homologia com a enzima bifuncional helicase-primase gp4 do bacteriófago T7, a qual é amplamente utilizada como modelo para novas helicases encontradas (SPELBRINK et al., 2001). Twinkle faz parte da superfamília 4 (SF4) das helicases e pertence à família de ATPases AAA⁺ (*ATPases Associated with diverse cellular Activities*), cujos motivos conservados, incluindo *Walker A* e *Walker B*, são essenciais para sua atividade catalítica dentro dos mais variados táxons (CARUTHERS; MCKAY, 2002; KAGUNI; OLIVEIRA, 2016).

Mais especificamente, o motivo *Walker A* da Twinkle é importante para a estabilização/ligação do ATP devido à interação entre o grupo amino da lisina com o fosfato da molécula de ATP, além de haver ligação da hidroxila da treonina ou serina ao Mg^{2+} , necessário para estabilizar a reação de hidrólise do ATP (PETER; FALKENBERG, 2020).

A Twinkle possui conformação em anel com estado oligomérico variável, ou seja, dependendo das concentrações iônicas do meio ou das variações de temperatura e quantidade de ATP, a enzima pode apresentar seis ou sete subunidades (homoheptâmero mostrado nas Figuras 5 B, C). Cada protômero tem cerca de 72 kDa, e é formado pelos domínios estruturais C-terminal helicase e N-terminal *primase-like* (*zinc binding-like domain* e *RNA polymerase-like domain*), conectados pela região *linker* (Figura 5 A). O domínio C-terminal helicase é responsável pela abertura da dupla-fita de DNA e hidrólise de ATP durante a replicação, ou seja, relaciona-se à atividade de helicase da enzima, principalmente pela presença dos seus cinco motivos conservados. A região N-terminal, por sua vez, apresenta diversidade de funções entre as espécies. Por exemplo, na enzima gp4 do bacteriófago T7 a região N-terminal funciona como uma primase, pois o domínio de ligação ao zinco (*zinc binding-like domain*) se liga ao DNA simples-fita, seguido por síntese de primers pelo domínio de RNA polimerase (*RNA polymerase-like domain*) (PETER; FALKENBERG, 2020; SPELBRINK et al., 2001). Já em *D. melanogaster*, o domínio de ligação ao zinco se liga, na verdade, a um *cluster* de ferro-enxofre coordenado por resíduos de cisteína homólogos aos de gp4 do bacteriófago T7 (CIESIELSKI; OLIVEIRA; KAGUNI, 2016).

Em vertebrados, no entanto, existe apenas um dos quatro resíduos de cisteína presentes no domínio N-terminal que coordenam o zinco (necessário à atividade de primase) em gp4. Por essa razão, é predito que a Twinkle de vertebrados tenha perdido sua atividade de primase pela falta das cisteínas, como resultado de um processo de evolução divergente (CIESIELSKI; OLIVEIRA; KAGUNI, 2016; PETER; FALKENBERG, 2020; ZIEBARTH; FARR; KAGUNI, 2007). No caso do *cluster* de ferro-enxofre relatado em *D. melanogaster* - que não está presente em humanos - há a hipótese de que este tenha sofrido pressão evolutiva no sentido de funcionar como um “sensor” do estado redox dentro da mitocôndria de insetos, potencialmente conectando a replicação do DNAm à formação excessiva de ROS (CIESIELSKI; OLIVEIRA; KAGUNI, 2016).

Figura 5 – Representação esquemática e modelo estrutural da Twinkle humana. (A) Representação dos motivos conservados de seqüências de aminoácidos da Twinkle. K388A consiste na mutação localizada no motivo conservado 1 (*Walker A*) da Twinkle, modelada em *D. melanogaster* e utilizada neste trabalho. MTS (do inglês, *mitochondrial target sequence*); I–VI: motivos conservados localizados no domínio N-terminal; R: motivo básico RNAP de primases procarióticas; 1–4 e 1a: motivos conservados em helicases da superfamília 4. Abaixo, modelo estrutural do protômero da Twinkle, destacando sua arquitetura modular organizada em domínios N-terminal (*Zinc binding-like domain* e *RNA polymerase-like domain*), região intermediária (*Linker*) e domínio C-terminal (*C-terminal helicase domain*). (B) Modelo homoheptamérico, mostrando o canal central de passagem do DNA fita simples. (C) Imagem da configuração homoheptamérica da Twinkle recombinante obtida por microscopia eletrônica.



Fonte: Adaptado de KAGUNI; OLIVEIRA, 2016, p.16.

3.4.2 DNA polimerase γ (Pol γ)

A síntese das novas fitas de DNAm_t é realizada pela Pol γ , que em humanos consiste em um heterotrímero composto por uma subunidade catalítica de 140 kDa,

denominada Pol γ A (codificada pelo gene *POLG*) e duas subunidades acessórias de 110 kDa, chamadas de Pol γ B (codificada pelo gene *POLG2*). Mostrando as variações existentes entre os eucariotos, tem-se que em *D. melanogaster* a Pol γ é formada por somente uma subunidade Pol γ A (codificada pelo gene *PolG1*, anteriormente denominado *tamas*) e uma Pol γ B (gene *PolG2*), enquanto que em *Saccharomyces cerevisiae* a subunidade Pol γ B foi perdida, restando apenas o monômero Pol γ A (GUSTAFSSON; FALKENBERG; LARSSON, 2016).

Pol γ apresenta três atividades catalíticas distintas. A primeira delas é realizada pela subunidade Pol γ A, e consiste na atividade de polimerase 5'-3' propriamente dita, isto é, de síntese de DNA utilizando como molde as fitas parentais expostas pela ação da Twinkle. Ainda na subunidade Pol γ A, tem-se o domínio responsável pelo segundo papel da enzima, que é aquele de atividade exonucleásica 3'-5', a qual permite a alta fidelidade durante a replicação das fitas filhas, cuja frequência de erro é menor do que 1×10^{-6} (LONGLEY et al., 2001). A terceira função da Pol γ consiste na atividade 5'-3' ligase, cuja contribuição no reparo da excisão de bases lesionadas eleva ainda mais a fidelidade replicativa do DNAm (PINZ; BOGENHAGEN, 2006). Além disso, vale a pena destacar que as subunidades acessórias Pol γ B aumentam a interação entre a fita molde do DNAm e o replissomo mitocondrial, potencializando a atividade de síntese e reparo da Pol γ .

3.4.3 Proteínas ligantes a DNA fita simples mitocondrial (mtSSB)

Proteínas ligantes a DNA fita simples mitocondrial (mtSSB) possuem estrutura homotetramérica de 13-18 kDa. São amplamente conservadas entre os metazoários, e são encontradas desde leveduras a humanos (PAVCO; VAN TUYLE, 1985; VAN DYCK et al., 1992). Conforme já mencionado, mtSSB tem papel primordial na ligação e proteção do DNA fita simples durante a replicação. Além disso, estudos *in vitro* têm demonstrado que a mtSSB é responsável por coordenar e estimular a interação existente dentro do replissomo mitocondrial entre a Twinkle e a Pol γ , tanto em *D. melanogaster* quanto em humanos (OLIVEIRA; KAGUNI, 2011). O papel da mtSSB é evidente principalmente em *D. melanogaster*, visto que danos ao gene nuclear codificador dessa proteína (gene *mtSSB* em *Drosophila*, anteriormente denominado *lopo*) causou letalidade ainda na fase larval da mosca, assim como queda no número de cópias de DNAm e falhas na OXPHOS (MAIER et al., 2001). O *knockdown* de

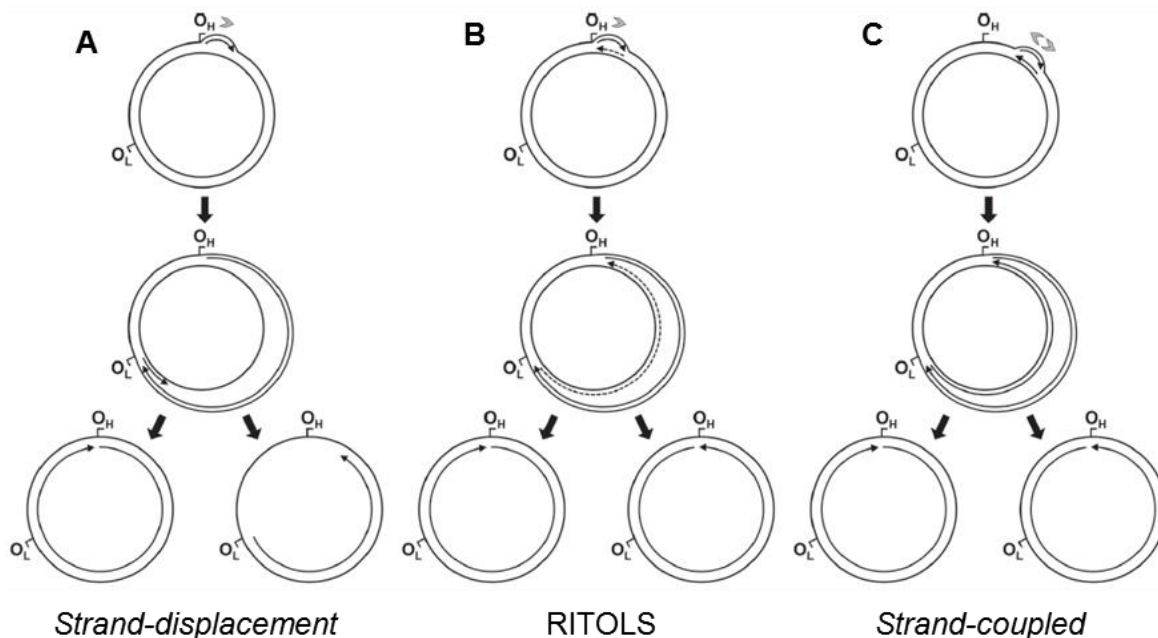
mtSSB em células humanas em cultura e em células S2 de *Drosophila* também levaram à depleção do DNAm (FUKUOH et al., 2014; RUHANEN et al., 2010).

3.5 Replicação do DNA mitocondrial

A replicação fidedigna do DNAm de animais é essencial à manutenção da homeostase celular, principalmente ao considerar a importância desse genoma na codificação de subunidades proteicas necessárias à síntese de ATP durante as reações de OXPHOS (MCKINNEY; OLIVEIRA, 2013).

O primeiro mecanismo descrito para mamíferos é conhecido como *strand-displacement* (fita deslocada) ou *strand-asynchronous* (fita assíncrona) (GUSTAFSSON; FALKENBERG; LARSSON, 2016; MCKINNEY; OLIVEIRA, 2013). No modelo *strand-displacement* (Figura 6 A), a síntese da fita pesada (contínua) inicia-se na origem O_H , dentro da região não-codificadora (*D-loop*) e, após cerca dois terços da fita pesada ter sido replicada, inicia-se a síntese da fita leve (descontínua) na origem de replicação O_L (KANG et al., 1997). Assim, a replicação *strand-displacement* prossegue de modo assimétrico e unidirecional. Um segundo mecanismo descrito para vertebrados é denominado RITOLS (*RNA incorporation throughout the lagging strand*) (Figura 6 B), o qual demonstra a existência de extensos segmentos de RNA incorporados à fita leve durante a replicação (ao longo de 200-600 nucleotídeos). A replicação nesse caso é unidirecional e acoplada entre as fitas, iniciando-se dentro da região *D-loop*. Os segmentos de RNA incorporados são, posteriormente, processados em DNA (REYES et al., 2013; YASUKAWA et al., 2006). O terceiro mecanismo relatado em vertebrados é intitulado *strand-coupled* (fita acoplada) (Figura 6 C), cuja principal característica é a replicação acoplada entre a fita contínua e descontínua, assim como ocorre em DNA bacteriano (GUSTAFSSON; FALKENBERG; LARSSON, 2016; MCKINNEY; OLIVEIRA, 2013). É interessante mencionar que diferentes mecanismos de replicação do DNAm podem ser encontrados em um mesmo organismo, dependendo do tecido em questão. Por exemplo, em camundongos adultos foi relatado que órgãos com alta demanda energética, tais como cérebro e coração, o modelo replicativo é o *strand-coupled*, enquanto que em outros tecidos o modelo frequente é *strand-displacement* (HERBERS et al., 2019).

Figura 6 – Representação dos modelos de replicação do DNAm. (A) No modelo *strand-displacement*, a replicação da fita pesada (contínua) inicia-se no sítio O_H e prossegue no sentido da seta. Após parte dessa fita ser sintetizada, inicia-se a replicação da fita leve (descontínua) a partir do sítio O_L . (B) No modelo RITOLS, observa-se a inserção de diversos fragmentos de RNA ao longo da fita leve (seta pontilhada). (C) No modelo *strand-coupled* ocorre a síntese acoplada das fitas filhas.



Fonte: MCKINNEY; OLIVEIRA, 2013, p. 310.

Ao utilizar células S2 de *Drosophila* em cultura, bem como macerados da mosca adulta inteira, foi descrito um mecanismo principal de replicação do DNAm para ambos os modelos. Por meio da análise dos intermediários da replicação usando a técnica de eletroforese bidimensional em gel de agarose neutro (2D-NAGE), demonstrou-se que a replicação em *D. melanogaster* começa e termina dentro da região não-codificadora, denominada A+T, e acontece de modo unidirecional, com síntese acoplada entre as fitas pesada e leve na forquilha replicativa (JÖERS; JACOBS, 2013). Esse modelo encontrado em *D. melanogaster* por Jöers e Jacobs (2013), que também ocorre em vertebrados, é denominado *strand-coupled* (fita acoplada) (Figura 6 C). Outro mecanismo encontrado em invertebrados é o modelo *rolling circle*, caracterizado em *Caenorhabditis elegans*. Nesse modelo ocorre a clivagem da fita parental por uma endonuclease, seguido por início da replicação das fitas filhas de modo unidirecional, a partir do “rolamento” das fitas parentais. Esse mecanismo de replicação é encontrado também no DNAm de fungos e plantas, e para alguns tipos de bacteriófagos (LEWIS et al., 2015).

3.6 Doenças mitocondriais

O termo “Doença Mitocondrial” engloba síndromes genéticas causadas por mutações no DNA nuclear ou mitocondrial, que afetam as reações de OXPHOS ou outras funções mitocondriais. Uma variedade de sintomas com manifestações neurológicas ou sistêmicas podem ser apresentados pelos pacientes, incluindo miopatias, encefalopatias, cardiopatias, demência, diabetes e até mesmo cegueira, entre outras (GORMAN et al., 2016; ZEVIANI; DI DONATO, 2004). Além disso, disfunções mitocondriais também podem se relacionar com o envelhecimento e a formação excessiva de ROS (MCKINNEY; OLIVEIRA, 2013). No entanto, tecidos/órgãos conhecidos por serem metabolicamente mais ativos são os mais afetados no caso das patologias mitocondriais, como no caso do tecido muscular e do sistema nervoso (MCFARLAND; TAYLOR; TURNBULL, 2010).

As doenças mitocondriais podem apresentar origens variadas, indo desde herança autossômica ou ligada ao cromossomo X para mutações no DNA nuclear (herança mendeliana) a herança materna para mutações no DNAMt (herança citoplasmática). Considerando que o DNAMt apresenta múltiplas cópias dentro da célula, a proporção da mistura de moléculas de DNAMt selvagem com DNAMt mutado em uma dada célula/tecido pode ser determinante na severidade ou desencadeamento da doença, fato conhecido como heteroplasmia. Esse cenário é distinto das disfunções de herança autossômica, cuja combinação de dois alelos já pode ser suficiente para desencadear a doença (GORMAN et al., 2016; TUPPEN et al., 2010). Estima-se que 1 a cada 5.000 pessoas seja acometida por alguma doença mitocondrial causada por mutações no genoma mitocondrial ou por falhas em sua manutenção (CHINNERY et al., 2000). No entanto, mutações patogênicas que acometem o DNAMt podem ser subnotificadas devido à natureza multicópia desse genoma, podendo estar presentes na população em 1 para cada 200 pessoas (ELLIOTT et al., 2008).

Danos nos genes nucleares responsáveis por manter e codificar proteínas constituintes do replissomo mitocondrial podem causar substituições de nucleotídeos, deleções e duplicações que levam à perda da integridade do genoma mitocondrial. Além disso, falhas na manutenção do número de cópias de DNAMt nas diferentes células podem impactar o nível de transcrição dos genes codificados no DNAMt e, consequentemente, alterar o funcionamento mitocondrial (SPINAZZOLA; ZEVIANI,

2005). A doença Oftalmoplegia Progressiva Externa de herança autossômica dominante (adPEO) é causada principalmente por falhas no processo de replicação do DNAm, sendo associada com a presença de múltiplas deleções no DNAm principalmente em fibras musculares, bem como no córtex cerebral, gânglios da base e cerebelo, além de fraqueza na musculatura externa dos olhos e/ou na musculatura esquelética (SANCHEZ-MARTINEZ et al., 2012; SPELBRINK et al., 2001; SUOMALAINEN et al., 1997). Esse distúrbio pode ser causado por mutações no gene *TWINK* ou *POLG*, responsáveis por codificar a Twinkle e a Pol γ A, respectivamente. Mutações nas enzimas Twinkle e Pol γ A estão associadas também à neuropatia, disartria e oftalmoplegia sensório-atática (SANDO) e ataxia espinocerebelar de início infantil (IOSCA) (SANCHEZ-MARTINEZ et al., 2012).

Atualmente, há mais de 40 mutações descritas para o gene humano *TWINK* (<https://www.omim.org/entry/606075>). Embora essas mutações tenham consequências clínicas heterogêneas, existe uma tendência dos tecidos envolvidos com o sistema neurocolomotor serem os principais afetados. Em pacientes acometidos por adPEO, ainda não se sabe ao certo as causas moleculares que levam aos danos neuromusculares mencionados, mas acredita-se que defeitos na oligomerização da Twinkle contribuam efetivamente para a progressão da doença (PETER et al., 2019). É predito que as mutações descritas para Twinkle humana, principalmente aquelas que mapeiam no domínio *linker*, prejudicam a formação ou estabilidade da interação entre duas subunidades do oligômero, inviabilizando a formação do sítio de ligação ao ATP e, conseqüentemente, tornando a enzima defeituosa (KAGUNI; OLIVEIRA, 2016).

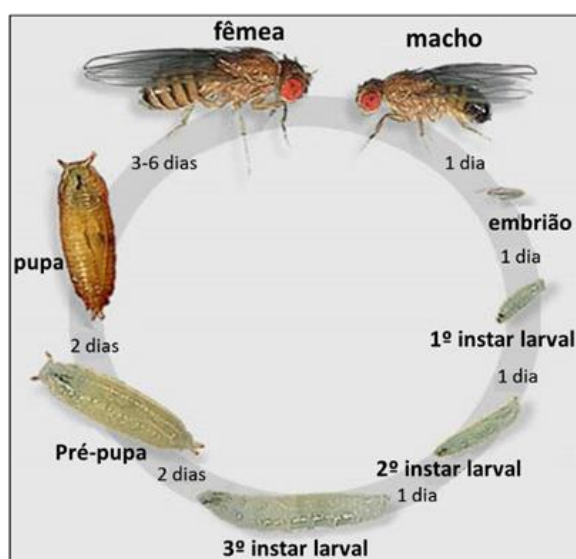
3.7 *Drosophila melanogaster* como organismo modelo

A utilização de *D. melanogaster* como organismo modelo em estudos envolvendo genética iniciou-se há mais de 100 anos com o pesquisador Thomas Hunt Morgan, responsável por descrever a hereditariedade cromossômica utilizando esse animal, o que lhe rendeu o prêmio Nobel de Medicina em 1.933 (YAMAGUCHI; YOSHIDA, 2018). A mosca da fruta possui características únicas que a tornam um excelente modelo experimental, isso porque além de ser facilmente cultivada em laboratório, apresenta um ciclo de vida curto a 25°C (Figura 7). Além disso, o fato de ser um animal holometábolo, isto é, que apresenta metamorfose completa (possui

fases de ovo, larva, pupa e adulto), torna possível o estudo de mecanismos moleculares em um mesmo animal, mas com demandas metabólicas totalmente distintas. Outro ponto importante é a sua similitude genética com os humanos: 75% de doenças genéticas que ocorrem em pacientes têm compatibilidade no genoma de *D. melanogaster* (PROKOP, 2013).

Para trabalhar corretamente com *Drosophila* é necessário conhecer a sua anatomia. Isso implica dizer que ao planejar os cruzamentos experimentais, deve-se levar em conta que as fêmeas são capazes de estocar espermatozoide em seu aparelho reprodutor por um longo período. Desse modo, é necessário coletar fêmeas virgens a fim de que se torne possível planejar com quais machos essas se acasalarão (PROKOP, 2013). *D. melanogaster* possui três pares de cromossomos autossômicos e um par de cromossomos sexuais (fêmea XX e macho XY). Os cromossomos balanceadores consistem em uma importante ferramenta genética nos estudos com *Drosophila*. Esses cromossomos possuem múltiplas inversões e são letais em homozigose pela presença de alelos mutantes recessivos. Entretanto, quando em heterozigose, tais inversões proporcionam a não ocorrência do evento de *crossing-over* entre o balanceador e seu homólogo. Com isso, é possível transmitir ao longo de gerações determinado gene de interesse sem que eventos de recombinação homóloga leve a alterações do loco de interesse (KLUG et al., 2010).

Figura 7 – Fases do ciclo de vida de *D. melanogaster*. Da fertilização do ovo, passagem pelos estágios larvais (L1, L2 e L3), estágios pupais e emergência do adulto, tem-se um período de 10-14 dias a 25°C.



Fonte: adaptado de PROKOP, 2013, p. 02.

4 MATERIAL E MÉTODOS

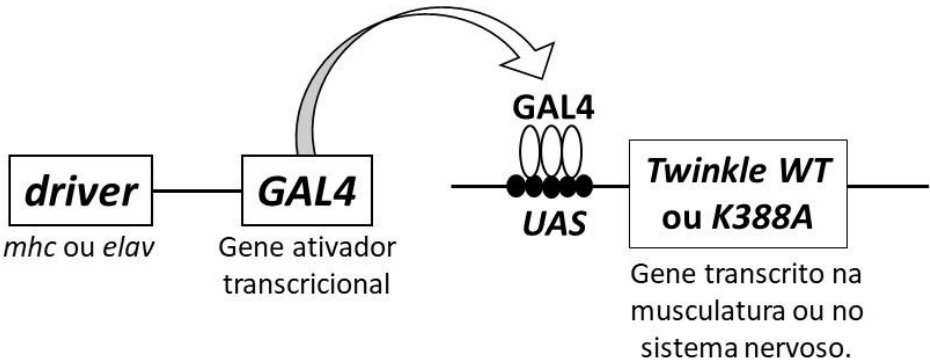
4.1 Linhagens experimentais

As moscas *UAS-Twinkle* foram desenvolvidas pelo laboratório do Prof. Dr. Rafael Garesse, Universidade Autônoma de Madri, Espanha, e cedidas pelo Dr. Álvaro Sanchez-Martinez, Universidade de Sheffield, Inglaterra. Os *drivers embryonic lethal abnormal vision*^{C155}-*GAL4* (*elavGAL4*) e *myosin heavy chain-GAL4* (*mhcGAL4*), bem como a linhagem controle *w¹¹¹⁸*, foram obtidos de centros de estoque. Para a realização dos experimentos utilizando as linhagens Twinkle, foi necessária a obtenção da prole expressando as variantes da enzima apenas em células neuronais ou musculares, por meio do planejamento de cruzamentos específicos entre as linhagens parentais (Tabela 1). Desse modo, fazendo uso do sistema de indução de expressão *UAS/GAL4* (BRAND; PERRIMON, 1993), moscas parentais que carregam o transgene da Twinkle (*UAS-Twinkle WT/TM6B* ou *UAS-Twinkle K388A*) foram cruzadas com os *drivers elavGAL4* ou *mhcGAL4*, induzindo, assim, a superexpressão da enzima nos tecidos nervoso (*elav>Twinkle*) ou muscular (*mhc>Twinkle*) da prole (Tabela 1). Isso ocorre porque moscas *elavGAL4* e *mhcGAL4* fornecem o fator de transcrição GAL4 de *Saccharomyces cerevisiae*, que reconhece especificamente o promotor *UAS* fundido aos transgenes de interesse, constituindo o sistema induzível para expressão transgênica (Figura 8) (BRAND; PERRIMON, 1993). Além disso, foram feitos cruzamentos controles utilizando indivíduos *w¹¹¹⁸*, que compõe o *background* genético das linhagens em questão.

Tabela 1 – Delineamento experimental. Moscas *UAS-Twinkle*, quando cruzadas com drosófilas que possuem o gene codificador do fator de transcrição *GAL4* (*elavGAL4* ou *mhcGAL4*), induzem na prole a superexpressão tecido-específico da *Twinkle*. Animais provenientes de cruzamentos controle com *w¹¹¹⁸*, por não codificarem o fator de transcrição *GAL4*, não superexpressam *Twinkle*.

Linhagens parentais		Prole	
♀ Virgens	Cruzadas com ♂	Nomenclatura	Característica
<i>UAS-Twinkle WT/TM6B</i>	<i>w¹¹¹⁸</i>	<i>w¹¹¹⁸>Twinkle WT</i>	Controle para <i>Twinkle WT</i>
	<i>mhcGAL4</i> (driver de musculatura)	<i>mhc>Twinkle WT</i>	Superexpressão da <i>Twinkle WT</i> em musculatura
<i>UAS-Twinkle K388A</i>	<i>w¹¹¹⁸</i>	<i>w¹¹¹⁸>Twinkle K388A</i>	Controle para <i>Twinkle K388A</i>
	<i>mhcGAL4</i> (driver de musculatura)	<i>mhc>Twinkle K388A</i>	Superexpressão da <i>Twinkle K388A</i> em musculatura
<i>elavGAL4</i> (driver do sistema nervoso)	<i>UAS-Twinkle WT/TM6B</i>	<i>elav>Twinkle WT</i>	Superexpressão da <i>Twinkle WT</i> no sistema nervoso
	<i>UAS-Twinkle K388A</i>	<i>elav>Twinkle K388A</i>	Superexpressão da <i>Twinkle K388A</i> no sistema nervoso
	<i>w¹¹¹⁸</i>	<i>elav>w¹¹¹⁸</i>	Controle do driver <i>elavGAL4</i>

Figura 8 – Representação esquemática do sistema induzível *UAS/GAL4*. A prole carrega o gene ativador transcrional, que é responsável por codificar de modo tecido-específico o fator de transcrição *GAL4* (elipses em branco), que se liga especificadamente ao sítio *UAS* (*Upstream Activation Sequence*, elipses em branco). Com isso, o transgene de interesse (*Twinkle WT* ou *K388A*) será transcrito, levando à produção da *Twinkle* na musculatura ou no sistema nervoso das moscas.



Fonte: Figura elaborada pela aluna.

4.2 Cultivo de *Drosophila*

As linhagens experimentais foram cultivadas integralmente em uma incubadora a 25°C, com fotoperíodo controlado (12h/12h). A alimentação das drosófilas baseou-se em uma dieta padrão contendo glicose, sacarose, melaço de cana-de-açúcar, farinha de soja e de milho, germe de trigo, ágar, fermento, nipagin e ácido propiônico (FERNANDEZ-AYALA et al., 2009). A umidade dos tubos durante o desenvolvimento das larvas foi mantida por meio da adição manual de 2-3 gotas de água destilada autoclavada sobre a dieta.

4.3 Viabilidade pupal

A viabilidade pupal consiste em verificar a proporção de moscas que completaram a metamorfose. Desse modo, foi feita a razão entre a quantidade de indivíduos adultos emergentes das pupas, pelo total de pupas existentes nos tubos de cultivo, e os resultados foram expressos como média e desvio padrão em torno da taxa de emergência. A oviposição das fêmeas foi monitorada, não devendo ultrapassar 60-90 ovos por frasco. Os cruzamentos foram feitos em triplicata, com 6-8 tubos para cada repetição, utilizando como parentais 15 fêmeas virgens e 7 machos por tubo.

4.4 Ensaio de longevidade

Foi realizado o ensaio de longevidade a fim de verificar se a mutação K388A na Twinkle afetaria a longo prazo a viabilidade dos indivíduos adultos. Para a execução do teste, foram selecionados 100-200 machos e fêmeas recém-emergidos da pupa, provenientes de cruzamentos nos quais a expressão dos transgenes foi direcionada aos neurônios ou ao tecido muscular, ou de cruzamentos controle. A cada três dias, as moscas foram transferidas para novos tubos de cultivo e os indivíduos mortos foram contabilizados para que fosse gerado um gráfico de sobrevivência contemplando todo o tempo de vida das moscas.

4.5 Teste de escalada

Para a realização do teste, foram selecionadas no gelo entre 40-80 moscas fêmeas e machos com 3 dias após emergência das pupas, provenientes dos cruzamentos mencionados anteriormente (Tabela 1). Após 1 h de aclimação a 25°C, 10 desses animais foram colocados em um tubo cilíndrico transparente de 19 cm de altura, individualizados segundo seu genótipo e sexo. Após, o tubo foi delicadamente batido sobre a bancada 3-6 vezes (para que todas as moscas caíssem no fundo do tubo), seguido por mensuração do número de moscas que ultrapassaram a marca dos 6 cm de escalada em um intervalo de 5 s. A cada repetição, os tubos eram renovados para que a possível liberação de fluídos das moscas que passaram previamente por lá não interferisse no resultado. Os experimentos foram filmados usando uma câmera posicionada a 20 cm de distância dos tubos e os vídeos foram analisados posteriormente com auxílio do software Image J (RUEDEN et al., 2017).

4.6 Preparação do extrato mitocondrial cru

A obtenção do extrato mitocondrial cru (EMC) foi realizada a partir de adultos cultivados a 25°C, com até 5 dias após emergência das pupas. Cerca de 40 tórax de machos *mhc>Twinkle* e 200 cabeças de machos e fêmeas *elav>Twinkle* de cada cruzamento foram macerados em 1 mL de tampão de isolamento (200 mM sacarose, 5mM Tris/HCl, 2mM EGTA, 2 mM DTT, pH 7,4) no gelo, e centrifugados a 4°C por 1 min a 200 g_{max} . O sobrenadante foi novamente centrifugado a 4°C por 3 min, e, após, por 10 min a 9.000 g_{max} . O pellet contendo o EMC foi ressuspense em 1 mL de tampão de isolamento, e recentrifugado a 9.000 g_{max} por 10 min, a fim de reduzir a contaminação do EMC com proteínas solúveis no citoplasma. O pellet contendo EMC foi então ressuspense em 200 μ L de tampão de isolamento, e a quantidade total de proteínas das amostras foi quantificada via absorbância a 280 nm utilizando o NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

4.7 Western blotting

Respectivamente, 80 μ g e 40 μ g das amostras de EMC de tórax e cabeça, foram misturadas ao tampão 4X Laemmli (10% SDS, 50% glicerol, 25% 2-

mercaptoetanol, 0,02% azul de bromofenol e 0,3125 M Tris-HCl, pH 6,8), seguido de desnaturação a 95°C por 5 min. As amostras foram submetidas à técnica de SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 12%, por 3 h de corrida a 80 V. O conteúdo do gel foi então transferido a uma membrana de nitrocelulose utilizando um sistema de transferência semi-seca (Major Science, USA) por 7 min a temperatura ambiente. As membranas foram inicialmente bloqueadas *overnight* a 4°C em solução de PBS/Tween 20 (8 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 150 mM NaCl, 30 mM KCl, 0,05% Tween 20, pH 7,4) contendo 5% de leite em pó desnatado. Posteriormente, a membrana contendo as amostras de EMC provenientes de tórax foi incubada com uma mistura de anticorpos primários (anti-Dm helicase policlonal de coelho 1:10.000 (MATSUSHIMA; KAGUNI, 2007) e anti-PDH E1α monoclonal de camundongo 1:12.000 (Abcam, Reino Unido)) em PBS/Tween 20 contendo 1% de leite em pó desnatado, por 1 h 30 min a temperatura ambiente. Após, foram feitas três lavagens de 30 min com PBS/Tween 20 e posterior incubação com os anticorpos secundários (anti-IgGs de coelho e camundongo conjugados a HRP (Bio-Rad, EUA) por 4 h e lavagens, como descrito acima. A membrana foi incubada com o sistema de detecção de luminol Immun-Star HRP (Bio-Rad) e os sinais de quimioluminescência foram detectados utilizando ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad, USA).

A membrana contendo as amostras de EMC das cabeças foi tratada com o anticorpo primário anti-Dm helicase e pelo secundário anti-IgGs de coelho e camundongo conjugados a HRP, seguido por detecção dos sinais de quimioluminescência como descrito acima. Após, os anticorpos primários e secundários foram removidos por meio da incubação da membrana em solução de 200 mM glicina, SDS 0,1%, 1% Tween 20, pH 2,2, por 30 min a temperatura ambiente. A membrana foi então bloqueada novamente e tratada com o anticorpo primário anti-ATP5A monoclonal de camundongo (1:10.000, Abcam, Reino Unido) e o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a HRP, seguido por processamentos como descrito acima.

4.8 Extração de DNA total

Para realizar a extração do DNA total (DNAt) utilizando as linhagens Twinkle cruzadas com *elavGAL4*, *mhcGAL4* ou *w¹¹¹⁸*, foram coletadas no gelo 10 cabeças ou 3 tórax de machos adultos em triplicata, com 7 dias após a emergência da pupa. As

cabeças e os tórax foram macerados no gelo em 500 µL de tampão de lise (75 mM NaCl, 25 mM EDTA, 25 mM HEPES, pH 7,5), seguido por adição de 50 µL de SDS 10% e 10 µL de proteinase K (20 mg/ml). Após as amostras serem incubadas por 1 h a 37°C, foram adicionados aos tubos 500 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:14:1), seguido por 4 inversões dos tubos e incubação no gelo por 1 min. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 2.000 g_{max} por 5 min a 4°C. A fase superior da solução foi resgatada, seguido por mais uma repetição do passo anterior. O DNA foi precipitado com 80 µL de 10 M acetato de amônio e 1 mL de etanol 100% gelado *overnight* a -20°C. As amostras foram centrifugadas a 16.000 g_{max} por 30 min a 4°C e lavadas com etanol 70% gelado. Após secagem no liofilizador por 15 min, o DNA foi ressuspensão em 30 µL de tampão TE (10 mM Tris/HCl, 0,1 mM EDTA, pH 7,5), e quantificado por absorvância a 260 nm utilizando NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

4.9 Extração de DNA mitocondrial

Foram selecionadas cerca de 2.000 moscas provenientes dos cruzamentos apresentados na Tabela 1, fêmeas e machos, entre 3-7 dias após o período de emergência das pupas. As moscas foram aclimatadas a 25°C por pelo menos 48 h e então inseridas em tubo Falcon, que foi posteriormente mergulhado em nitrogênio líquido por 10 s e vortexado por 1 min. Esse procedimento foi repetido mais duas vezes a fim de desarticular a cabeça do restante do corpo das moscas. Na sequência, as cabeças das drosófilas foram separadas com o auxílio de uma peneira e, então, tanto as cabeças quanto as “carcaças” (tórax mais abdômen), foram maceradas separadamente por 3-6 vezes em 15 mL de tampão de homogeneização (225 mM manitol, 75 mM sacarose, 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mg/mL BSA, pH 7,4), utilizando o homogeneizador *Douncer* no gelo. Para moscas *elav>Twinkle*, as cabeças foram utilizadas, já para animais *mhc>Twinkle*, o tórax mais abdômen foram os alvos, enquanto que a prole proveniente de cruzamentos controle entre fêmeas *Twinkle* e machos *w¹¹¹⁸*, tanto cabeças quanto carcaças foram aproveitadas.

O homogenato foi centrifugado a 800 g_{max} por 5 min a 4°C, limpo em filtro descartável de 40 µm (Falcon®), seguido por nova centrifugação a 12.000 g_{max} por 5 min. O pellet enriquecido com mitocôndrias foi ressuspensão em 1 mL de tampão de homogeneização e sobreposto em gradiente de densidade, 1 M e 1,5 M de sacarose,

seguido por ultracentrifugação a 50.000 g_{max} por 1 h a 4°C. A fase intermediária contendo as mitocôndrias foi recuperada, diluída em tampão de homogeneização e centrifugada a 12.000 g_{max} por 5 min a 4°C. Após, foi adicionado ao pellet ressuspenso em 1 mL de tampão de homogeneização, 10 μ L de proteínase K (10 mg/ml), seguido por 10 min de incubação no gelo. A centrifugação anterior foi repetida, mas a 17.000 g_{max} , e o pellet foi então ressuspenso em 1 mL de tampão de lise (20 mM HEPES, 75 mM NaCl, 10 mM EDTA, SDS 1%), adicionado de 20 μ L de proteínase K (10 mg/ml) e seguido por incubação em gelo por mais 20 min. Em temperatura ambiente, foi acrescentado às amostras 1 mL de fenol, seguido por inversão dos tubos por 5 min e centrifugação a 16.000 g_{max} por 5 min. A fase superior da solução foi resgatada e o procedimento anterior foi repetido mais uma vez, seguido por adição de 1 mL de clorofórmio, nova inversão dos tubos e recentrifugação. Após, adicionou-se 1 mL de isopropanol e 20 μ L de 5M NaCl à fase superior resgatada, seguido por precipitação *overnight* a -20°C. O DNA foi centrifugado a 12.000 g_{max} por 30 min a 4°C e lavado com 1 mL de etanol 70% gelado. Após secagem das amostras a temperatura ambiente por 8-10 h, os ácidos nucleicos mitocondriais foram dissolvidos em 50 μ L de 20 mM HEPES (pH 7,4) e quantificados por absorbância a 260 nm utilizando NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

4.10 Quantificação do nível de DNAm_t via PCR quantitativo em tempo real

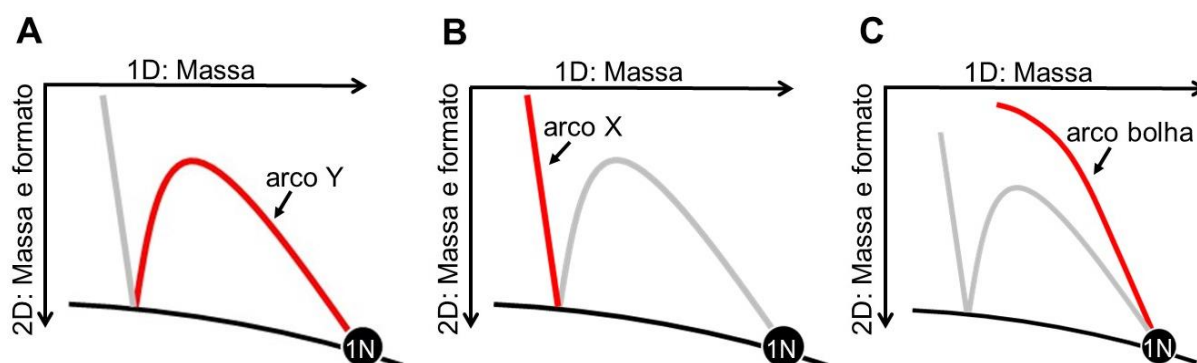
O fato do número de cópias do DNA nuclear ser relativamente constante dentro da célula permite que este seja utilizado como referência para a quantificação relativa do número de cópias de DNAm_t em linhagens Twinkle. Para tanto, foram amplificadas uma região do DNAm_t (gene *16S rRNA*, primers 5'-TCGTCCAACCATTCATTCCA-3' e 5'-TGGCCGCAGTATTTTGAAG-3') e uma região do DNA nuclear (gene *RpL32*, primers 5'-AGGCCCAAGATCGTGAAAGAA-3' e 5'-TGTGCACCAGGAAGTTCTTGAA-3'), conforme descrito anteriormente (RODRIGUES et al., 2018). As reações foram realizadas utilizando o kit SYBR Green JumpStart™ Taq ReadyMix™ (Sigma-Aldrich) para o sistema de PCR quantitativo em tempo real StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Life Technologies). A reação foi feita em 20 μ L, contendo 10 μ M de cada primer, 10 μ L SYBR Green mix e 15 ng de DNA total da cabeça ou tórax. As condições do programa para amplificação foram: 95°C por 2 min, 40 ciclos de 95°C por 3 s e 60°C por 30 s, seguido da curva de

dissociação (*melting curve*). A quantidade de DNAm_t relativa entre as amostras foi calculada usando o método do $\Delta\Delta C_t$.

4.11 Eletroforese bidimensional em gel de agarose neutro (2D-NAGE)

A fim de compreender os processos replicativos do DNAm_t, amostras superexpressando Twinkle WT ou mutante K388A, na musculatura ou no sistema nervoso, foram submetidas à técnica de 2D-NAGE, bem como os controles provenientes de cruzamentos com a linhagem *w¹¹¹⁸*. Esse robusto método pode ser empregado na determinação de origens da replicação, análises da progressão ou pausas da forquilha replicativa e para a observação da ocorrência de eventos relacionados ao reparo recombinacional (VILLWOCK; APARICIO, 2014). A técnica baseia-se na separação dos fragmentos de DNA em géis de primeira (1D) e segunda dimensão (2D), sendo que na eletroforese 1D, os fragmentos de DNA são discriminados segundo sua massa, enquanto no gel 2D a massa e o formato dos fragmentos são considerados (Figura 9) (REYES et al., 2009).

Figura 9 – Esquema evidenciando os principais arcos obtidos pela técnica de 2D-NAGE. A resolução dos intermediários da replicação ou recombinação (IRs) do DNAm_t ocorre no sentido das setas, primeiramente, considerando a massa dos fragmentos (1D) e, depois, segundo a massa e formato das moléculas (2D), originando os arcos Y, X e bolha. (A) O arco Y aparece quando uma forquilha de replicação está passando pelo fragmento de DNA em análise. (B) O arco X significa que há estruturas cruciformes naquele fragmento, que podem indicar reparo recombinacional ou o encontro de duas forquilhas replicativas em sentidos opostos. (C) O arco bolha indica que existe uma origem de replicação. 1N representa as moléculas lineares de DNA não replicadas (REYES et al., 2009).



Fonte: Figura elaborada pela aluna.

Para aplicação da técnica de 2D-NAGE, foram digeridos 3 µg e 5 µg de DNAm_t, ou 10 µg de DNAt, provenientes das cabeças ou carcaças das moscas, utilizando as enzimas de restrição *Cla*I, *Eco*RV ou *Hind*III (Thermo Scientific) (Tabela 2). As

amostras foram incubadas por pelo menos 3 h a 37°C, seguido por extração com 1 Vol de fenol:clorofórmio, inversão dos tubos por 5 min e centrifugação a 16.000 g_{max} por 5 min a temperatura ambiente. As enzimas de restrição escolhidas clivaram o DNAm de *Drosophila* em sítios distintos, gerando fragmentos posteriormente separados em gel de agarose 1D (13 x 15 cm) (Tabela 2) em tampão TBE 1X concentrado (UltraPure™, Thermo Fisher). Para as amostras digeridas com *Clal* e *HindIII*, a corrida 1D durou 16 h a 35 V, enquanto as amostras clivadas com *EcoRV*, cujo fragmento de interesse é o DNAm linearizado (19.517 pb), a eletroforese 1D foi feita a 25 V por 24 h.

Tabela 2 – Endonucleases, produtos da digestão e concentração dos géis de agarose utilizados na técnica de 2D-NAGE.

Endonuclease	Fragmentos de DNAm gerados (pb) [#]	(%) Gel de agarose 1D	(%) Gel de agarose 2D
<i>Clal</i>	8.120 5.077* 4.635 1.512	0,40	0,95
<i>EcoRV</i> (single-cutter)	19.517*	0,28	0,58
<i>HindIII</i>	8.842 5.802* 4.865 422	0,35	0,80

[#]Valores aproximados.

*Peso molecular referente ao fragmento de interesse priorizado para o gel de segunda dimensão.

Quando o fragmento de interesse havia migrado aproximadamente 8 cm, o gel era corado por 30 min em tampão TBE 1X (UltraPure™, Thermo Fisher) contendo 1 µg/µL de brometo de etídio (BrEt). Após, as canaletas do gel foram cortadas (10 cm a partir do fragmento 1N, de ~19 kb) e giradas 90° e, em torno das amostras, um novo gel de agarose (20 x 25 cm) contendo 1 µg/mL de BrEt, pré-resfriado a 55°C, foi moldado. Seguindo a concentração de agarose mencionada na Tabela 3, a eletroforese 2D foi realizada *overnight* a 110 V a 4°C em tampão TBE 1X (UltraPure™, Thermo Fisher) contendo 1 µg/µL de BrEt, com sistema para circulação do tampão. Para as amostras clivadas com *EcoRV*, a corrida do gel 2D foi realizada a 55 V por 65

h a temperatura ambiente. Foi utilizada a agarose ultrapura (Thermo Fisher) nos géis 1D e 2D.

4.11.1 Southern blotting e reação de hibridização

Após a separação dos intermediários da replicação por eletroforese 2D, foi feito o Southern blotting a fim de verificar como sequências específicas do DNAm_t de musculatura e neurônios se comportam na presença de Twinkle WT e mutante. Primeiramente, realizamos a depuração dos fragmentos de DNA contidos no gel por meio de duas lavagens de 15 min em solução 0,2 M HCl, seguido por denaturação via duas lavagens de 20 min em 1,5 M NaCl e 0,5 M NaOH. O DNAm_t foi transferido *overnight*, por capilaridade, do gel 2D para uma membrana de nylon (Hybond N+, GE Healthcare). Após, as membranas foram lavadas por 1 min em solução SSC 6X concentrada (solução estoque 20X concentrada: 3 M NaCl, 0,3 M C₆H₅Na₃O₇·2H₂O, pH 7) e aquecidas a 80°C por 2 h.

As membranas foram pré-incubadas por 30 min em tampão Church (0,25 M Na₂HPO₄, SDS 7%, pH 7,2) a 65°C. Posteriormente, foi feita a reação de hibridização das membranas em 20 µL, contendo 25 ng de sonda radiomarcada (Tabela 3) com 2 µL de [α^{32} P]-5'-trifosfato de 2'-desoxicitidina (α^{32} P-dCTP) (PerkinElmer), utilizando 4 µL do kit High Prime DNA Labeling (Sigma-Aldrich). As condições da reação foram: desnaturação dos amplicons dos genes *COIII* e *12S* a 95°C por 10 min, seguido por adição de α^{32} P-dCTP e do mix High Prime DNA aos amplicons no gelo e incubação a 37°C por 20 min, além de purificação utilizando mini Quick Spin Columns (Sigma-Aldrich). As sondas radiomarcadas foram novamente desnaturadas a 95°C e adicionadas às membranas, as quais foram hibridizadas *overnight* a 65°C no *Hybridization oven* (Techne Hybridiser). Após uma lavagem de 5 min e três lavagens de 15 min com SSC 1X concentrado com adição de SDS 1% a 65°C, as membranas foram expostas por 5-7 dias ao fosforimager (Bio-Rad). Posteriormente, como resultado da técnica de 2D-NAGE, foram gerados os arcos característicos apresentando os intermediários da replicação ou recombinação (Figura 9), analisados no software *QuantityOne*.

4.11.2 Síntese das sondas aplicadas à técnica de 2D-NAGE

A fim de analisar regiões do DNAm de *D. melanogaster* mais propensas a apresentar pausas replicativas e deleções (CIESIELSKI et al., 2018), foram utilizadas sondas radioativas que se hibridizam aos genes *COIII* e *12S*. As sondas *COIII* e *12S* foram criadas por PCR usando como molde um fragmento do DNAm de *Drosophila* (Tabela 3). As condições da PCR foram: 94°C por 5 min, 25 ciclos de 94°C por 15 s, 58°C por 15 s, 72°C por 12 s e polimerização a 72°C por 5 min. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (Merk) a 0,8% contendo 1 µg/µL de BrEt, a 120 V por 1 h, em tampão TBE 1X (UltraPure™, Thermo Fisher). Após, os amplicons recém obtidos foram purificados do gel com a utilização do Kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (Cytiva), seguindo as especificações do fabricante. Com a utilização de uma alíquota de 3 µL, uma nova corrida em gel de agarose a 0,6% foi realizada a 100 V por 2 h, e o tamanho dos amplicons *COIII* e *12S* foi inferido pela comparação entre a intensidade das bandas desses com as bandas referentes aos marcadores de peso molecular de 1 Kb plus e 100 pb (Thermo Scientific).

Tabela 3 – Sondas dos genes *COIII* e *12S* usadas para detectar os intermediários da replicação ou recombinação em moscas Twinkle. As sondas foram utilizadas na hibridização das membranas no experimento de eletroforese bidimensional em gel de agarose neutro (2D-NAGE).

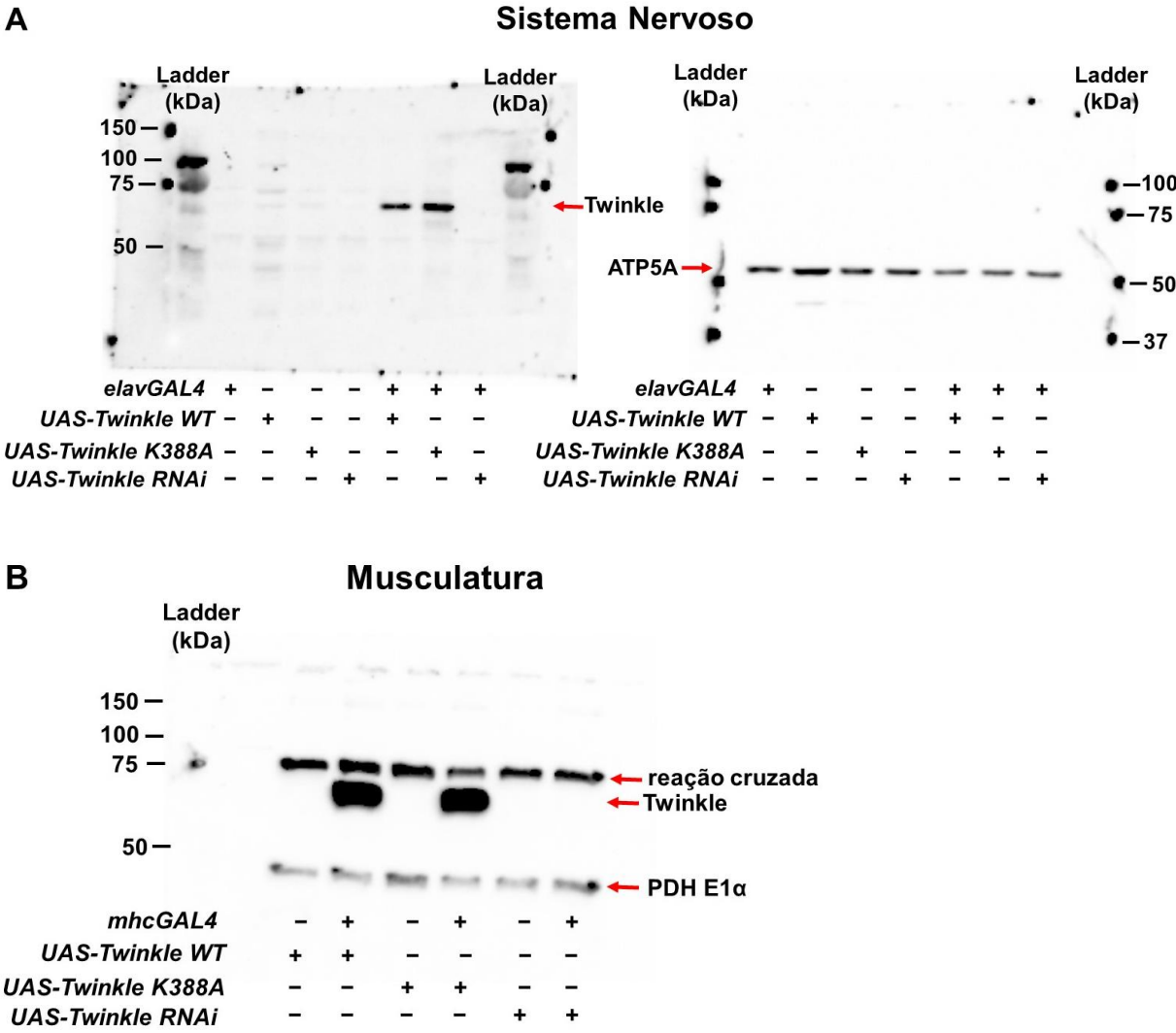
Genes	Primers	Posição (nts)
<i>COIII</i>	5'-TCACCCGCTATTGAATTAGGA-3' 5'-TCATGCAGCTGCTTCAAAC-3'	5.057-5.457
<i>12S</i>	5'-CGACGGGCGATGTGTACATA-3' 5'-CAGCAGTCGCGGTTATACCA-3'	14.196-14.742

5 RESULTADOS

5.1 Disfunções tecido-específica da Twinkle não afetam a viabilidade pupal de *Drosophila*

Para explorar os papéis da Twinkle na manutenção do genoma mitocondrial em tecido nervoso e na musculatura de *Drosophila*, nós utilizamos o sistema *UAS/GAL4* para superexpressar Twinkle tipo selvagem (WT) ou K388A, com o intuito de gerar moscas mutantes do tipo dominante negativo. O western blotting confirmou a superexpressão das enzimas, que foi muito mais elevada na musculatura do que no sistema nervoso (Figura 10), possivelmente devido a diferenças funcionais nos *drivers* utilizados. É importante ressaltar também que não detectamos os níveis endógenos de Twinkle em nenhum dos tecidos (Figura 10), o que é consistente com dados publicados anteriormente utilizando amostras de indivíduos adultos inteiros (RODRIGUES et al., 2018; SANCHEZ-MARTINEZ et al., 2012) e com a ideia de que essa e outras enzimas do replissomo mitocondrial são pouco abundantes em tecidos não-proliferativos.

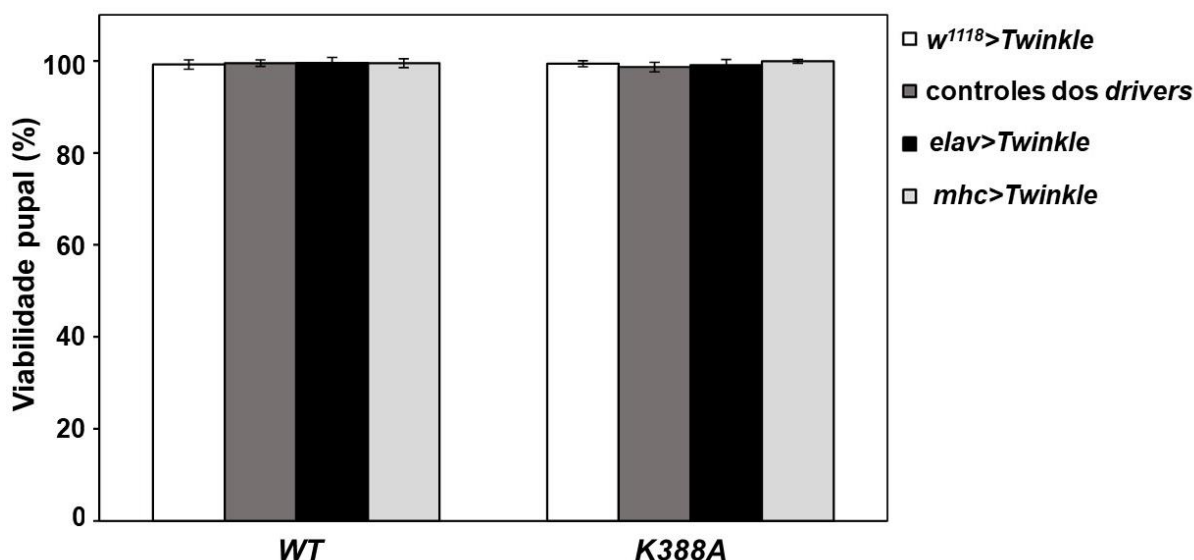
Figura 10 – Detecção da superexpressão tecido-específica de Twinkle em *D. melanogaster*. Para confirmar a expressão de Twinkle WT e do mutante K388A no sistema nervoso (A) e na musculatura (B) foi utilizado o extrato mitocondrial cru de amostras de cabeça e tórax de indivíduos adultos, provenientes de cruzamentos com os *drivers* *elavGAL4*, *mhcGAL4* ou com o controle *w¹¹¹⁸*, conforme descrito em Materiais e Métodos. Os níveis da subunidade alfa do complexo ATP sintase (ATP5A) e da subunidade E1-alfa do complexo piruvato desidrogenase (PDH E1 α) foram utilizados como controles endógenos em (A) e (B), respectivamente. A “reação cruzada” indicada em (B) significa um sinal inespecífico proveniente da atividade do anticorpo anti-Dm helicase (MATSUSHIMA; KAGUNI, 2007a) em extratos mitocondriais obtidos de tórax ou de moscas adultas inteiras (RODRIGUES et al., 2018; SANCHEZ-MARTINEZ et al., 2012). O marcador de peso molecular utilizado (ladder) foi o Precision Plus Protein™ Standards (Bio-Rad).



Nós demonstramos anteriormente que a superexpressão ubíqua de Twinkle K388A em *D. melanogaster* usando o *driver daughterless GAL4* causa letalidade no terceiro estágio larval, enquanto que a superexpressão direcionada aos neurônios ou musculatura não causa nenhuma alteração visível no desenvolvimento e permite os indivíduos chegarem à fase adulta (RODRIGUES et al., 2018). Repetimos os ensaios de desenvolvimento com superexpressão tecido-específica de Twinkle K388A e

conseguimos reproduzir os dados publicados (Figura 11), confirmando que um defeito severo na helicase replicativa mitocondrial em tecidos de alta demanda energética aparentemente não afeta a viabilidade pupal das moscas.

Figura 11 – Viabilidade das pupas com superexpressão tecido-específica de Twinkle WT ou K388A em *D. melanogaster*. A indução da superexpressão de Twinkle WT ou K388A em neurônios de drosófilas foi obtida a partir de cruzamentos entre fêmeas *elavGAL4* com machos *UAS-Twinkle WT/TM6B* ou *UAS-Twinkle K388A* (*elav>Twinkle WT* ou *K388A*). A superexpressão na musculatura foi obtida a partir de cruzamentos entre fêmeas *UAS-Twinkle WT/TM6B* ou *UAS-Twinkle K388A* com machos *mhcGAL4* (*mhc>Twinkle WT* ou *K388A*). Os controles para Twinkle WT e K388A são provenientes de cruzamentos entre fêmeas *UAS-Twinkle WT/TM6B* ou *UAS-Twinkle K388A*, respectivamente, com machos *w¹¹¹⁸* (*background* genético das linhagens). Os controles dos *drivers* consistem na prole dos cruzamentos entre fêmeas *elavGAL4* com machos *w¹¹¹⁸*, ou então fêmeas *w¹¹¹⁸* com machos *mhcGAL4*. A viabilidade pupal foi calculada como a média entre o número de moscas adultas emergentes das pupas pela quantidade total de pupas existentes nos tubos de cultivo, conforme descrito em Materiais e Métodos.



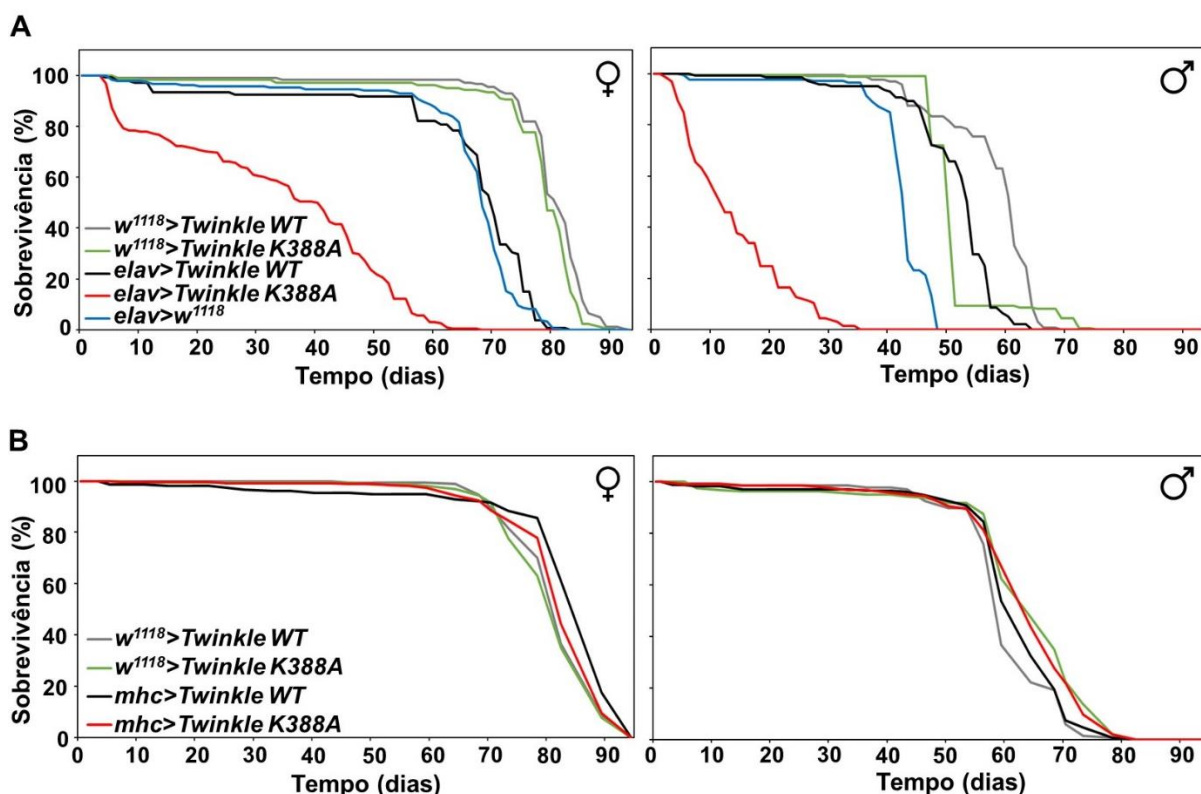
5.2 A expressão de Twinkle mutada em tecido nervoso, mas não em tecido muscular, causam problemas locomotores e redução da longevidade em adultos de *D. melanogaster*

Já que a superexpressão de Twinkle K388A em tecido muscular ou nervoso não afetou a viabilidade no estágio pupal de *Drosophila*, decidimos examinar se a viabilidade de indivíduos adultos poderia ser comprometida, inicialmente através de ensaios de longevidade. Encontramos uma considerável queda na longevidade média e máxima dos animais superexpressando Twinkle K388A em neurônios (*elav>Twinkle K388A*) quando comparados aos controles (Figura 12 A). Essa queda foi mais evidente em machos, cuja longevidade média foi de apenas 12 dias, enquanto que os

controles viveram em média 50-60 dias após a emergência das pupas. Também notamos que a simples presença da construção transgênica *elavGAL4*, independentemente de *UAS-Twinkle*, oferece um custo à longevidade das moscas, já que tanto os indivíduos controle do *driver elavGAL4* quanto os indivíduos *elav>Twinkle WT* viveram na média ~10 dias a menos que os controles sem *elavGAL4* (Figura 12 A). É provável que essa queda de longevidade seja devido ao local de inserção do transgene que codifica o ativador transcricional GAL4, visto que a criação da linhagem *elavGAL4* se deu pela inserção aleatória do transgene *GAL4* na região promotora do gene endógeno *elav* no cromossomo X de *D. melanogaster* (CASAS-TINTÓ; ARNÉS; FERRÚS, 2017; ROBINOW; WHITE, 1991), o que possivelmente interfere com as diversas funções desse gene no sistema nervoso, alterando a longevidade dos indivíduos adultos. Independentemente disso, a gravidade do efeito que *Twinkle K388A* superexpressa em neurônios tem na longevidade dos indivíduos adultos é muito evidente.

Diferentemente do observado com a superexpressão neurônio-específica, a superexpressão do mutante *K388A* na musculatura (*mhc>Twinkle K388A*), bem como de *Twinkle WT* (*mhc>Twinkle WT*), não causou nenhuma alteração na longevidade dos indivíduos adultos (Figura 12 B). As moscas *mhc>Twinkle* apresentaram-se ativas e aparentemente normais durante todo o tempo de vida (dados não apresentados), com uma taxa de sobrevivência alta, semelhante ao que ocorre para a espécie (LINFORD et al., 2013).

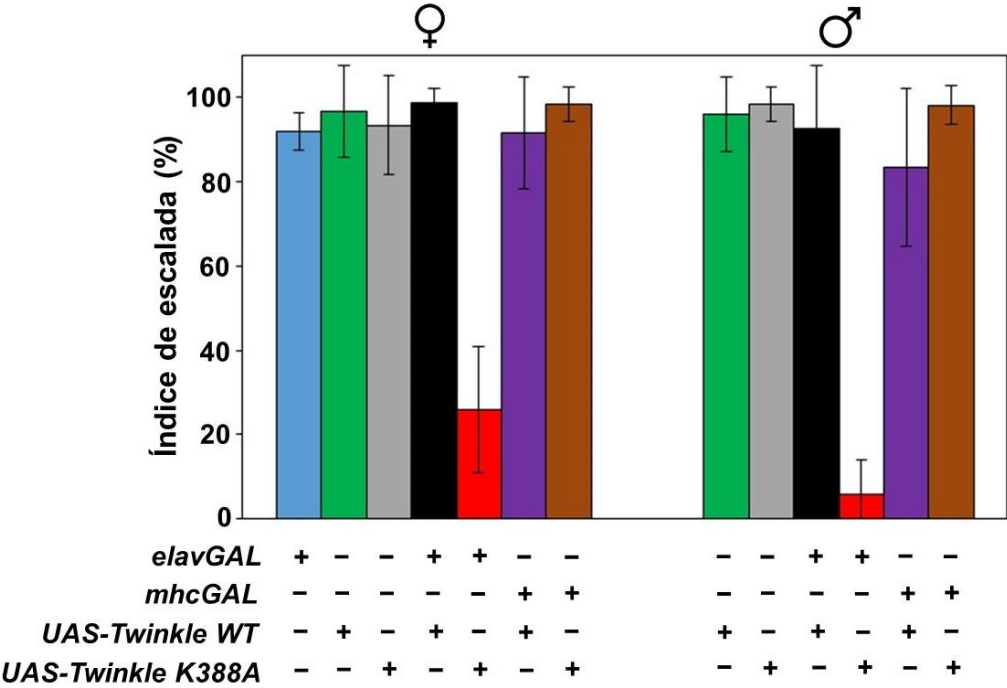
Figura 12 – Longevidade de moscas superexpressando Twinkle WT ou K388A em neurônios ou na musculatura. Fêmeas e machos foram observados desde a emergência das pupas até o final da vida, e o número de indivíduos mortos foram computados a cada 3 dias, quando os tubos de cultivo eram renovados. (A) Moscas *elav>Twinkle WT* ou *K388A* são provenientes de cruzamentos entre fêmeas *elavGAL4* com machos *UAS-Twinkle WT/TM6B* ou *UAS-Twinkle K388A*. (B) Drosófilas *mhc>Twinkle WT* ou *K388A* vêm de cruzamentos entre fêmeas *UAS-Twinkle WT/TM6B* ou *UAS-Twinkle K388A* com machos *mhcGAL4*. Os controles WT e K388A são provenientes de cruzamentos entre fêmeas *UAS-Twinkle WT/TM6B* ou *UAS-Twinkle K388A*, respectivamente, com machos *w¹¹¹⁸* (*background* genético das linhagens). O controle do *driver* consiste no cruzamento entre fêmeas *elavGAL4* com machos *w¹¹¹⁸*.



Para verificar se a queda na longevidade induzida por Twinkle K388A é devido a problemas neurolocomotores, também realizamos testes de escalada para quantificar a habilidade motora de moscas adultas jovens, de 3 dias pós-emergência. A Figura 13 evidencia a incapacidade de indivíduos *elav>Twinkle K388A* escalar a parede do tubo. Alguns desses indivíduos foram afetados a ponto de permanecerem apenas na base do tubo e de não tentarem escalar as paredes, deixando de desempenhar uma habilidade inata à espécie que é a geotaxia negativa, ou então, caíram imediatamente ao tentar realizar esse comportamento (dados não apresentados). O problema é mais acentuado em machos, o que é consistente com o fato da longevidade de indivíduos desse sexo ser mais severamente afetada (Figura 12 A). Por outro lado, a superexpressão de Twinkle K388A em tecido muscular (*mhc>Twinkle K388A*) não resultou em alteração na capacidade locomotora das

moscas, o que vai ao encontro dos dados que indicam ausência de danos fenotípicos observados na viabilidade pupal e na longevidade desses indivíduos (Figuras 11, 12 B). Em combinação, nossos dados, portanto, sugerem a existência de problemas locomotores causados por disfunção da Twinkle em células do tecido nervoso, e não em tecido muscular. Considerando que a musculatura torácica (do voo e das pernas) de adultos de *D. melanogaster* é um dos tecidos mais eficientes no Reino Animal em produção de ATP via OXPHOS (CHATTERJEE; PERRIMON, 2021), a ausência de alterações locomotoras e de longevidade em indivíduos *mhc>Twinkle K388A* é surpreendente.

Figura 13 – Superexpressão de Twinkle K388A em tecido nervoso causa problemas neurolocomotores em moscas adultas de *D. melanogaster*. A atividade locomotora foi mensurada em ensaios de escalada, assim como descrito em Material e Métodos. Moscas *elav>Twinkle WT* ou *K388A* são provenientes de cruzamentos entre fêmeas *elavGAL4* com machos *UAS-Twinkle WT/TM6B* ou *UAS-Twinkle K388A*. Drosófilas *mhc>Twinkle WT* ou *K388A* vêm de cruzamentos entre fêmeas *UAS-Twinkle WT/TM6B* ou *UAS-Twinkle K388A* com machos *mhcGAL4*. Os controles *WT* e *K388A* são provenientes de cruzamentos entre fêmeas *UAS-Twinkle WT/TM6B* ou *UAS-Twinkle K388A*, respectivamente, com machos *w¹¹¹⁸* (background genético das linhagens). O controle do driver consiste no cruzamento entre fêmeas *elavGAL4* com machos *w¹¹¹⁸*.

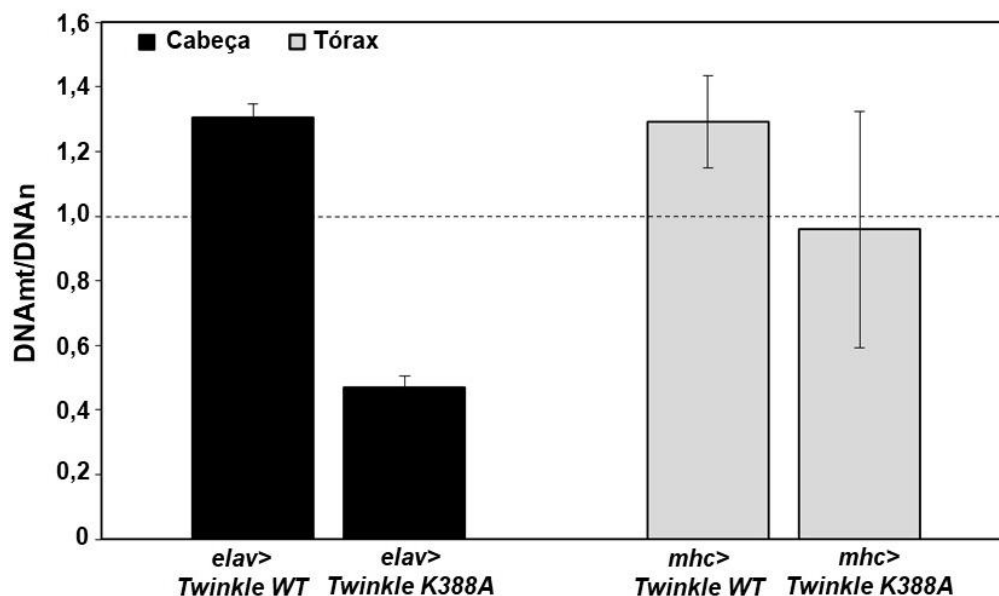


5.3 Disfunções da Twinkle causam depleção severa do DNAm do sistema nervoso central, mas não da musculatura torácica

Considerando que a manutenção de um número de cópias de DNAm adequado é dependente da atuação do replissomo mitocondrial, disfunções na

maquinaria replicativa causadas por mutações na Twinkle podem acarretar danos na quantidade desse genoma por célula/tecido, resultando nos distúrbios neurolomocotores e na redução da longevidade descritos acima. Utilizando indivíduos adultos machos de 7 dias pós-emergência, nós medimos a quantidade de DNAmT relativa ao DNA nuclear em amostras enriquecidas com tecido nervoso (cabeças) e muscular (tórax) e observamos que a superexpressão de Twinkle WT causou um aumento de aproximadamente 30% no número de cópias do DNAmT nos dois tecidos (Figura 14). Tal achado corrobora dados publicados anteriormente para camundongos (IKEDA et al., 2015; TYYNISMAA et al., 2005), bem como adultos e células em cultura de *Drosophila* (MATSUSHIMA; KAGUNI, 2007a; RODRIGUES et al., 2018), indicando que a quantidade de DNAmT parece ser limitada, pelo menos até certo ponto, pela quantidade de Twinkle na célula.

Figura 14 – Quantificação tecido-específica do número relativo de cópias de DNAmT em *D. melanogaster*. A quantidade relativa de DNAmT em amostras enriquecidas com neurônios (cabeça) ou musculatura (tórax) foi calculada a partir dos resultados de PCR quantitativo em tempo real, assim como descrito em Material e Métodos. Os níveis relativos de DNAmT apresentados no gráfico foram normalizados pelos de seus respectivos controles, isto é, *w¹¹¹⁸>Twinkle WT* ou *K388A* de cabeça ou tórax. A linha pontilhada indica o valor da razão esperada caso o número de cópias não fosse alterado pela superexpressão de Twinkle. Os dados representam médias de três repetições biológicas e as barras de erro, o desvio padrão.



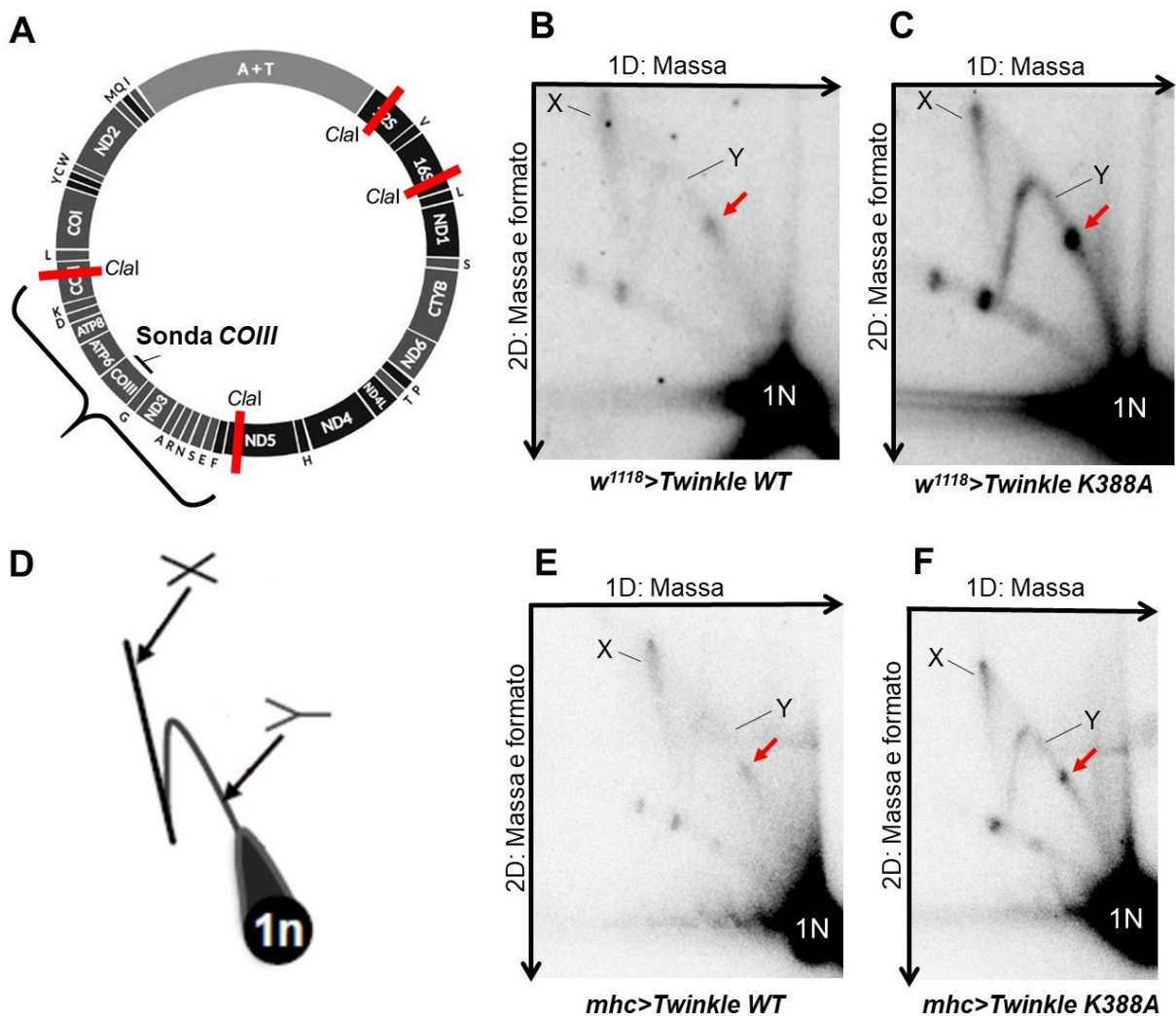
No caso da superexpressão da mutação severa K388A, foram observados resultados distintos para tecido nervoso e muscular. Quando Twinkle K388A foi induzida no sistema nervoso, o número de cópias de DNAmT caiu para menos da

metade do valor obtido em relação ao controle (Figura 14), o que condiz com o fato das moscas adultas *elav>Twinkle K388A* terem apresentado diminuição no tempo de vida, além de limitações locomotoras. Por outro lado, a indução da mutação K388A em células musculares não é capaz de alterar os níveis de DNAmT, ficando a razão entre amostras de indivíduos induzidos e não induzidos muito próxima de 1 (Figura 14). Esse resultado é consistente com a ideia de que Twinkle K388A é neutra em células musculares, apesar de ser expressa em quantidades extremamente altas (Figura 10), o que resulta na falta de defeitos locomotores e de alteração na longevidade de moscas *mhc>Twinkle K388A* descritos acima.

5.4 Disfunções da Twinkle induzem aumento da pausa do replissomo mitocondrial correspondente ao sítio de ligação do DmTTF

Tendo em mente os efeitos tecido-específico da Twinkle manifestados pelo fenótipo ou pelo número de cópias de DNAmT das moscas, fez-se necessário compreender os processos replicativos aqui relatados via eletroforese bidimensional em gel de agarose neutro (2D-NAGE) (FRIEDMAN; BREWER, 1983). Primeiramente, as amostras foram digeridas com a endonuclease *ClaI* (Figura 15 A), cujos produtos gerados teriam o potencial de separar os sítios de ligação do fator de terminação transcricional (DmTTF) no DNAmT (JÖERS et al., 2013). Após o fragmento de interesse de ~5 Kb (Tabela 2) ser submetido aos géis de primeira (1D) e segunda dimensão (2D), seguido por hibridização com a sonda radioativa *COIII* (Figura 15 A), foi possível visualizar em todas as amostras de musculatura a presença de um dos sítios de pausa da replicação (setas em vermelho) que ocorrem naturalmente no DNAmT e estão associados ao local de ligação do DmTTF (Figuras 15 B-F) (CIESIELSKI et al., 2018; JÖERS et al., 2013). O que variou entre as amostras foi a intensidade da pausa no arco Y. Vale ressaltar que esse arco é característico da técnica de 2D-NAGE e indica que uma forquilha de replicação esteja passando passivamente pelo fragmento clivado. Sugere também que o fragmento em análise pode estar entre a origem e o término da replicação (FRIEDMAN; BREWER, 1983).

Figura 15 – Intermediários da replicação (IRs) do DNAm_t de musculatura de *D. melanogaster*. Após digestão com a enzima de restrição *Clal*, as amostras de DNAm_t submetidas à eletroforese de primeira dimensão (1D) tiveram seus fragmentos separados, no sentido da seta, segundo sua massa. Em seguida, os fragmentos passaram por eletroforese de segunda dimensão (2D), na qual a massa e o formato foram os critérios de separação dos fragmentos, gerando os arcos característicos da técnica formados pelos IRs. (A) Enzima de restrição e sonda radioativa utilizada. O parêntese representa o fragmento estudado. (B, C) Controles para Twinkle WT e K388A, provenientes de cruzamentos entre fêmeas *UAS-Twinkle WT/TM6B* ou *UAS-Twinkle K388A*, respectivamente, com machos *w¹¹¹⁸* (*background* genético das linhagens). (D) Esquema dos IRs evidenciando os arcos X, Y e o spot 1N (adaptado de LEWIS et al., 2015). (E, F) Amostras *mhc>Twinkle WT* ou *K388A* vieram de cruzamentos entre fêmeas *UAS-Twinkle WT/TM6B* ou *UAS-Twinkle K388A*, respectivamente, com machos *mhcGAL4*. As setas apontam para o local de pausa da replicação associada ao DmTTF. 1N representa as moléculas lineares de DNA não replicadas. Os valores de intensidade de detecção apresentados no texto foram obtidos pelo software *QuantityOne* e normalizados por 1N.



A Figura 15 B mostra o padrão de intermediários da replicação ou recombinação (IRs) da amostra controle na ausência de superexpressão de Twinkle WT (*w¹¹¹⁸>Twinkle WT*), que corrobora resultados publicados para controles de células S2 de *Drosophila* em cultura e macerados da mosca inteira (CIESIELSKI et al., 2018; JÖERS et al., 2013). Pausas normais associadas aos sítios de ligação do

DmTTF também foram relatadas em dados preliminares obtidos pelo nosso grupo na amostra controle de células de *Drosophila* em cultura (Anexo A). Contudo, ao compararmos os IRs da musculatura entre os controles em que não há superexpressão de Twinkle, ou seja, $w^{1118}>Twinkle$ WT (Figura 15 B) e $w^{1118}>Twinkle$ K388A (Figura 15 C), o sinal gerado pela pausa replicativa no arco Y foi mais evidente na segunda amostra. Especula-se que a construção $w^{1118}>Twinkle$ K388A possa ter uma expressão basal mesmo na ausência de *GAL4* (*promoter leak*), na qual a mutação K388A da Twinkle, mesmo em baixos níveis, possa estar afetando o sítio de pausa da replicação, mas sem afetar negativamente a viabilidade da linhagem. Casos de *promoter leak* já foram relatados para células humanas e de *Drosophila* em cultura (MATSUSHIMA; KAGUNI, 2007a; POHJOISMÄKI; SPELBRINK, 2011).

Em relação à superexpressão de Twinkle WT ($mhc>Twinkle$ WT) (Figura 15 E), nossos resultados diferem ligeiramente daquele observado anteriormente para células S2 de *Drosophila* em cultura, cuja superexpressão da enzima fez desaparecer por completo a pausa replicativa associada ao sítio de ligação do DmTTF (CIESIELSKI et al., 2018). Em outras palavras, embora bastante sutil, ainda parece existir na amostra $mhc>Twinkle$ WT uma pausa no arco Y. Entretanto, a amostra que superexpressa o mutante K388A em miócitos ($mhc>Twinkle$ K388A) (Figura 15 F) em comparação com o controle $mhc>Twinkle$ WT (Figura 15 E), apresenta a pausa associada ao sítio de ligação do DmTTF bem mais evidente (2,5 vezes mais intensa). Semelhantemente ao que foi observado em resultados preliminares obtidos para células S2 de *Drosophila* (Anexo A), os achados de superexpressão de Twinkle WT parecem demonstrar, de certa forma, que há redução no acúmulo dos IRs de pausa, sugerindo que altos níveis de Twinkle WT poderiam facilitar a passagem do replissomo mitocondrial quando existem barreiras físicas no genoma, como aquela imposta por DmTTF. Isso poderia fazer com que a replicação completa do genoma fosse mais rápida, elevando o número de cópias de DNAm, o que está de acordo com os resultados encontrados em miócitos de moscas adultas superexpressando Twinkle WT (Figura 14).

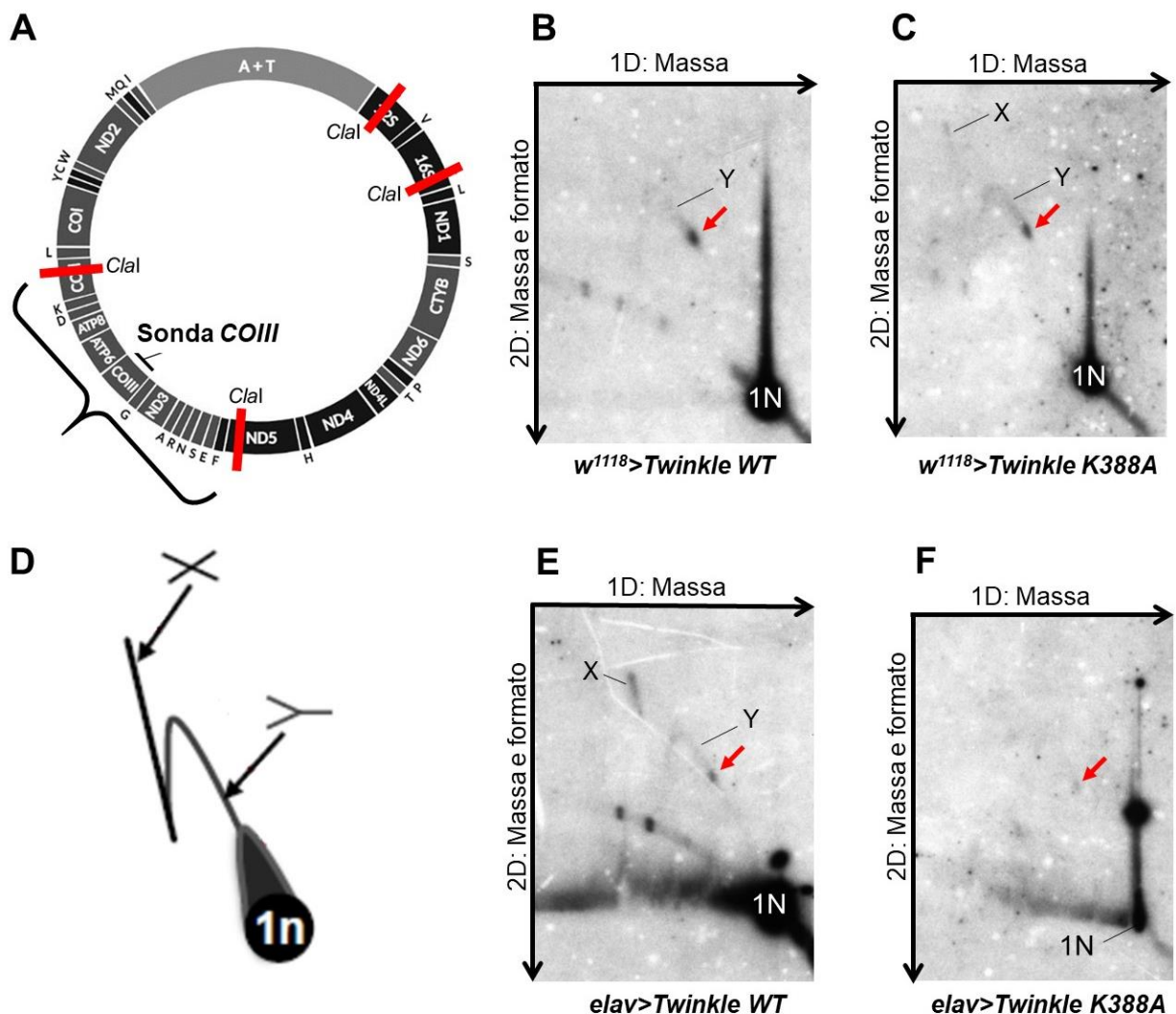
Falando ainda da replicação na musculatura, detectamos um acúmulo de IRs no arco X para todas as amostras (Figuras 15 B-F). Esse arco pode indicar a formação de estruturas cruciformes geradas como consequência da replicação (encontro de duas forquilhas em sentidos opostos), ou de eventos de recombinação e/ou reparo do DNA (REYES et al., 2009). A amostra $w^{1118}>Twinkle$ K388A apresentou aumento de IRs no arco X ~2,5 vezes mais intenso quando comparada ao controle $w^{1118}>Twinkle$

WT, o que é condizente com o aumento de pausa da replicação observada nessa amostra. Em relação à superexpressão de Twinkle K388A em comparação com a superexpressão de Twinkle WT, detectamos um aumento de IRs no arco X ~4,7 vezes mais intenso para o mutante severo da Twinkle.

Em relação aos resultados preliminares de amostras enriquecidas com material genético proveniente da cabeça das moscas, previamente digerido com a enzima de restrição *ClaI* (Figura 16 A), também houve detecção da pausa da replicação no arco Y (setas em vermelho, Figuras 16 B-F), assim como apresentado acima para musculatura (Figura 15). Conforme já mencionado, essa pausa replicativa coincide com um dos dois sítios de ligação do DmTTF – os quais se encontram nas zonas de replicação lenta 1 e 2 do DNAmT (CIESIELSKI et al., 2018; JÖERS et al., 2013). Dentre os IRs das amostras de DNAmT de cabeça, é importante ressaltar a aparente redução na pausa replicativa sob indução da superexpressão de Twinkle WT (Figura 16 E), quando comparada aos controles *w¹¹¹⁸>Twinkle WT* e *w¹¹¹⁸>Twinkle K388A* (Figuras 16 B, C). Assim como ocorreu na musculatura, tal fato está de acordo com o aumento do número de cópias de DNAmT encontrado no sistema nervoso de *Drosophila* (Figura 14), principalmente se considerarmos que maiores níveis de Twinkle WT no tecido tornariam a replicação do genoma mais rápida. Além disso, em comparação com os controles, houve também na amostra *elav>Twinkle WT* um acúmulo mais evidente de IRs no arco X, que também foi relatado antes para células S2 de *Drosophila* em cultura sob superexpressão de Twinkle WT (CIESIELSKI et al., 2018).

De modo geral, os resultados preliminares de 2D-NAGE para amostras de cabeça emitiram um sinal de hibridização fraco, possivelmente devido à dificuldade no processo de obtenção de DNAmT íntegro, em larga escala, proveniente de amostras tão pequenas (~2.000 cabeças por extração de DNAmT em gradiente de sacarose). Contudo, esse fato é ainda mais desafiador para linhagem *elav>Twinkle K388A* (Figura 16 F), a qual apresenta redução do número de cópias de DNAmT (Figura 8), além de danos fenotípicos relacionados à longevidade e à capacidade locomotora (Figuras 12, 13), o que dificulta a coleta de animais viáveis. Com isso, repetições das análises de 2D-NAGE utilizando de 5-10 µg de DNAmT da cabeça (ao invés de 3 µg) deverão ser executadas a fim gerar resultados mais conclusivos e passíveis de mensuração.

Figura 16 – Intermediários da replicação (IRs) do DNAm_t do sistema nervoso de *D. melanogaster*. Após digestão com a enzima de restrição *Clal*, as amostras de DNAm_t submetidas à eletroforese de primeira dimensão (1D) tiveram seus fragmentos separados, no sentido da seta, segundo sua massa. Em seguida, os fragmentos passaram por eletroforese de segunda dimensão (2D), na qual a massa e o formato foram os critérios de separação dos fragmentos, gerando os arcos característicos da técnica formados pelos IRs. (A) Enzima de restrição e sonda radioativa utilizada. O parêntese representa o fragmento estudado. (B, C) Controles para Twinkle WT e K388A, provenientes de cruzamentos entre fêmeas *UAS-Twinkle WT/TM6B* ou *UAS-Twinkle K388A*, respectivamente, com machos *w¹¹¹⁸* (*background* genético das linhagens). (D) Esquema dos IRs evidenciando os arcos X, Y e o spot 1N (adaptado de LEWIS et al., 2015). (E, F) Amostras superexpressando Twinkle WT ou K388A vieram de cruzamentos entre fêmeas *elavGAL4* com machos *UAS-Twinkle WT/TM6B* ou *UAS-Twinkle K388A*, respectivamente. As setas apontam para o local de pausa da replicação associada ao DmTTF. 1N representa as moléculas lineares de DNA não replicadas. O spot 1N encontra-se verticalmente deslocado na amostra (F), o que pode indicar algum artefato da técnica nesse tipo amostral.



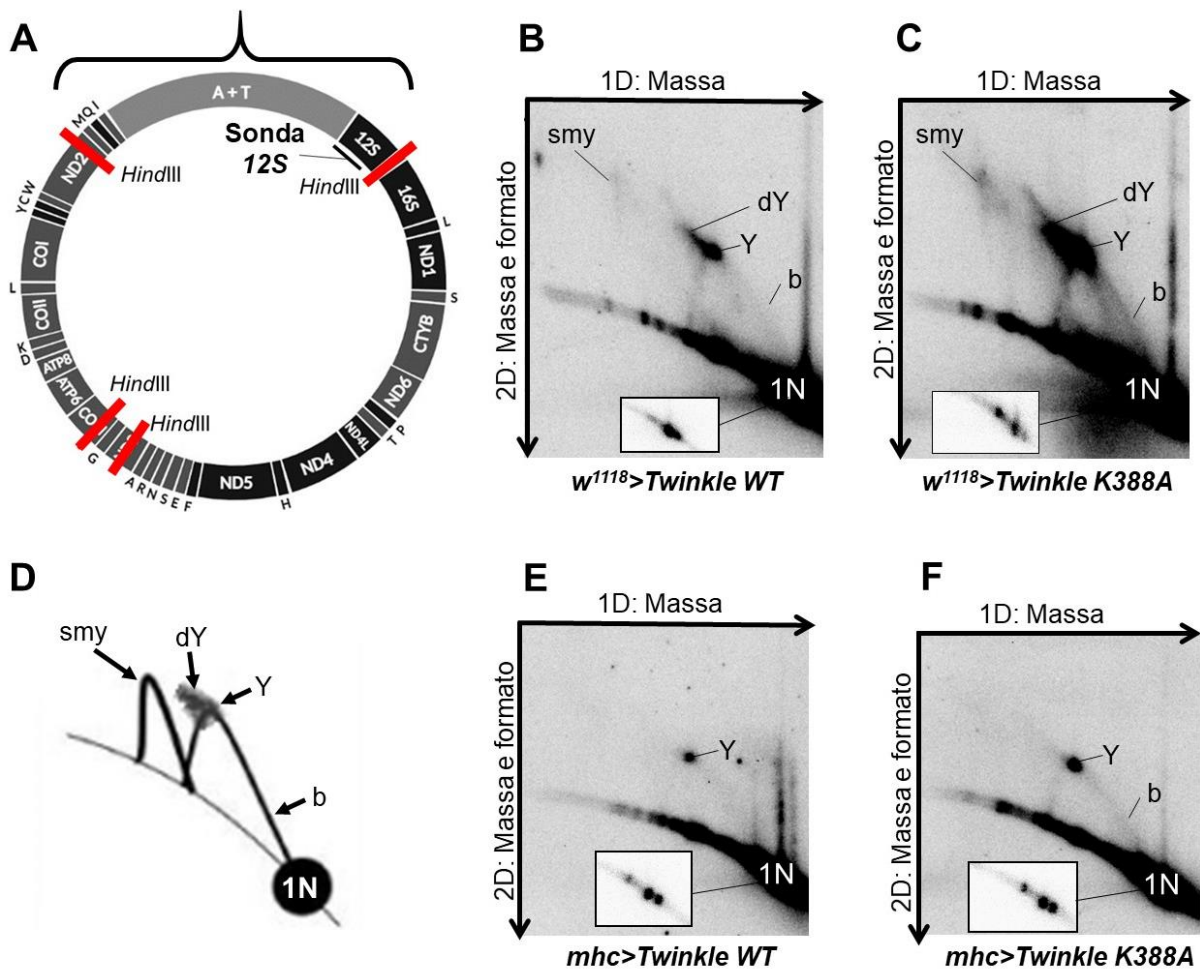
5.5 Alterações na Twinkle evidenciam deleção e formação de arcos Y de movimento lento em DNAm_t de musculatura de *D. melanogaster*

Após digestão com a endonuclease *HindIII* (Figura 17 A), os fragmentos de interesse de ~5.8 Kb (Tabela 2) de amostras enriquecidas com DNAm_t proveniente

da musculatura de *Drosophila* foram submetidos à separação em géis 1D e 2D, seguido por hibridização com a sonda radioativa 12S (Figura 17 A). A utilização da enzima de restrição *HindIII* teria o potencial de gerar um fragmento que contem a região não codificadora A+T (*D-loop* em humanos), onde reside a origem e o término da replicação do DNAm de *D. melanogaster* (JÖERS; JACOBS, 2013; LEWIS et al., 1994). Além disso, conforme demonstrado por CIESIELSKI et al. (2018), essa região do genoma mitocondrial de *Drosophila* é uma forte candidata a sofrer deleção quando na presença de altos níveis de Twinkle WT, principalmente no sítio denominado Rep1, adjacente ao gene 12S.

Para todas as amostras (Figuras 17 B-F), foi possível detectar a presença de um acúmulo (borrão/ponto) de IRs indicado pela letra Y, que também foi relatado para células de *Drosophila* em cultura na ausência e na presença de superexpressão de Twinkle WT (CIESIELSKI et al., 2018). Esse acúmulo indica que a forquilha de replicação passou unidirecionalmente por esses IRs, partindo da região A+T, e encontrou o sítio clivado pela enzima de restrição *HindIII*. O acúmulo Y é bem mais evidente para a amostra *w¹¹¹⁸>Twinkle K388A*, a mesma que sugerimos haver uma expressão basal de Twinkle mutada mesmo na ausência de *GAL4* (ver tópico 5.4). O sinal representado por dY (duplo Y), encontrado nos IRs apenas de amostras controle *w¹¹¹⁸>Twinkle WT* e *w¹¹¹⁸>Twinkle K388A* (Figuras 17 B, C), é gerado quando a forquilha de replicação se aproxima do início ou do final da replicação dentro da região não-codificadora A+T. Novamente, esse sinal foi mais intenso para *w¹¹¹⁸>Twinkle K388A*. Para as amostras controle *w¹¹¹⁸>Twinkle WT* e *w¹¹¹⁸>Twinkle K388A*, bem como para a superexpressão do mutante severo *mhc>Twinkle K388A* (Figura 17 F), detectamos a presença do arco bolha (b). O arco bolha indica que a origem da replicação se encontra no fragmento analisado e que, possivelmente, a forquilha de replicação ainda não prosseguiu para além do sítio clivado por *HindIII* nessas moléculas. Não houve, no entanto, detecção do arco bolha para a amostra superexpressando Twinkle WT (Figura 17 E), mas esse sinal também foi mais fraco (10 vezes menor) em células de *Drosophila* em cultura sob superexpressão de Twinkle WT quando comparadas ao controle (CIESIELSKI et al., 2018).

Figura 17 – Intermediários da replicação (IRs) do DNAm_t de musculatura de *D. melanogaster*. Após digestão com a enzima de restrição *Hind*III, as amostras de DNAm_t submetidas à eletroforese de primeira dimensão (1D) tiveram seus fragmentos separados, no sentido da seta, segundo sua massa. Em seguida, os fragmentos passaram por eletroforese de segunda dimensão (2D), na qual a massa e o formato foram os critérios de separação dos fragmentos, gerando os arcos característicos da técnica formados pelos IRs. (A) Enzima de restrição e sonda radioativa utilizada. O parêntese representa o fragmento estudado. (B, C) Controles para Twinkle WT e K388A, provenientes de cruzamentos entre fêmeas *UAS-Twinkle WT/TM6B* ou *UAS-Twinkle K388A*, respectivamente, com machos *w¹¹¹⁸* (*background* genético das linhagens). (D) Esquema dos IRs evidenciando os arcos Y de movimento lento “smy”, arco bolha “b”, formação duplo-Y “dY”, acúmulo de IRs Y e spot 1N (adaptado de TORREGROSA-MUÑUMER et al., 2015). (E, F) Amostras *mhc>Twinkle WT* ou *K388A* vieram de cruzamentos entre fêmeas *UAS-Twinkle WT/TM6B* ou *UAS-Twinkle K388A*, respectivamente, com machos *mhcGAL4*. As caixas inferiores evidenciam potencial deleção detectada no sinal 1N (moléculas lineares de DNA não replicadas).



Resultados encontrados por CIESIELSKI et al. (2018) demonstraram pontos característicos ao longo do arco Y que podem resultar de deleções geradas na região A+T causadas pelo excesso de Twinkle WT. Embora nós não tenhamos encontrado esse padrão na amostra *mhc>Twinkle K388A*, ainda é possível ter pistas de que esteja ocorrendo deleção principalmente nas amostras que superexpressam Twinkle WT e K388A, devido a presença de três pontos bem evidentes dentro do eixo de DNA não

replicado (imagem ampliada da exposição do ponto 1N, Figura 17), similar ao que foi visto anteriormente (CIESIELSKI et al., 2018). Concordando com a ideia de expressão basal *promotor leak* de Twinkle mutada na linhagem $w^{1118}>Twinkle\ K388A$, observa-se a presença de dois pontos bem nítidos no arco de DNA não replicado (Figura 17 C) em comparação com o ponto único 1N do controle $w^{1118}>Twinkle\ WT$ (Figura 17 B).

Outro fato interessante foi a aparente detecção de arcos Y de movimento lento (smy, do inglês *slow moving Y-like arc*) nas amostras controle $w^{1118}>Twinkle\ WT$ e $w^{1118}>Twinkle\ K388A$ (Figuras 17 B, C). Esses arcos são característicos do mecanismo replicativo descrito para vertebrados denominado RITOLS (REYES et al., 2013), não encontrado em adultos de *D. melanogaster* sob condições normais. Os arcos Y de movimento lento são moléculas híbridas de DNA/RNA, nas quais RNA é incorporado à fita leve do DNAmT à medida que a forquilha de replicação progride unidirecionalmente pelo genoma (REYES et al., 2013). Moléculas híbridas de DNA/RNA também já foram relatadas em células S2 de *Drosophila* em cultura (CIESIELSKI et al., 2018) e em moscas *knockdown* para DmTTF (JÖERS et al., 2013). Não foram encontradas evidências de smy para amostras de DNA provenientes da cabeça das moscas, e apenas o ponto Y e o arco bolha foram detectados nessas amostras (dados não apresentados).

5.6 Padrão de intermediários da replicação do DNAmT não muda na presença de Twinkle K388A em células neuronais

Amostras contendo DNA proveniente da cabeça das moscas foram clivadas com a endonuclease de corte único *EcoRV* (Figura 18 A). No caso, foram utilizados 5 µg de DNAmT para as amostras $w^{1118}>Twinkle\ WT$, $w^{1118}>Twinkle\ K388A$ e $elav>Twinkle\ K388A$ e 10 µg de DNA total (mitocondrial e nuclear) para o controle $elav>Twinkle\ WT$. Utilizamos DNA total para essa última amostra porque o rendimento da extração de DNAmT em gradiente de sacarose geralmente é baixo, ainda mais considerando que a prole $elav>Twinkle\ WT$ é gerada a partir da linhagem parental heterozigota *UAS-Twinkle WT/TM6B* (Tabela 1), ou seja, apenas 50% superexpressa Twinkle. Os genótipos resumidos das moscas geradas do cruzamento entre $elavGAL4$ X *UAS-Twinkle WT/TM6B* são: $elavGAL4$; *UAS-Twinkle WT/3* (indivíduos de interesse) e $elavGAL4$; *TM6B/3* (moscas não utilizadas).

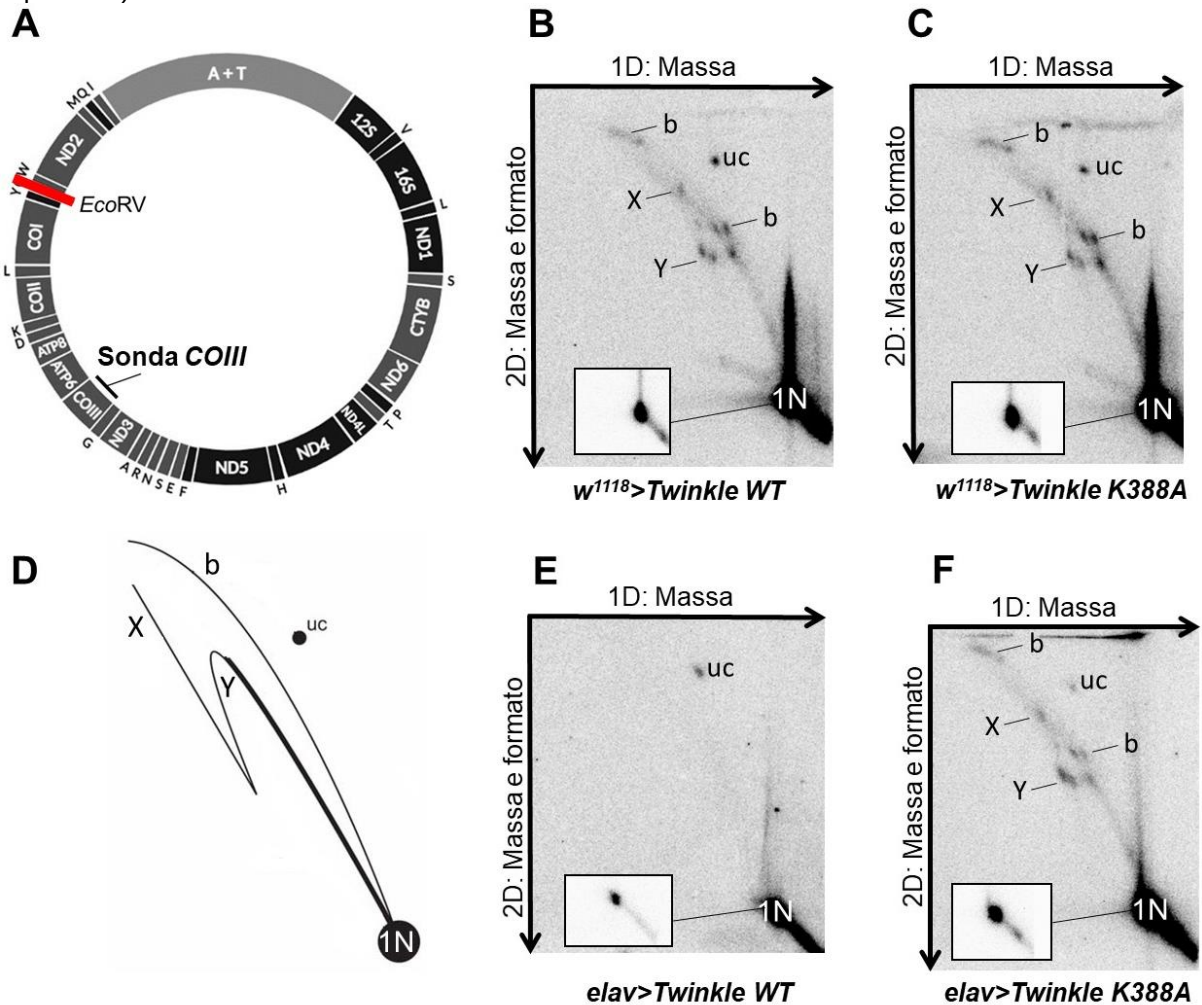
Após linearização do DNAm_t (~19 Kb) de amostras enriquecidas com tecido nervoso de *Drosophila* e separação dessas nos géis 1D e 2D, as amostras foram hibridizadas com a sonda radioativa COIII, que permitiu a detecção dos IRs. Os arcos bolha, X e Y são os principais IRs detectados ao clivar DNAm_t de *Drosophila* em um único sítio (Figura 18 D), e o padrão de migração demonstrado geralmente ocorre em estruturas formadas por DNA dupla-fita em sua totalidade (JÖERS; JACOBS, 2013). Ao compararmos nossos resultados de amostras de cabeça com aqueles publicados anteriormente para macerados de moscas adultas inteiras (contendo cabeça, tórax e abdômen), os padrões de pausas replicativas detectadas são similares às aquelas já descritas (JÖERS; JACOBS, 2013). Isso indica que o modo de replicação atuante no DNAm_t em sistema nervoso de *Drosophila* deve ser o similar ao que opera na musculatura, denominado *strand-coupled* (fita acoplada) *theta* (JÖERS; JACOBS, 2013).

Ao compararmos as amostras controle *w¹¹¹⁸>Twinkle WT* e *w¹¹¹⁸>Twinkle K388A* (Figuras 18 B, C) com a amostra *elav>Twinkle K388A* (Figura 18 F), nota-se um padrão semelhante entre elas de acúmulo de IRs no que corresponderia aos arcos bolha (b), X e Y. Esse fato é inesperado, visto que a linhagem *elav>Twinkle K388A* apresenta grave prejuízo fenotípico e molecular, explicitado pela redução na longevidade, na capacidade motora e também pela queda no número de cópias de DNAm_t (Figuras 12-14). Ou seja, em todas as amostras, detectamos apenas o acúmulo de IRs (pontos/pontos difusos), e não um sinal contínuo ao longo de todo arco ou pausas intensas da replicação como visto preliminarmente para células de *Drosophila* em cultura superexpressando Twinkle mutante em hidrólise de ATP (mutante Y595A) (Anexo A).

O acúmulo de IRs “b”, localizado onde há formação do arco bolha (Figuras 18 B, C, F), mapeia a presença das zonas de replicação lenta 1 e 2, que consistem nos sítios de ligação do DmTTF e correspondem aos locais de pausa da replicação (CIESIELSKI et al., 2018; JÖERS; JACOBS, 2013). Após, localiza-se o acúmulo de IRs no arco X, cuja localização mediana no arco indica que, provavelmente, estruturas cruciformes estejam próximas da extremidade clivada por *EcoRV* (BELL; BYERS, 1983). Subsequentemente, estão quatro pontos no arco Y, que podem corresponder ao acúmulo de IRs nas zonas de replicação lenta 1 e 2, bem como pequenas moléculas quebradas (JÖERS; JACOBS, 2013). A amostra contendo DNA total *elav>Twinkle WT* (Figura 18 E), no entanto, não apresentou os IRs característicos da

técnica, e houve detecção apenas do ponto “uc”, que corresponde às moléculas circulares não digeridas. Resultados utilizando amostras provenientes de musculatura clivadas com *EcoRV* não apresentaram os arcos contendo os IRs (dados não apresentados), portanto necessitam ser repetidos.

Figura 18 – Intermediários da replicação (IRs) do DNAm_t do sistema nervoso de *D. melanogaster*. Após digestão com a enzima de restrição *EcoRV*, as amostras de DNA submetidas à eletroforese de primeira dimensão (1D) tiveram seus fragmentos separados, no sentido da seta, segundo sua massa. Em seguida, os fragmentos passaram por eletroforese de segunda dimensão (2D), na qual a massa e o formato foram os critérios de separação dos fragmentos, gerando os arcos característicos da técnica formados pelos IRs. (A) Enzima de restrição e sonda radioativa utilizada. (B, C) Controles para Twinkle WT e K388A, provenientes de cruzamentos entre fêmeas *UAS-Twinkle WT/TM6B* ou *UAS-Twinkle K388A*, respectivamente, com machos *w¹¹¹⁸* (*background* genético das linhagens). (D) Esquema dos IRs evidenciando os arcos bolha “b”, X, Y e o ponto “uc”, que corresponde ao DNAm_t não digerido (adaptado de JÖERS; JACOBS, 2013). (E, F) Amostras superexpressando Twinkle WT ou K388A vieram de cruzamentos entre fêmeas *elavGAL4* com machos *UAS-Twinkle WT/TM6B* ou *UAS-Twinkle K388A*, respectivamente. Apenas para a amostra *elav>Twinkle WT* foi utilizado DNA total nas análises. As caixas inferiores mostram o sinal detectado no ponto 1N (moléculas lineares de DNA não replicadas).



6 DISCUSSÃO

Embora a atividade da Twinkle na abertura da dupla fita de DNAm durante a replicação seja bem descrita, os resultados apresentados nesta tese indicam uma atuação diferencial da enzima segundo o tipo de tecido em que esta se encontra. Pode-se inferir isso ao verificar que somente em neurônios é que a superexpressão da mutação K388A apresentou efeitos fenotípicos mais acentuados, tais como diminuição na longevidade dos adultos e problemas locomotores (Figuras 12, 13). A ausência de disfunção fenotípica em moscas adultas quando Twinkle K388A é superexpressa na musculatura é inesperada, visto que tanto a atividade de OXPHOS quanto o número de cópias de DNAm são muito elevados na musculatura do voo de *Drosophila* (CHATTERJEE; PERRIMON, 2021). É possível especular, portanto, que a Twinkle na musculatura do nosso modelo esteja desempenhando um papel distinto daquele de helicase ao qual é tradicionalmente relacionada, mesmo que o tecido muscular seja metabolicamente ativo e demande uma replicação do DNAm tão eficiente quanto o sistema nervoso.

Observamos também queda no número de cópias de DNAm associada à Twinkle K388A apenas quando esta é induzida no sistema nervoso das moscas, e nada parece ter ocorrido relacionado a essa mutação na musculatura (Figura 14). A depleção no DNAm quando K388A é superexpressa em neurônios é consistente com o prejuízo visto nos ensaios fenotípicos de longevidade e de escalada (Figuras 12, 13). Além disso, observa-se um aumento relativo do número de cópias de DNAm quando Twinkle WT é superexpressa em neurônios e musculatura, corroborando dados publicados anteriormente para outros modelos experimentais (IKEDA et al., 2015; MATSUSHIMA; KAGUNI, 2007; RODRIGUES et al., 2018; TYYNISMAA et al., 2005).

Recentemente, o repertório de mecanismos de manutenção do DNAm foi expandido para incluir um mecanismo de resgate da forquilha de replicação parada que é baseado na ação de uma primase-polimerase encontrada em humanos, denominada PrimPol (TORREGROSA-MUÑUMER et al., 2017). Forquilhas replicativas paradas podem resultar em quebras de fita dupla, causando depleção ou deleções de DNAm (TORREGROSA-MUÑUMER et al., 2019), que estão ligadas a doenças neuromusculares humanas e ao envelhecimento. PrimPol nesse caso sintetizaria primers de DNA *downstream* à lesão, permitindo assim que a DNA

polimerase mitocondrial (Pol γ) proceda a replicação a partir de uma origem não convencional (TORREGROSA-MUÑUMER et al., 2017, 2019). Esse mecanismo parece contornar problemas de replicação, embora também possa gerar regressão da forquilha ou altos níveis de rearranjos do genoma mitocondrial. No entanto, nossos dados aceitos para publicação (Apêndice A) mostraram que *D. melanogaster* não codifica um homólogo da PrimPol de humanos, o que pode indicar que os mecanismos para lidar com danos replicativos nesse organismo modelo sejam distintos.

HERBERS et al. (2019) mostraram recentemente que os mecanismos de manutenção do DNAm que operam em tecidos de camundongos com alta atividade de OXPHOS diferem daqueles de outros tecidos, de modo que a integridade do DNAm, o número de cópias e a expressão gênica são mantidos ótimos mesmo sob constantes danos promovidos por espécies reativas de oxigênio (ROS). Em tecidos musculares e neuronais, por exemplo, foram observadas junções de Holliday em abundância relacionadas a moléculas de DNAm danificadas, indicando que a recombinação pode ser, de fato, o principal mecanismo para lidar com o estresse oxidativo de modo tecido-específico.

Para entender os efeitos da Twinkle WT e K388A durante o processo replicativo em *D. melanogaster*, nós analisamos os intermediários da replicação ou recombinação (IRs) provenientes de amostras enriquecidas com DNAm da cabeça ou da musculatura de moscas adultas entre 3-7 dias. Foram selecionadas moscas dessa idade, pois é quando se iniciam os fenótipos prejudiciais que afetam a longevidade e a locomoção em indivíduos *elav>Twinkle K388A* (Figuras 12 A, 13). Nossos resultados utilizando DNAm proveniente de cabeça e carcaça demonstraram pausa replicativa no sítio de ligação do fator de terminação transcricional (DmTTF) (Figuras 15, 16). Acredita-se que a barreira física imposta pelo DmTTF à forquilha replicativa possa prevenir a colisão entre as maquinarias de replicação e transcrição do DNAm (JÖERS et al., 2013). Entretanto, ao superexpressar Twinkle WT tanto na musculatura quanto no sistema nervoso, encontramos uma aparente diminuição da pausa causada por DmTTF, o que permitiria que a maquinaria replicativa prosseguisse com menor influência da barreira física imposta por DmTTF. Isso nos faz inferir que a quantidade de Twinkle dentro das células possa ser um fator limitante à replicação e, conseqüentemente, ao número de cópias de DNAm, o que condiz com nossos achados de superexpressão de Twinkle WT em neurônios e musculatura torácica (Figura 14).

Dados relacionados à superação de pausas replicativas sob indução de superexpressão de Twinkle WT já foram descritos anteriormente para células em cultura de *Drosophila* (Anexo A; CIESIELSKI et al., 2018) e em camundongos (POHJOISMÄKI et al., 2013), demonstrando reprodutibilidade no padrão de ação da Twinkle para resolver impasses durante o processo replicativo. Por outro lado, a superexpressão de Twinkle K388A na musculatura causou aumento da pausa na forquilha de replicação quando comparada à superexpressão de Twinkle WT no mesmo tecido. Isso pode ser consequência da ineficiência de helicases defeituosas em desalojar DmTTF do genoma com a chegada da maquinaria replicativa à região, podendo ocasionar pausas e, eventualmente, quebras na simples e/ou dupla fita de DNA.

Além disso, notamos que os IRs em amostras de DNAmT de musculatura que mapeiam a região não-codificadora A+T (*D-loop* em humanos) parecem apresentar deleção (Figura 17). SALMINEN et al. (2017) demonstraram que mudanças quantitativas nos elementos de repetição dentro da região rica em A+T de *Drosophila* poderia afetar o número de cópias de DNAmT e o tempo de desenvolvimento das moscas. Se deleções estão ocorrendo principalmente em amostras de musculatura sob indução de superexpressão de Twinkle WT e K388A, especulamos que a Twinkle tenha um papel importante nesse tecido na resolução de impasses provocados pelo estresse replicativo. Esse fato está de acordo com o maior acúmulo de IRs detectados no arco X para essas amostras (Figura 15), cuja presença pode significar que eventos de reparo recombinacional estejam ocorrendo.

É interessante mencionar que a superexpressão de Twinkle WT em camundongos foi responsável por reduzir o número de mutações no DNAmT e por proteger cardiomiócitos dos danos oxidativos causados pela ausência da enzima antioxidante superóxido dismutase 2 (POHJOISMÄKI et al., 2013), indo ao encontro da ideia de plasticidade funcional da Twinkle. Nesse caso, a Twinkle também estaria relacionada a eventos de reparo do DNA via recombinação homóloga, assim como descrito para ensaios *in vitro* utilizando a forma recombinante da Twinkle humana (SEN et al., 2012; SEN; PATEL; PATEL, 2016). Entretanto, ainda não se sabe se a Twinkle de *Drosophila* também teria tal papel recombinacional, que contemplaria o anelamento de fitas de DNA complementares (*strand-annealing*), a troca de fitas entre duas moléculas de DNA dupla-fita (*strand-exchange*) e a migração das junções de

Holliday (*branch migration*), como encontrado para Twinkle humana recombinante (SEN et al., 2012; SEN; PATEL; PATEL, 2016).

Resultados preliminares de amostras enriquecidas com DNAm_t proveniente do sistema nervoso de *Drosophila*, interessante, não demonstraram diferenças no padrão de IRs quando há superexpressão de Twinkle K388A, em comparação com os controles (Figura 18). Tal fato é inesperado ao considerarmos que a atividade de ATPase da Twinkle parece ser de extrema importância em células neuronais de *Drosophila*, visto que ocorre um efeito maléfico ao fenótipo da mosca e ao número de cópias de DNAm_t quando há superexpressão do mutante K388A. Portanto, futuras investigações utilizando Twinkle WT devem ser feitas a fim de se obter um padrão adicional de comparação entre os IRs nessa linhagem.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados fenotípicos e moleculares apresentados nesta tese indicam uma provável atuação diferencial da helicase replicativa mitocondrial, Twinkle, segundo o tecido em que esta é superexpressa. A mutação K388A da Twinkle na musculatura de *Drosophila* aparentemente não leva a fenótipos deletérios, mas em neurônios causou diminuição da longevidade e disfunção neurolocomotora. Por outro lado, a superexpressão de Twinkle WT resultou no aumento relativo do número de cópias de DNAm_t tanto em neurônios quanto em musculatura. Ao se analisar os intermediários da replicação ou recombinação (IRs) provenientes do DNAm_t de sistema nervoso de *Drosophila*, no entanto, não se observou mudanças aparentes relacionadas ao padrão de acúmulos de IRs, apesar da mutação K388A afetar fortemente a linhagem. Em miócitos sob superexpressão de Twinkle WT e K388A, houve sinais de formação de deleção na região não codificadora A+T, embora tanto o número de cópias de DNAm_t, quanto o fenótipo dessas linhagens não sejam prejudicados. Em relação à pausa replicativa associada ao sítio de ligação do fator de terminação transcricional (DmTTF), encontramos um aparente aumento dessa em musculatura quando há superexpressão de Twinkle K388A, mas que parece ser aliviado quando ocorre superexpressão de Twinkle WT. Encontramos também na musculatura de nossas amostras controle evidências de arcos Y de movimento lento, também presentes no modelo replicativo RITOLS (descrito em vertebrados), que necessitam investigações mais aprofundadas.

Tendo em mente a importância da Twinkle durante a replicação e/ou possível resolução de impasses replicativos, bem como o seu envolvimento com uma série de doenças humanas, mostra-se necessário continuar ampliando as investigações acerca do funcionamento tecido-específico dessa enzima.

REFERÊNCIAS

- ADÁN, C. et al. Mitochondrial transcription factor B2 is essential for metabolic function in *Drosophila melanogaster* development. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 18, p. 12333–12342, 2008.
- ALAM, T. I. et al. Human mitochondrial DNA is packaged with TFAM. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 6, p. 1640–1645, 2003.
- ALENCAR, R. R. et al. Enzymology of mitochondrial DNA repair. In: **The Enzymes**. [s.l: s.n.]. p. 257–287.
- ALLKANJARI, K.; BALDOCK, R. A. Beyond base excision repair: An evolving picture of mitochondrial DNA repair. **Bioscience Reports**, v. 41, n. 10, p. 1–14, 2021.
- AMEUR, A. et al. Ultra-deep sequencing of mouse mitochondrial DNA: Mutational patterns and their origins. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 3, p. 18–21, 2011.
- ANDERSON, S. et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. **Nature**, v. 290, p. 457–465, 1981.
- ARCHIBALD, J. M. Endosymbiosis and eukaryotic cell evolution. **Current Biology**, v. 25, n. 19, p. R911–R921, 2015.
- ARMENTEROS, J. J. A. et al. Detecting sequence signals in targeting peptides using deep learning. **Life Science Alliance**, v. 2, n. 5, p. 1–14, 2019.
- BACMAN, S. R.; WILLIAMS, S. L.; MORAES, C. T. Intra- and inter-molecular recombination of mitochondrial DNA after in vivo induction of multiple double-strand breaks. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 13, p. 4218–4226, 2009.
- BANNWARTH, S. et al. Inactivation of Pif1 helicase causes a mitochondrial myopathy in mice. **Mitochondrion**, v. 30, p. 126–137, 2016.
- BARADARAN, R. et al. Crystal structure of the entire respiratory complex I. **Nature**, v. 494, n. 7438, p. 443–448, 2013.
- BELL, L.; BYERS, B. Separation of branched from linear DNA by gel electrophoresis. **Analytical Biochemistry**, v. 138, n. 2, p. 527–535, 1983.
- BOGENHAGEN, D. F.; ROUSSEAU, D.; BURKE, S. The layered structure of human mitochondrial DNA nucleoids. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 6, p. 3665–3675, 2008.
- BOORE, J. L. Animal mitochondrial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 8, p. 1767–1780, 1999.
- BRAND, A. H.; PERRIMON, N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. **Development**, v. 118, n. 2, p. 401–15, 1993.

BRATIC, A. et al. Complementation between polymerase- and exonuclease-deficient mitochondrial DNA polymerase mutants in genomically engineered flies. **Nature Communications**, v. 6, 2015.

CAMARGO, F. et al. Xenotopic expression of alternative electron transport enzymes in animal mitochondria and their impact in health and disease. **Cell Biology International**, v. 42, p. 664–669, 2018.

CARUTHERS, J. M.; MCKAY, D. B. Helicase structure and mechanism. **Curr Opin Struct Biol**, v. 1, n. 12, p. 123–133, 2002.

CASAS-TINTÓ, S.; ARNÉS, M.; FERRÚS, A. Drosophila enhancer-Gal4 lines show ectopic expression during development. **Royal Society Open Science**, v. 4, n. 3, 2017.

CAVALIER-SMITH, T. Origin of mitochondria by intracellular enslavement of a photosynthetic purple bacterium. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 273, n. 1596, p. 1943–1952, 2006.

CHATTERJEE, N.; PERRIMON, N. What fuels the fly: Energy metabolism in Drosophila and its application to the study of obesity and diabetes. **Science Advances**, v. 7, n. 24, p. 1–14, 2021.

CHECA, J.; ARAN, J. M. Reactive oxygen species: Drivers of physiological and pathological processes. **Journal of Inflammation Research**, v. 13, p. 1057–1073, 2020.

CHEN, P. et al. Mitochondrial genome instability resulting from SUV3 haploinsufficiency leads to tumorigenesis and shortened lifespan. **Oncogene**, v. 32, 2013.

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, 2013.

CHEN, Z.; XU, H. In situ labeling of mitochondrial DNA replication in Drosophila adult ovaries by EdU staining. **Journal of Visualized Experiments**, n. October, p. 1–8, 2016.

CHINNERY, P. F. et al. The epidemiology of pathogenic mitochondrial DNA mutations. **Annals of Neurology**, v. 48, n. 2, p. 188–193, 2000.

CHINNERY, P. F. et al. The epidemiology of pathogenic mitochondrial DNA mutations. **Annals of Neurology**, v. 48, n. 2, p. 188–193, 2001.

CHINNERY, P. F.; HUDSON, G. Mitochondrial genetics. **British Medical Bulletin**, v. 106, n. 1, p. 135–159, 2013.

CIESIELSKI, G. L. et al. Mitochondrial single-stranded DNA-binding proteins stimulate the activity of DNA polymerase γ by organization of the template DNA.

Journal of Biological Chemistry, v. 290, n. 48, p. 28697–28707, 2015.

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, 2018.

CIESIELSKI, G. L. et al. Physical and functional interaction of mitochondrial single-stranded DNA-binding protein and the catalytic subunit of DNA polymerase gamma. **Frontiers in Genetics**, v. 12, n. September, 2021.

CIESIELSKI, G. L.; OLIVEIRA, M. T.; KAGUNI, L. S. **Animal Mitochondrial DNA Replication**. [s.l: s.n.].

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

COGLIATI, S.; ENRIQUEZ, J. A.; SCORRANO, L. Mitochondrial Cristae: Where Beauty Meets Functionality. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 41, n. 3, p. 261–273, 2016.

CONSORTIUM, T. et al. Identification of functional elements and regulatory circuits by *Drosophila* modENCODE. **Science**, v. 330, n. 6012, p. 1787–1797, 2011.

CREVEL, G. et al. *Drosophila* RecQ4 is directly involved in both DNA replication and the response to UV damage in S2 cells. v. 7, n. 11, p. 1–14, 2012.

DE MIRANDA, J. R.; EGGLESTON, P. Larval competition in *Drosophila melanogaster*. I. Estimation of larval growth parameters. **Heredity**, v. 60, n. 2, p. 205–212, 1988.

ELLIOTT, H. R. et al. Pathogenic mitochondrial DNA mutations are common in the general population. **American Journal of Human Genetics**, v. 83, n. 2, p. 254–260, 2008.

ERNSTER, L.; SCHATZ, G. Mitochondria: A historical review. **Journal of Cell Biology**, v. 91, n. 3 II, 1981.

EURO, L. et al. Clustering of Alpers disease mutations and catalytic defects in biochemical variants reveal new features of molecular mechanism of the human mitochondrial replicase, Pol γ . **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 21, p. 9072–9084, 2011.

FALKENBERG, M.; GUSTAFSSON, C. M. Mammalian mitochondrial DNA replication and mechanisms of deletion formation of deletion formation. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 55, n. 6, p. 509–524, 2020.

FALKENBERG, M.; LARSSON, N. G.; GUSTAFSSON, C. M. DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. **Annual Review of Biochemistry**, v. 76, p. 679–699, 2007.

FAN, L. et al. The accessory subunit of mtDNA polymerase shares structural homology with aminoacyl-tRNA synthetases: Implications for a dual role as a primer recognition factor and processivity clamp. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 17, p. 9527–9532, 1999.

FAN, L.; KAGUNI, L. S. Multiple regions of subunit interaction in Drosophila mitochondrial DNA polymerase: Three functional domains in the accessory subunit. **Biochemistry**, v. 40, n. 15, p. 4780–4791, 2001.

FARGE, G. et al. The N-terminal domain of TWINKLE contributes to single-stranded DNA binding and DNA helicase activities. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 2, p. 393–403, 2008.

FARR, C. L.; WANG, Y.; KAGUNI, L. S. Functional interactions of mitochondrial dna polymerase and single- stranded DNA-binding protein. Template-primer DNA binding and initiation and elongation of DNA strand synthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 21, p. 14779–14785, 1999.

FERNANDEZ-AYALA, D. J. M. et al. Expression of the Ciona intestinalis Alternative Oxidase (AOX) in Drosophila Complements Defects in Mitochondrial Oxidative Phosphorylation. **Cell Metabolism**, v. 9, n. 5, p. 449–460, 2009.

FREIRE, P. **Pedagogia da Esperança: Um reencontro com a Pedagogia do Oprimido**. 1a. ed. Rio de Janeiro: Paz e Terra, 1992.

FRIEDMAN, J. R.; NUNNARI, J. Mitochondrial form and function. **Nature**, v. 505, n. 7483, p. 335–343, 2014.

FRIEDMAN, L. K.; BREWER, B. J. Analysis of Replication Intermediates by two-dimensional agarose gel electrophoresis. **Anal. Biochem.**, v. 262, n. 527, p. 613–627, 1983.

FUKUOH, A. et al. Screen for mitochondrial DNA copy number maintenance genes reveals essential role for ATP synthase . **Molecular Systems Biology**, v. 10, n. 6, p. 734, 2014.

FUSTÉ, J. M. et al. Mitochondrial RNA polymerase is needed for activation of the origin of light-strand DNA replication. **Molecular Cell**, v. 37, n. 1, p. 67–78, 2010.

GARESSE, R. Drosophila melanogaster mitochondrial DNA: Gene organization and evolutionary considerations. **Genetics**, v. 118, n. 4, p. 649–663, 1988.

GARREAU-BALANDIER, I. et al. A comprehensive approach to determining BER capacities and their change with aging in Drosophila melanogaster mitochondria by oligonucleotide microarray. **FEBS Letters**, v. 588, n. 9, p. 1673–1679, 2014.

GODDARD, J. M.; WOLSTENHOLME, D. R. Origin and direction of replication in mitochondrial DNA molecules from Drosophila melanogaster. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 75, n. 8, p. 3886–3890, 1978.

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, 2019.

GORMAN, G. S. et al. Mitochondrial diseases. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, p. 1–23, 2016.

GUSTAFSSON, C. M.; FALKENBERG, M.; LARSSON, N. G. Maintenance and expression of mammalian mitochondrial DNA. **Annual Review of Biochemistry**, v. 85, p. 133–160, 2016.

HAGSTRÖM, E. et al. No recombination of mtDNA after heteroplasmy for 50 generations in the mouse maternal germline. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 2, p. 1111–1116, 2014.

HAIT, T. A. et al. The EXPANDER integrated platform for transcriptome analysis. **Journal of Molecular Biology**, v. 431, n. 13, p. 2398–2406, 2019.

HERBERS, E. et al. Tissue specific differences in mitochondrial DNA maintenance and expression. **Mitochondrion**, v. 44, n. December 2017, p. 85–92, 2019.

HOITZING, H.; JOHNSTON, I. G.; JONES, N. S. What is the function of mitochondrial networks? A theoretical assessment of hypotheses and proposal for future research. **BioEssays**, v. 37, n. 6, p. 687–700, 2015.

HOLT, I. J. Survey and summary: The mitochondrial R-loop. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. 11, p. 5480–5489, 2019.

HUDSON, G.; CHINNERY, P. F. Mitochondrial DNA polymerase- γ and human disease. **Human Molecular Genetics**, v. 15, n. SUPPL. 2, p. 244–252, 2006.

IKEDA, M. et al. Overexpression of TFAM or t Twinkle increases mtDNA copy number and facilitates cardioprotection associated with limited mitochondrial oxidative stress. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–19, 2015.

ITSARA, L. S. et al. Oxidative stress is not a major contributor to somatic mitochondrial DNA mutations. **PLoS Genetics**, v. 10, n. 2, 2014.

IYENGAR, B. et al. The accessory subunit of DNA polymerase γ is essential for mitochondrial DNA maintenance and development in Drosophila melanogaster. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 7, p. 4483–4488, 2002.

JEMT, E. et al. The mitochondrial DNA helicase TWINKLE can assemble on a closed circular template and support initiation of DNA synthesis. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 21, p. 9238–9249, 2011.

JODI, N.; SUOMALAINEN, A. Mitochondria: In sickness and in health. **Cell**, v. 6, n. 148, p. 1145–1159, 2012.

JÖERS, P. et al. Mitochondrial transcription terminator family members mTTF and mTerf5 have opposing roles in coordination of mtDNA synthesis. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 9, 2013.

JÖERS, 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, 2013.

KAGUNI, L. S. DNA polymerase γ , the mitochondrial replicase. **Annual Review of Biochemistry**, v. 73, p. 293–320, 2004.

KAGUNI, L. S.; OLIVEIRA, M. T. Structure, function and evolution of the animal mitochondrial replicative DNA helicase. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, v. 51, n. 1, p. 53–64, 2016.

KANG D, KIM SH, H. N. Mitochondrial transcription factor A (TFAM): Roles in maintenance of mtDNA and cellular functions. **Mitochondrion**, v. 7, p. 39–44, 2007.

KANG, D. et al. In vivo determination of replication origins of human mitochondrial DNA by ligation-mediated polymerase chain reaction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 24, p. 15275–15279, 1997.

KASIVISWANATHAN, R.; COLLINS, T. R. L.; COPELAND, W. C. The interface of transcription and DNA replication in the mitochondria. **Biochim Biophys Acta**, v. 9–10, n. 1819, p. 970–978, 2012.

KATO, M. et al. Modular architecture of the bacteriophage T7 primase couples RNA primer synthesis to DNA synthesis. **Molecular Cell**, v. 11, n. 5, p. 1349–1360, 2003.

KOCAK, E. et al. The *Drosophila melanogaster* PIF1 helicase promotes synthesis during double-strand gap repair. v. 213, n. November, p. 835–847, 2019.

KORHONEN, J. A. et al. Reconstitution of a minimal mtDNA replisome in vitro. **EMBO Journal**, v. 23, n. 12, p. 2423–2429, 2004.

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, 2022.

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

LARSSON, N. G. et al. Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. **Nature Genetics**, v. 18, n. 3, p. 231–236, 1998.

LEADER, D. P. et al. FlyAtlas 2: A new version of the *Drosophila melanogaster* expression atlas with RNA-Seq, miRNA-Seq and sex-specific data. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. D1, p. D809–D815, 2018.

LEE, Y. S. et al. Each monomer of the dimeric accessory protein for human mitochondrial DNA polymerase has a distinct role in conferring processivity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 2, p. 1490–1499, 2010.

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, 2000.

LEVENBOOK, L.; WILLIAMS, C. M. Mitochondria in the flight muscles of insects. **Journal of General Physiology**, v. 39, n. 4, p. 497–512, 1956.

LEWIS, D. L. et al. Sequence, organization, and evolution of the A+T region of Drosophila melanogaster mitochondrial DNA. **Molecular Biology and Evolution**, v. 11, n. 3, p. 523–538, 1994.

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, 1995.

LEWIS, S. C. et al. A rolling circle replication mechanism produces multimeric lariats of mitochondrial DNA in Caenorhabditis elegans. **PLoS Genetics**, v. 2, n. 11, p. 1–16, 2015.

LIEBER, T. et al. Mitochondrial fragmentation drives selective removal of deleterious mtDNA in the germline. **Nature**, v. 570, n. 7761, p. 380–384, jun. 2019.

LINFORD, N. J. et al. Measurement of lifespan in Drosophila melanogaster. **Journal of Visualized Experiments**, n. 71, p. 1–9, 2013.

LONGLEY, M. J. et al. The Fidelity of Human DNA Polymerase γ with and without Exonucleolytic Proofreading and the p55 Accessory Subunit. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 42, p. 38555–38562, 2001.

LU, B.; VOGEL, H. Drosophila models of neurodegenerative diseases. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 4, p. 315–342, 2009.

MA, H.; O'FARRELL, P. H. Selections that isolate recombinant mitochondrial genomes in animals. **eLife**, v. 4, n. AUGUST2015, p. 1–16, 2015.

MADABATTULA, S. T. et al. Quantitative analysis of climbing defects in a drosophila model of neurodegenerative disorders. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2015, n. 100, p. 1–9, 2015.

MAIER, D. et al. Mitochondrial single-stranded DNA-binding protein is required for mitochondrial DNA replication and development in Drosophila melanogaster. **Molecular Biology of the Cell**, v. 12, n. 4, p. 821–830, 2001.

MARYGOLD, S. J. et al. The DNA polymerases of Drosophila melanogaster. **Fly**, v. 14, n. 1–4, p. 49–61, 2020.

MATSUSHIMA, Y.; GOTO, Y. I.; KAGUNI, L. S. Mitochondrial Lon protease regulates mitochondrial DNA copy number and transcription by selective degradation of mitochondrial transcription factor A (TFAM). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 43, p. 18410–18415, 2010.

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. 13, n. 282, p. 9436–9444, 2007.

MATSUSHIMA, Y.; KAGUNI, L. S. Functional importance of the conserved N-terminal domain of the mitochondrial replicative DNA helicase. **Biochim Biophys Acta**, v. 1787, n. 5, p. 290–295, 2009.

MCFARLAND, R.; TAYLOR, R. W.; TURNBULL, D. M. A neurological perspective on mitochondrial disease. **The Lancet Neurology**, v. 9, n. 8, p. 829–840, 2010.

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

MILENKOVIC, D. et al. The enigma of the respiratory chain supercomplex. **Cell Metabolism**, v. 25, n. 4, p. 765–776, 2017.

MITCHELL, C. et al. The Drosophila mutagen-sensitivity gene mus109 encodes DmDNA2. **Genes**, v. 13, n. 312, 2022.

MOREL, F. et al. Bleomycin-induced double-strand breaks in mitochondrial DNA of Drosophila cells are repaired. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 637, n. 1–2, p. 111–117, 2008.

MUHA, V. et al. Uracil-containing DNA in Drosophila: Stability, stage-specific accumulation, and developmental involvement. **PLoS Genetics**, v. 8, n. 6, 2012.

NILSEN, H. et al. Uracil-DNA glycosylase (UNG)-deficient mice reveal a primary role of the enzyme during DNA replication. **Molecular Cell**, v. 5, n. 6, p. 1059–1065, 2000.

OLIVEIRA, M. T.; GARESSE, R.; KAGUNI, L. S. Animal models of mitochondrial DNA transactions in disease and ageing. **Experimental Gerontology**, v. 45, n. 7–8, p. 489–502, 2010.

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, 2015.

OLIVEIRA, M. T.; KAGUNI, L. S. Comparative purification strategies for Drosophila and human mitochondrial DNA replication proteins: DNA polymerase gamma and mitochondrial single-stranded DNA-binding protein. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 554, p. 37–58, 2009.

OLIVEIRA, M. T.; KAGUNI, L. S. Reduced stimulation of recombinant DNA polymerase γ and mitochondrial DNA (mtDNA) helicase by variants of mitochondrial single-stranded DNA-binding protein (mtSSB) correlates with defects in mtDNA replication in animal cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 47, p. 40649–40658, 2011.

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, 2020.

OLIVEIRA, M.T. **Roles of the mitochondrial single-stranded DNA-binding protein at the mitochondrial DNA replication fork**. 194 f. Tese (Doutorado em Genética - Michigan State University, Michigan, 2011.

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. 1–25, 2019.

PALMIERI, F.; LEONARDO, C. Mitochondrial metabolite transport. **Essays in Biochemistry**, v. 47, p. 37–52, 2010.

PARK, K. et al. Formation of a DNA loop at the replication fork generated by bacteriophage T7 replication proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 9, p. 5260–5270, 1998.

PASTOR-PAREJA, J. C.; XU, T. Dissecting social cell biology and tumors using *Drosophila* genetics. **Annual Review of Genetics**, v. 47, p. 51–74, 2013.

PATEL, S. S.; HINGORANI, M. M.; NG, W. M. The K318A mutant of bacteriophage T7 DNA primase-helicase protein is deficient in helicase but not primase activity and inhibits primase-helicase protein wild-type activities by heterooligomer formation. **Biochemistry**, v. 33, n. 25, p. 7857–7868, 1994.

PAUMARD, P. The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. **EMBO Journal**, v. 21, n. 3, p. 221–230, 2002.

PAVCO, P. A.; VAN TUYLE, G. C. Purification and general properties of the DNA-binding protein (P16) from rat liver mitochondria. **Journal of Cell Biology**, v. 100, n. 1, p. 258–264, 1985.

PERERA, S. et al. Reappraising the human mitochondrial DNA recombination dogma. **bioRxiv**, p. 1–20, 2018.

PERSSON, Ö. et al. Copy-choice recombination during mitochondrial L-strand synthesis causes DNA deletions. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 2019.

PETER, B. et al. Structural basis for adPEO-causing mutations in the mitochondrial TWINKLE helicase. **Human Molecular Genetics**, v. 28, n. 7, p. 1090–1099, 2019.

PETER, B.; FALKENBERG, M. Twinkle and other human mitochondrial DNA helicases: Structure, function and disease. **genes Review**, v. 11, n. 408, p. 1–21,

2020.

PROKOP, A. **A rough guide to *Drosophila* mating schemes (version 1.2)**. Nevada: University of Nevada, 2015.

POHJOISMÄKI, J. L. O. et al. Overexpression of Twinkle-helicase protects cardiomyocytes from genotoxic stress caused by reactive oxygen species. **PNAS**, v. 110, n. 48, p. 19408–19413, 2013.

POHJOISMÄKI, J. L. O.; SPELBRINK, J. N. Mitochondrion Replication stalling by catalytically impaired Twinkle induces mitochondrial DNA rearrangements in cultured cells. **Mitochondrion**, v. 11, p. 630–634, 2011.

POSSE, V. et al. RNase H1 directs origin-specific initiation of DNA replication in human mitochondria. **PLoS Genetics**, v. 15, n. 1, p. 1–20, 2019.

PROTASONI, M.; ZEVIANI, M. Mitochondrial structure and bioenergetics in normal and disease conditions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 2, p. 1–55, 2021.

RADYUK, S. N. et al. Effects of ectopic expression of *Drosophila* DNA glycosylases dOgg1 and Rps3 in mitochondria. **Free Radic Biol Med**, v. 41, n. 5, p. 757–764, 2006.

RAHMAN, F. A.; QUADRILATERO, J. Mitochondrial network remodeling: an important feature of myogenesis and skeletal muscle regeneration. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 78, n. 10, p. 4653–4675, 2021.

REYES, A. et al. Mitochondrial DNA replication proceeds via a ‘bootlace’ mechanism involving the incorporation of processed transcripts. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 11, p. 5837–5850, 2013.

ROBINOW, S.; WHITE, K. Characterization and spatial distribution of the ELAV protein during *Drosophila melanogaster* development. **Journal of Neurobiology**, v. 22, n. 5, p. 443–461, 1991.

RODRIGUES, A. P. C. et al. Developmental arrest in *Drosophila melanogaster* caused by mitochondrial DNA replication defects cannot be rescued by the alternative oxidase. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018.

RONCHI, D. et al. Mutations in DNA2 link progressive myopathy to mitochondrial DNA instability. p. 293–300, 2013.

RUEDEN, C. T. et al. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. **BMC Bioinformatics**, v. 18, n. 1, p. 1–26, 2017.

RUHANEN, H. et al. Mitochondrial single-stranded DNA binding protein is required for maintenance of mitochondrial DNA and 7S DNA but is not required for mitochondrial nucleoid organisation. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1803, n. 8, p. 931–939, 2010.

SALMINEN, T. S. et al. Mitochondrion Mitochondrial genotype modulates mtDNA copy number and organismal phenotype in *Drosophila*. **Mitochondrion**, v. 34, p. 75–83, 2017.

SANCHEZ-MARTINEZ, A. et al. Modeling pathogenic mutations of human Twinkle in *Drosophila* suggests an apoptosis role in response to mitochondrial defects. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. 1–11, 2012.

SEKELSKY, J. DNA repair in *Drosophila*: Mutagens, models, and missing genes. **Genetics**, v. 205, n. 2, p. 471–490, 2017.

SEN, D. et al. Human mitochondrial DNA helicase Twinkle is both an unwinding and annealing helicase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 18, p. 14545–14556, 2012.

SEN, D.; PATEL, G.; PATEL, S. S. Homologous DNA strand exchange activity of the human mitochondrial DNA helicase Twinkle. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 9, p. 4200–4210, 2016.

SHI, R. et al. Biogenesis of iron–sulfur clusters and their role in DNA metabolism. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, n. September, p. 1–13, 2021.

SHUTT, T. E.; GRAY, M. W. Twinkle, the mitochondrial replicative DNA helicase, is widespread in the eukaryotic radiation and may also be the mitochondrial DNA primase in most eukaryotes. **Journal of Molecular Evolution**, v. 62, n. 5, p. 588–599, 2006.

SILVA-PINHEIRO, P. et al. DNA polymerase gamma mutations that impair holoenzyme stability cause catalytic subunit depletion. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. 9, p. 5230–5248, 2021.

SO, M. et al. Implications of membrane binding by the Fe-S cluster-containing N-terminal domain in the *Drosophila* mitochondrial replicative DNA helicase. **Frontiers in Genetics**, v. 12, n. December, p. 1–16, 2021.

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. 29, n. 1, p. 223–231, 2001.

SPINAZZOLA, A.; ZEVIANI, M. Disorders of nuclear-mitochondrial intergenomic signaling. **Gene**, v. 354, p. 162–168, 2005.

STIBAN, J. et al. The N-terminal domain of the *Drosophila* mitochondrial replicative DNA helicase contains an iron-sulfur cluster and binds DNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 35, p. 24032–24042, 2014.

SUMEGI, K. et al. BGP-15 protects against oxidative stress- or lipopolysaccharide-induced mitochondrial destabilization and reduces mitochondrial production of reactive oxygen species. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, p. 1–19, 2017.

SUOMALAINEN, A. et al. Autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia with multiple deletions of mtDNA: Clinical, biochemical, and molecular genetic features of the 10q-linked disease. **Neurology**, v. 48, n. 5, p. 1244–1253, 1997.

TAKAMATSU, C. et al. Regulation of mitochondrial D-loops by transcription factor A and single-stranded DNA-binding protein. **EMBO Reports**, v. 3, n. 5, p. 451–456, 2002.

TAYLOR, R. W.; TURNBULL, D. M. Mitochondrial DNA mutations in human disease. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, n. 5, p. 389–402, 2005.

TILOKANI, L. et al. Mitochondrial dynamics: Overview of molecular mechanisms. **Essays in Biochemistry**, v. 62, n. 3, p. 341–360, 2018.

TORREGROSA-MUÑUMER, R. et al. Low doses of ultraviolet radiation and oxidative damage induce dramatic accumulation of mitochondrial DNA replication intermediates, fork regression, and replication initiation shift. **Mol Biol Cell**, v. 23, n. 26, p. 4197–4208, 2015.

TORREGROSA-MUÑUMER, R. et al. PrimPol is required for replication reinitiation after mtDNA damage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 43, p. 11398–11403, 2017.

TORREGROSA-MUÑUMER, R. et al. Replication fork rescue in mammalian mitochondria. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–16, 2019.

TOURMENTE, S. et al. Mitochondrial development during Drosophila oogenesis: Distribution , density and in situ RNA hybridizations. **Biol Cell**, v. 68, p. 119–127, 1990.

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

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

TYYNISMAA, H. et al. Mutant mitochondrial helicase Twinkle causes multiple mtDNA deletions and a late-onset mitochondrial disease in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 49, p. 17687–17692, 2005.

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, 2016.

VAN DYCK, E. et al. A single-stranded DNA binding protein required for mitochondrial DNA replication in *S. cerevisiae* is homologous to *E. coli* SSB. **EMBO Journal**, v. 11, n. 9, p. 3421–3430, 1992.

VARTAK, R. S.; SEMWAL, M. K.; BAI, Y. An update on complex I assembly: the assembly of players. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 46, n. 4, p.

323–328, 2014.

VERGARA, R. C. et al. The Energy Homeostasis Principle: Neuronal Energy Regulation Drives Local Network Dynamics Generating Behavior. **Frontiers in Computational Neuroscience**, v. 13, n. July, p. 1–18, 2019.

VILLWOCK, S.K.; APARICIO, O.M. Two-dimensional agarose gel electrophoresis for analysis of DNA replication. In: Smith JF, Burke DJ. **Yeast Genetics: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**. New York: Springer Science + Business Media. 1205: 329-340, 2014.

WANG, Y.; FARR, C. L.; KAGUNI, L. S. Accessory subunit of mitochondrial DNA polymerase from *Drosophila* embryos: Cloning, molecular analysis, and association in the native enzyme. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 21, p. 13640–13646, 1997.

WANG, Y.; KAGUNI, L. S. Baculovirus expression reconstitutes *Drosophila* mitochondrial DNA polymerase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 41, p. 28972–28977, 1999.

WANROOIJ, S. et al. Expression of catalytic mutants of the mtDNA helicase Twinkle and polymerase POLG causes distinct replication stalling phenotypes. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 10, p. 3238–3251, 2007.

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

WERNETTE, C. M.; KAGUNI, L. S. A mitochondrial DNA polymerase from embryos of *Drosophila melanogaster*. Purification, subunit structure, and partial characterization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 31, p. 14764–14770, 1986.

WONG, L. J. C. Diagnostic challenges of mitochondrial DNA disorders. **Mitochondrion**, v. 7, n. 1–2, p. 45–52, 2007.

WU, J. et al. *Drosophila* homologue of the Rothmund-Thomson syndrome gene: Essential function in DNA replication during development. **Dev Biol**, v. 323, n. 1, p. 130–142, 2008.

XU, Y. et al. dRecQ4 is required for DNA synthesis and essential for cell proliferation in *Drosophila*. **PLoS ONE**, v. 4, n. 7, p. 36–43, 2009.

YAKUBOVSKAYA, E. et al. Functional human mitochondrial DNA polymerase γ forms a heterotrimer. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 1, p. 374–382, 2006.

YAMAGUCHI, M.; YOSHIDA, H. *Drosophila* as a model organism. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1076, p. 1–10, 2018.

YAMAMOTO, S. et al. A *Drosophila* genetic resource of mutants to study mechanisms underlying human genetic diseases. **Cell**, v. 159, n. 1, p. 200–214, 2014.

YANG, M. Y. et al. Biased Incorporation of Ribonucleotides on the Mitochondrial L-Strand Accounts for Apparent Strand-Asymmetric DNA Replication. **Cell**, v. 111, n. 4, p. 495–505, nov. 2002.

YASUKAWA, T. et al. Replication of vertebrate mitochondrial DNA entails transient ribonucleotide incorporation throughout the lagging strand. **The EMBO Journal**, v. 25, n. 22, p. 5358–5371, nov. 2006.

YU, Z. et al. The mitochondrial DNA-polymerase promotes elimination of paternal mitochondrial genomes. **Curr Biol.**, v. 27, n. 7, p. 1033–1039, 2017.

ZEVIANI, M.; DI DONATO, S. Mitochondrial disorders. **Brain**, v. 127, n. 10, p. 2153–2172, 2004.

ZHENG, Y. R.; ZHANG, X. N.; CHEN, Z. Mitochondrial transport serves as a mitochondrial quality control strategy in axons: Implications for central nervous system disorders. **CNS Neuroscience and Therapeutics**, v. 25, n. 7, p. 876–886, 2019.

ZHU, B.; LEE, S. J.; RICHARDSON, C. C. Direct role for the RNA polymerase domain of T7 primase in primer delivery. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 20, p. 9099–9104, 2010.

ZIEBARTH, T. D. et al. Dynamic effects of cofactors and DNA on the oligomeric state of human mitochondrial DNA helicase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 19, p. 14639–14647, 2010.

ZIEBARTH, T. D.; FARR, C. L.; KAGUNI, L. S. Modular Architecture of the Hexameric Human Mitochondrial DNA Helicase. **Journal of Molecular Biology**, v. 367, p. 1382–1391, 2007.

APÊNDICE A – Artigo publicado na revista *Bioscience Reports: Mitochondrial DNA maintenance in *Drosophila melanogaster**

Ana P. C. Rodrigues¹, Audrey C. Novaes¹, Grzegorz L. Ciesielski² & Marcos T. Oliveira^{1,*}

¹Departamento de Biotecnologia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, SP, Brazil

²Department of Chemistry, Auburn University at Montgomery, Montgomery, AL, United
States of America

*Corresponding author: Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, Departamento de
Biotecnologia, FCAV/UNESP, Jaboticabal, SP 14884-900, Brazil; telephone: +55 (16) 3209-
7536; e-mail: marcos.t.oliveira@unesp.br

Abstract

All 37 mitochondrial DNA (mtDNA)-encoded genes involved with oxidative phosphorylation and intramitochondrial protein synthesis, and several nuclear-encoded genes involved with mtDNA replication, transcription, repair and recombination are conserved between the fruit fly *Drosophila melanogaster* and mammals. This, in addition to its easy genetic tractability, has made *Drosophila* a useful model for our understanding of animal mtDNA maintenance and human mtDNA diseases. However, there are key differences between the *Drosophila* and mammalian systems that feature the diversity of mtDNA maintenance processes inside animal cells. Here, we review what is known about mtDNA maintenance in *Drosophila*, highlighting areas for which more research is warranted and providing a perspective preliminary *in silico* and *in vivo* analyses of the tissue specificity of mtDNA maintenance processes in this model organism. Our results suggest new roles (or the lack thereof) for well-known maintenance proteins, such as the helicase Twinkle and the accessory subunit of DNA polymerase γ , and for other *Drosophila* gene products that may even aid in shedding light on mtDNA maintenance in other animals. We hope to provide the reader some interesting paths that can be taken to help our community show how *Drosophila* may impact future mtDNA maintenance research.

Keywords: nucleic acid metabolism, DNA replication, DNA repair, fly, mitochondria

Introduction

The mitochondrial DNA (mtDNA) in flies and humans is highly conserved in terms of gene content, as is in the vast majority of animal species, although genomic structure varies substantially (Figure 1). Its 37 genes encode 24 RNA components of the intramitochondrial protein synthesis machinery (22 transfer and 2 ribosomal) and 13 polypeptides of the oxidative phosphorylation (OXPHOS) system. Also conserved across metazoans is the fact that the mtDNA is maternally inherited (with very few exceptions), multicopy, circular and highly compacted, with all its gene content spanning between ~15 and ~20 kb, no intronic and very few and short intergenic regions (except for a major non-coding region containing *cis*-regulatory elements, see below for details) (BOORE, 1999; GUSTAFSSON; FALKENBERG; LARSSON, 2016; MCKINNEY; OLIVEIRA, 2013). This genetic conservation clearly indicates a strong evolutionary pressure in animals to keep this set of 37 genes in a minute genome separate from the nuclear one, inside mitochondria. It is ordered in a way to perhaps optimize genomic transmission and maintenance, gene expression and, thus, mitochondrial function.

In humans, mtDNA mutations and defects in mtDNA maintenance are causes of diseases that occur in 1 in ~5,000 individuals (CHINNERY et al., 2001). The problem is amplified by the fact that the multicopy nature of the mtDNA allows for pathogenic mutations to “hide” in the population in 1 in every ~200 carrier individuals (ELLIOTT et al., 2008). The mixture of wild-type and mutated mtDNA molecules in a single individual is referred to as heteroplasmy, and is an integral part of our understanding of mtDNA diseases, as the proportion of mutated molecules in a cell/tissue type of a person dictates manifestation of disease symptoms (TUPPEN et al., 2010; WONG, 2007). Also essential for our understanding of mtDNA disease and biology are the processes of how mutations arise, which are often due to or associated with mtDNA maintenance defects. To date, a significant number of nuclear-

encoded protein factors have been described in one or multiple processes involved with mtDNA replication, repair and transcription, and more are likely to be described in the future. Some of these function exclusively in mitochondria and are well documented, such as DNA polymerase γ (Pol γ) and the mtDNA helicase Twinkle, but the roles of other factors that are shared between the nuclear and mitochondrial proteomes certainly warrant further investigations.

Because of the conservation described above among animal mtDNA, the use of *Drosophila melanogaster* as a model organism to study mtDNA disease and biology in humans has been quite fruitful, and it still has the potential to provide more impactful findings as new technologies are constantly being developed for the fly (LU; VOGEL, 2009; PASTOR-PAREJA; XU, 2013; UGUR; CHEN; BELLEN, 2016; YAMAMOTO et al., 2014). Significant mechanistic differences in mtDNA maintenance have also been reported and are likely associated with the differences in mitochondrial genomic structure between flies and humans. Here, we review what is known about the mechanisms of mtDNA maintenance in flies, and provide a perspective on their tissue specificity and on the protein factors that should be further investigated in order for the scientific community to make the best use of this model.

mtDNA replication in flies: the best studied maintenance process

DNA maintenance may be generally referred to as the set of DNA metabolic processes that guarantee the integrity and the proper number of copies of a genome. Here, we are considering as mtDNA maintenance processes all pathways involved in mtDNA replication and repair. We are also considering some RNA-related processes, since no dedicated primase has been found for this genome, and mtDNA transcription and transcript processing have a

pivotal role in replication (FUSTÉ et al., 2010; GONZÁLEZ DE CÓZAR et al., 2019; HOLT, 2019; MCKINNEY; OLIVEIRA, 2013; REYES et al., 2013b; WANROOIJ et al., 2008).

Replication of *D. melanogaster* mtDNA is by far the best studied of the maintenance processes. Analysis of replication intermediates using two-dimensional native gel electrophoresis (2D-NAGE) showed in cultured cells and in whole animals at different developmental stages that a major replication mode operates (JÖERS; JACOBS, 2013). Replication initiates and ends in the major non-coding region (Figure 1), also called the A+T-rich region (due to its unusually high deoxyadenylate and deoxythymidylate content – up to 96% (LEWIS et al., 1994)), proceeding unidirectionally, with coupled synthesis of the leading and lagging strands. In addition, it is evident that replication normally pauses at the two sites where the members of the mitochondrial transcription termination factor family mTTF and mTerf5 (encoded by the *mTTF* and *mTerf5* genes, respectively) bind the fly mtDNA (JÖERS et al., 2013). Completion of replication is slow at the A+T-rich region, forming abundant four-way DNA junctions (JÖERS; JACOBS, 2013). Indications for uncoupled leading and lagging strand synthesis have also been reported (GODDARD; WOLSTENHOLME, 1978; JÖERS; JACOBS, 2013), but the prevalence of such a mechanism and the extent of the single-strandedness generated are still up for debate and deserve further investigations. Nevertheless, both the strand-coupled and -uncoupled replication modes appear to be conserved in metazoans, and may be preferentially used in a particular physiological condition or tissue (see below for more discussion). Interestingly, an important replication mode described for vertebrates, the RITOLS (RNA incorporation throughout the lagging strand) (REYES et al., 2013b; YANG et al., 2002; YASUKAWA et al., 2006), has not been detected in flies under normal physiology. Its existence in cultured S2 cells has been evidenced when the helicase Twinkle was overexpressed (CIESIELSKI et al., 2018b), but this still remains to be better characterized. We refer the reader to Ciesielski *et al.* (CIESIELSKI;

OLIVEIRA; KAGUNI, 2016) for a detailed review of the modes of mtDNA replication in animals.

As in mammals, the set of fly factors that function together at the replication fork to copy the mitochondrial genome, the so-called mtDNA replisome, is assumed to be only three. The helicase Twinkle translocates ahead of the fork on one DNA strand in the 5'-3' direction, hydrolyzing nucleotide triphosphates and unwinding the parental double-stranded (ds) mtDNA into single-stranded (ss) DNA. Pol γ can then use this ssDNA as template to faithfully synthesize new mtDNA strands, a role that requires the balanced action of its 5'-3' polymerase and 3'-5' exonuclease enzymatic activities. The last replisome factor is the mitochondrial ssDNA-binding protein (mtSSB), which protects the released ssDNA from nucleolysis by wrapping it around its homotetrameric structure, resembling “the stitches on a baseball”. mtSSB also appears to serve as a hub to coordinate the functions of Twinkle and Pol γ (CIESIELSKI; OLIVEIRA; KAGUNI, 2016; FALKENBERG; GUSTAFSSON, 2020b; MCKINNEY; OLIVEIRA, 2013; OLIVEIRA; KAGUNI, 2011; OLIVEIRA; PONTES; CIESIELSKI, 2020).

Although mtDNA replisome proteins are significantly conserved at the amino acid sequence level and at least some similar modes of replication occur both in mammals and flies as discussed above, there are structural, functional and physiological differences between the mammalian and *Drosophila* mtDNA replisome proteins. This may reflect how differently organized mitochondrial genomes must be replicated *in vivo*. Perhaps, the most striking difference to our knowledge is in the structure and function of Pol γ . The fly enzyme has served as a model for our understanding of the Pol γ structure-function relationship for almost four decades (reviewed in (CIESIELSKI; OLIVEIRA; KAGUNI, 2016; KAGUNI, 2004)) and is likely the best studied polymerase in *Drosophila* (MARYGOLD et al., 2020). In flies, as in most animals, this enzyme has two subunits: the catalytic subunit Pol γ - α (encoded by

the *PolG1* gene, formerly *tamas*), which contains both the polymerase and exonuclease catalytic sites; and the accessory subunit Pol γ - β (encoded by the *PolG2* gene), which enhances enzyme processivity and fidelity (IYENGAR et al., 2002; LONGLEY et al., 2001b; OLIVEIRA; HAUKKA; KAGUNI, 2015; WANG; FARR; KAGUNI, 1997). Vertebrates have interestingly acquired a domain (H133-R182 in the human sequence) at the N-terminus of Pol γ - β (encoded by the *POLG2* gene in humans) that allows the accessory subunit to homodimerize (MATSUSHIMA; KAGUNI, 2007b; OLIVEIRA; HAUKKA; KAGUNI, 2015; YAKUBOVSKAYA et al., 2006). It then makes more contacts with Pol γ - α (encoded by the *POLG* gene in humans) and perhaps grants a more refined regulation of Pol γ activities (LEE et al., 2010). The importance of the dimeric Pol γ - β is such that there have already been several mutations in *POLG* and *POLG2* shown to disturb the Pol γ - β dimer or the interactions between Pol γ - α and the distal Pol γ - β subunit, and cause human diseases (EURO et al., 2011; HUDSON; CHINNERY, 2006; SILVA-PINHEIRO et al., 2021). In addition, *in vitro* the trimeric ($\alpha\beta_2$) human Pol γ can synthesize up to 5-fold more DNA than the dimeric ($\alpha\beta$) fly enzyme in a singly-primed template (CIESIELSKI et al., 2015).

In the context of genome replication by the mtDNA replisome, however, this difference may not be as relevant, as *in vitro* DNA synthesis by the *Drosophila* Pol γ is highly (25- to 30-fold) stimulated by mtSSB (encoded by the *mtSSB* gene in flies, formerly *lopo*). On the other hand, mtSSB (encoded by the *SSBP1* gene in humans) stimulation of human Pol γ reaches only ~6-fold, which makes the fly and human Pol γ -mtSSB systems functionally similar (CIESIELSKI et al., 2015; FARR; WANG; KAGUNI, 1999). The ability to stimulate Pol γ *in vitro* appears to be partially related to the ability of mtSSB to organize the template DNA. DNA species formed by mtSSB binding that characterizes a denser template are more efficiently used by the human Pol γ , whereas *Drosophila* Pol γ is more active when mtSSB binding leads to more fully opened template DNA molecules, as visualized by electron

microscopy (CIESIELSKI et al., 2015). Interestingly, vertebrate mtSSBs, including the human protein, have an extension of loop 2,3 (S51-L59 in the human sequence) which contributes to the opening of the template DNA and to the overall stimulation of DNA synthesis by human Pol γ (CIESIELSKI et al., 2015; OLIVEIRA; KAGUNI, 2011). As in other invertebrates, *Drosophila* mtSSB has a short loop 2,3, and its deletion does not appear to interfere with template DNA conformation and stimulation of the fly Pol γ *in vitro* (CIESIELSKI et al., 2015), although the expression of a mutant mtSSB lacking loop 2,3 causes mtDNA depletion in *Drosophila* S2 cells in culture (OLIVEIRA; KAGUNI, 2011). We speculate that these differences are related to the different organizations of the mitochondrial genomes in humans and *Drosophila*, especially the fact that the fly mtDNA is highly A+T rich (~82%, (LEWIS O L; FARR; KAGUNI, 1995)) and would be a template thermodynamically easier to unwind and replicate.

Another interesting fact about the Pol γ -mtSSB system is that, in humans, *in vitro* physical interactions between these two proteins appear to occur more prominently in the absence of the Pol γ - β dimer (CIESIELSKI et al., 2021). In addition, human Pol γ - α alone *in vitro* is an efficient gap-filling polymerase and in fact can participate in mtDNA repair (28). The α and β subunits of the *Drosophila* Pol γ are relatively unstable individually in solution, unlike the human proteins that can be purified independently and assembled *in vitro* (OLIVEIRA; KAGUNI, 2009; WANG; KAGUNI, 1999). This would argue that the *Drosophila* subunits are more often found complexed forming the holoenzyme inside mitochondria and that interactions between mtSSB and Pol γ - α in the absence of Pol γ - β are less likely. This is consistent with the data on the relative transcript abundance of the Pol γ catalytic and accessory subunits that we present below (see next sections), indicating >5-fold excess of the latter.

In vivo, a remarkable difference between mammalian and *Drosophila* Pol γ functions is related to the enzyme's exonuclease activity. The abolishment of such activity by alanine substitution of a catalytic aspartate in the conserved Exo II motif of Pol γ - α (D257 in mice, D263 in flies) created "mtDNA-mutator" animals. Since the enzyme is no longer able to proofread newly-synthesized DNA, these animals indeed accumulate mtDNA mutations (nucleotide substitutions and deletions) (BRATIC et al., 2015; TRIFUNOVIC et al., 2004). A collection of age-related phenotypes clearly established premature aging as the main feature of the mtDNA-mutator mouse, whereas for the mtDNA-mutator fly, developmental lethality at the late larval or early pupal stages with no apparent changes in mitochondrial respiration rates was the prominent outcome. Two types of mtDNA mutations found in the mutator fly are worth discussing, as they may relate to the biology of *Drosophila* mtDNA. First, the number of accumulated A-to-T transversions (18% of total point mutations) were almost as high as the A-to-G or T-to-C (~25% each) transitions, and curiously no C-to-G transversions were detected (BRATIC et al., 2015). The accumulation of deoxyadenylates and deoxythymidylates in insect mitochondrial genomes is thought to be a product of selection pressure operating on the mtDNA molecules themselves, as A+T-rich molecules would have the advantage of being unwound more easily during mtDNA replication and transcription in organisms with very fast metabolism that require fast DNA metabolic processes (GARESSE, 1988; LEWIS et al., 1994). Such pressure would have to be quite strong for A-to-T substitutions to be detected at levels this high even before development is completed. Alternatively, we speculate that the A+T-richness of insect/*Drosophila* mtDNA may at least in part be explained by biased nucleotide incorporation by Pol γ *in vivo*, which indicates that the selection pressure to keep high A+T-rich mitochondrial genomes may be influencing the enzyme's nucleotide selectivity. Interesting insights into this matter may be provided in the future by two parallel experimental approaches: 1) analyses of the

deoxyribonucleotide pools inside the fly mitochondria and their control by particular gene products; and 2) molecular evolutionary analysis and structural modeling with focus on how the fingers subdomain of Pol γ - α may interact with the polymerase catalytic site in the palm subdomain. This will help us understand how mitochondrial genomes in humans and flies are differently shaped.

The second type of noteworthy mutation in the mtDNA-mutator fly is the accumulation of linear mtDNA molecules with deletions spanning almost the entire A+T-rich region. Although deleted, linear mtDNA is also present in the mtDNA-mutator mouse (AMEUR et al., 2011), these molecules in the mutator fly appear to be the only type of mutation clearly associated with the lethality caused by the lack of Pol γ 's exonucleolytic capacity at the onset of metamorphosis. The point mutations in general are associated only with developmental delay (BRATIC et al., 2015). The extensive tissue rearrangements that occur during metamorphosis are initiated with programmed cell death and histolysis of most larval organs, which allows the biogenesis of the adult organs as the pupal stage progresses. Metabolically, there must be a significant change in mitochondrial function during this period, as the organism transitions from an efficient feeder and biomass accumulator to an efficient flying "athlete". In the former, mitochondria act as the main anabolic hub in the cells, whereas in the latter these organelles (at least in the thoracic flight muscles) are committed to the complete oxidation of fuels for bulk ATP production via OXPHOS. We speculate that these significant changes in metabolism may be accompanied by important alterations in the mtDNA maintenance processes in one or more main *Drosophila* tissues, a feature that may be required in holometabolous insects and dependent on Pol γ 's exonucleolytic activity, but absent in mammals. A tissue-specific role for Pol γ in *D. melanogaster* has already been shown in mtDNA elimination during spermatogenesis, a mechanism that contributes to the uniparental inheritance of this genome, and that is surprisingly independent of the enzyme's

exonucleolytic activity (YU et al., 2017). We discuss more about the possible tissue specificity of mtDNA maintenance processes below.

Twinkle (encoded by the *mtDNA-helicase* gene in *Drosophila*), our last mtDNA replisome factor, is a homohexameric/heptameric ring-shaped helicase, homologue of the bacteriophage T7 bifunctional gp4 (MATSUSHIMA; KAGUNI, 2007b; SPELBRINK et al., 2001). The viral enzyme has a C-terminal domain that is highly conserved with Twinkle sequences from all eukaryotes (SHUTT; GRAY, 2006a), responsible for helicase activity *per se*. Also conserved is the Linker region domain, which is predominantly involved with subunit interactions and the stability of the hexamer/heptamer (MATSUSHIMA; KAGUNI, 2007a). Interestingly, the N-terminal primase domain of gp4 synthesizes RNA primers for Okazaki fragment synthesis at the T7 replication fork (PARK et al., 1998), a function that is not conserved in the human (encoded by the *TWNK* gene, formerly *C10orf2*) or fly Twinkle (FARGE et al., 2008; MATSUSHIMA; KAGUNI, 2007a). It is easier to understand why Twinkle in humans and other vertebrates lack primase activity: this domain has diverged significantly in amino acid sequence (SHUTT; GRAY, 2006a), although structurally we have shown that part of it may still fold into an RNA polymerase-like structure (MATSUSHIMA; KAGUNI, 2007a) that allows for DNA binding (FARGE et al., 2008). However, in *D. melanogaster* and other invertebrates, Twinkle's N-terminal domain has several of the conserved motifs that are functionally important for primase activity in the T7 gp4, including four cysteines that coordinate the binding of a zinc atom in motif I (KATO et al., 2003). Remarkably, these cysteines in the fly enzyme (C68, C71, C102 and C105) are used for interactions with an iron-sulfur (2Fe-2S) cluster (STIBAN et al., 2014). The zinc-binding motif in the T7 gp4 is important to help the primase domain interact with the template DNA strand and deliver the RNA primer to the T7 DNA polymerase (PARK et al., 1998; ZHU; LEE; RICHARDSON, 2010). To date, the only function associated with the homologous 2Fe-

2S cluster-binding motif in *Drosophila* Twinkle is general protein stability *in vitro*, which may reflect as enhanced helicase activity *in vivo* (SO et al., 2021; STIBAN et al., 2014). In S2 cells cultured under standard conditions, expression of Twinkle lacking the 2Fe-2S cluster did not affect cell viability or mtDNA copy number (MATSUSHIMA; KAGUNI, 2009), but it remains possible that this prosthetic group influences Twinkle stability and function only under certain conditions or in specific tissues. Because iron-sulfur clusters are redox active protein cofactors and are present in many nuclear DNA metabolic enzymes (reviewed in (SHI et al., 2021)), mtDNA maintenance in flies may be modulated by the oxidative state inside mitochondria via Twinkle. In fact, it has been shown that increased mitochondrial reactive oxygen species (ROS) produced as a consequence of elevated mitochondrial membrane potential leads to mtDNA depletion in S2 cells (FUKUOH et al., 2014). It is tempting to consider the 2Fe-2S-bearing Twinkle as one of the effectors of such mtDNA phenotype, but this phenomenon warrants further investigation, especially in whole fly tissues.

Recently, we have shown that overexpression of Twinkle in *Drosophila* S2 cells causes mtDNA deletions (CIESIELSKI et al., 2018b), creating a model for the studies of these that are the most frequent type of mutations in human mtDNA (reviewed in (OLIVEIRA; PONTES; CIESIELSKI, 2020)). The deletions occur specifically at the fly's A+T-rich region, which loses several of its internal tandem repeats, remaining apparently functional and sustaining mtDNA replication and transcription for as long as a year (MATSUSHIMA; KAGUNI, 2007b). This is associated with an increase in four-way junction replication intermediates that map at the A+T-rich region and excessive catenation of mtDNA molecules, indicating that an increase in Twinkle levels might disturb replication termination (CIESIELSKI et al., 2018b). Interestingly, expression of the exonuclease-deficient Pol γ - α in the mutator fly also generates deletions of the A+T-rich region (with linear mtDNA molecules (BRATIC et al., 2015)), suggesting that this is an especially sensitive region, prone to

genomic rearrangements. Accordingly, we have shown that the number of tandem repeats in the mtDNA A+T-rich region is quite variable among fly lines originated from different geographic locations, and that in general mtDNA copy number is higher in flies bearing mitochondrial genomes with more A+T tandem repeats (SALMINEN et al., 2017b). More mtDNA also correlated with longer developmental times, which in the wild may impact organismal fitness negatively as faster development can grant individuals an advantage for the limited food resources available during the larval stages (DE MIRANDA; EGGLESTON, 1988a, 1988b, 1988c; SALMINEN et al., 2017b). Therefore, unlike in mammals, for which mtDNA deletions always encompass the coding region (with loss of several protein- and transfer RNA-coding genes; see (OLIVEIRA; PONTES; CIESIELSKI, 2020) for details) with clear negative outcomes for mitochondrial function, the occurrence of deletions in *Drosophila* mtDNA appear to frequently involve the non-coding A+T-rich region and have either positive or negative effects, which still need further investigation.

Beyond the mtDNA replisome, but not really

Overexpression of Twinkle in cultured S2 cells and in flies also increases mtDNA copy number 30-40% (CIESIELSKI et al., 2018b; MATSUSHIMA; KAGUNI, 2007b; RODRIGUES et al., 2018; SANCHEZ-MARTINEZ et al., 2012). In S2 cells, this is associated with a significant drop in replication pause intermediates at the two mTTF/mTerf5 binding sites in the mtDNA (CIESIELSKI et al., 2018b), indicating that these pauses are regulated and prevent excessive mtDNA copy number. Interestingly, overexpression of *Dm*NUBPL (encoded by the *CG3262* gene), the likely 2Fe-2S cluster donor for the *Drosophila* Twinkle, also alleviates the same replication pause sites in the mitochondrial genome (SO et al., 2021). Knockdown of mTTF has a similar effect on the abundance of these replication pause intermediates, except that in this case mtDNA transcription termination is

affected, leading to random replication fork stalling, impaired lagging strand synthesis, and mtDNA depletion, likely due to unregulated collisions between the mtDNA replisome and the transcription machinery (JÖERS et al., 2013). Knockdown of mTerf5 led to the opposite molecular effect, with enriched replication pausing at mTTF/mTerf5 binding sites, but to the same phenotypic effect as mTTF knockdown: extension of the larval stage, with prevention of the start of the metamorphosis stage (although the larvae do reach the critical weight that would allow them to do so) and ultimately death (JÖERS et al., 2013). Interestingly, this is the same developmental arrest phenotype observed for flies that ubiquitously overexpress Twinkle alleles with severe mutations, such as alanine substitution of a catalytic lysine (K388A in flies; K421A in humans) and substitutions associated with human progressive external ophthalmoplegia (W441C and A442P in flies; W474C and A475P in humans) (RODRIGUES et al., 2018; SANCHEZ-MARTINEZ et al., 2012). This phenotype is also observed for flies with ubiquitous knockdown of one of the core components of the mitochondrial transcription machinery, the transcription factor B2 (mtTFB2, encoded by the *mtTFB2* gene in flies, and by the *TFB2M* gene in humans) (ADÁN et al., 2008).

The binding sites for the mTTF/mTerf5 complex in the *Drosophila* mtDNA are also the regions mostly affected by misexpression of RNase H1 (encoded by the *rnh1* gene in flies, and by the *RNASEH1* gene in humans), which is likely the main enzyme that processes mitochondrial transcripts to be used as primers for mtDNA replication (POSSE et al., 2019). RNase H1 overexpression, like Twinkle overexpression and mTTF knockdown, led to decreased replication pausing at the mTTF/mTerf5 binding sites, whereas its knockdown increased pausing similarly to mTerf5 knockdown (GONZÁLEZ DE CÓZAR et al., 2019). In addition to the A+T-rich region, the mTTF/mTerf5 binding sites of the fly mitochondrial genome are clearly important *cis*-regulatory regions, in which several protein factors may function to coordinate replication and transcription, with impact in mtDNA maintenance. And

as for the A+T-rich region, because the mTTF/mTerf5 binding sites are possible regions of constant conflict between the mtDNA replisome and the transcription machinery, it is expected that they are also genomic regions prone to rearrangements. In fact, upon selection for mtDNA recombinants in *Drosophila*, Ma & O'Farrell (MA; O'FARRELL, 2015) observed that the recombinant molecules frequently had crossover sites very close to the mTTF/mTerf5 binding sites.

Although recombination has been better recognized in recent years (PERERA et al., 2018), it is still evident this is not a major mechanism that contributes to inherited mtDNA variability in most animals (HAGSTRÖM et al., 2014; MA; O'FARRELL, 2015). Nevertheless, as part of a “formerly neglected, but now well-recognized” DNA repair system, mtDNA homologous recombination and non-homologous end-joining seem efficient in mammalian cells, especially when this genome is inflicted with double-strand breaks (BACMAN; WILLIAMS; MORAES, 2009; CHEN, 2013). In *Drosophila*, double-strand breaks also enhance the selection for individuals with recombinant mtDNA molecules (MA; O'FARRELL, 2015). At least in cultured S2 cells, this double-strand break recombinational repair mechanism is as rapid and effective as in the nucleus (MOREL et al., 2008). In addition, there is now evidence showing that the deletions observed in the human and fly mtDNAs are caused by a particular type of recombination event called copy-choice recombination (CIESIELSKI et al., 2018b; OLIVEIRA; PONTES; CIESIELSKI, 2020), which can occur with the sole presence of the Pol γ holoenzyme in *in vitro* assays containing a DNA template with direct repeats (PERSSON et al., 2019).

Base excision repair (BER) is the best studied of all “formerly neglected, but now well-recognized” mtDNA repair systems, primarily because of its capacity to eliminate oxidative damage caused by mitochondrial ROS (ALENCAR et al., 2019). To our knowledge, information on mitochondrial BER in flies is extremely poor in the literature, although this

organism has contributed significantly to our understanding of DNA repair in general (SEKELSKY, 2017). The *Drosophila* homologue of 8-oxoguanine DNA glycosylase Ogg1 (encoded by the *Ogg1* gene) appears to contain an N-terminal mitochondrial targeting sequence, but a loss-of-function allele of *Ogg1* did not increase somatic mtDNA mutations in oxidatively stressed flies (ITSARA et al., 2014). In addition, overexpression of a mitochondrially targeted Ogg1 and another DNA glycosylase, Rps3 (encoded by the *Rps3* gene), in S2 cells lowered the levels of 8-oxoguanine in the mtDNA, but it also increased susceptibility to oxidative stress, which is likely the result of accumulation of toxic BER intermediate molecules (RADYUK et al., 2006). Using a biochemical approach, Vernet and coworkers (GARREAU-BALANDIER et al., 2014) surprisingly showed that mitochondrial extracts from whole male individuals lack the capacity to excise 8-oxoguanine paired with deoxycytidylate or deoxyadenylate, which may explain the odd results above with misexpression of Ogg1. *Drosophila* mitochondria were actually quite efficient in removing other products of DNA damage: abasic sites, uracil paired with deoxyguanylate, 1,*N*⁶-ethenoadenine paired with deoxythymidylate, and thymine glycol paired with deoxyadenylate. Given the high A+T richness of the fly mtDNA, it is expected that upon excessive ROS, 1,*N*⁶-ethenoadenine and thymine glycol would be found more abundantly in this genome and constitute a more “urgent problem” to mitochondria than 8-oxoguanine. We speculate that these results reflect the biology of the A+T-rich mitochondrial genomes in insects, and that studying 8-oxoguanine accumulation and excision in *Drosophila* mtDNA as a model for understanding base oxidation and BER in mammalian mitochondria may not be a fruitful research path.

Given the lack of more information on mtDNA repair in flies, we decided to use the data provided by Allkanjari & Baldock (ALLKANJARI; BALDOCK, 2021) on the enriched DNA repair proteins found in the human mitochondrial proteome to generate a list of

Drosophila homologues and possibly a rough overview for what mtDNA repair looks like in this organism. It is important to stress that this approach does not provide evidence whatsoever that the gene products of the fly homologues we found are also located in mitochondria, but we believe this may help guide future research. Supplementary Table 1 shows that *Drosophila* lacks approximately a third of all mtDNA repair genes found in humans, consistent with a recent review on the lack of several nuclear DNA repair genes (SEKELSKY, 2017). Interestingly, some of these genes are conserved in organisms as diverse as bacteria and plants, indicating that flies and other holometabolous insects have lost them. One example is *UNG*, which in humans encodes a mitochondrial and a nuclear version of uracil-DNA glycosylase, responsible for eliminating uracil from DNA molecules that may arise from cytosine deamination (NILSEN et al., 2000). The lack of a *UNG* homologue and the absence of dUTPase (encoded by the *dUTPase* gene in flies, and the *DUT* gene in humans) expression in *Drosophila* larvae has been linked to the accumulation of uracil in the nuclear genomic DNA, which appears to be part of normal developmental physiology (MUHA et al., 2012). Considering that uracil-DNA glycosylase activity has been shown in protein extracts from adult fly mitochondria and nuclei (GARREAU-BALANDIER et al., 2014), additional factor(s) with this enzymatic activity must be present in this organism. Nevertheless, it is not yet clear whether fly mtDNA also accumulates uracil. We speculate it very likely does and that there may not be a strong pressure for the removal of this type of DNA “damage”, since replication of a template containing deoxyuridylate would allow incorporation of a deoxyadenylate in the newly-synthesized mtDNA strand, promoting higher A+T content. It is clear, though, that mtDNA repair in *Drosophila* is still an area wide open for new discoveries.

What can omics data reveal about the tissue-specificity of *Drosophila* mtDNA maintenance?

Maintenance of the mitochondrial genome, especially the processes of replication and transcription, is often depicted in the literature very statically. This is best exemplified by how the mtDNA replisome is portrayed, as “the” machinery responsible for copying this genome. Twinkle, Pol γ and mtSSB are indeed evolutionary (except for mtSSB) and functional equivalents of the helicase, polymerase and single-stranded DNA-binding protein of the well-known bacteriophage T7 replisome (SHUTT; GRAY, 2006b), but significantly less has been revealed to date about the physical and mechanistic interactions among the mtDNA replisome components. The static acceptance of the mtDNA replisome contrasts the fact that diverse maintenance mechanisms have constantly been described in the literature in the last two decades (reviewed in (CIESIELSKI; OLIVEIRA; KAGUNI, 2016)), some of which appear to preferentially occur in a tissue-specific manner. For example in the mouse, Goffart and coworkers have recently shown that the mtDNA maintenance mechanisms operating in tissues with high OXPHOS activity are distinct from those in other tissues, so that mtDNA integrity, copy number, and gene expression are kept optimal even upon the constant insults promoted by ROS (HERBERS et al., 2019). In muscular and neuronal tissues, increased levels of damaged mtDNA molecules have been observed along with abundant four-way DNA junctions, indicating that recombination may be the main maintenance mechanism in these tissues. Interestingly in *Drosophila*, we have shown that mtDNA copy number in whole adult flies is negatively correlated with levels of mitochondrial oxygen consumption and OXPHOS supercomplexes (SALMINEN et al., 2017b), the latter being considered a mechanism to improve electron transfer efficiency and lower ROS production (MILENKOVIC et al., 2017). Conversely, as mentioned above, mtDNA copy number drops in *Drosophila* S2 cells with elevated mitochondrial membrane potential and ROS (FUKUOH et al., 2014). Once again,

ROS may play a fundamental role in determining how mtDNA is maintained in flies, as well as in mammals.

Although it is yet to be shown how copy number is potentially regulated by mitochondrial ROS in flies, the general variability in mtDNA maintenance mechanisms in animal tissues invokes that: 1) other unknown factors may also play important roles, likely with tissue specificity; and/or 2) the mtDNA replisome components may have additional activities. The primase-polymerase PrimPol (encoded by the *PRIMPOL* gene in humans) is a good example of a recently identified new player: it functions in a mechanism that rescues stalled replication forks (TORREGROSA-MUÑUMER et al., 2017), which if not resolved, can result in double-strand breaks and cause mtDNA depletion or deletions (TORREGROSA-MUÑUMER et al., 2019). Curiously, the *D. melanogaster* genome does not encode a PrimPol homologue ((MARYGOLD et al., 2020) and Supplementary Table 1), indicating that the bypass of mtDNA replication problems in this model organism is accomplished through distinct mechanism(s). Additional roles for the mtDNA replisome factors is exemplified by the more recently identified strand-annealing, strand-exchange and branch migration activities of the human Twinkle *in vitro*, which indicates it also participates in recombinational repair (SEN et al., 2012; SEN; PATEL; PATEL, 2016). These new catalytic activities are yet to be shown for the *Drosophila* enzyme, which as discussed above, is quite distinct from its human homologue due to the presence of a 2Fe-2S cluster.

Here, we decided to take advantage of the abundant tissue-specific transcriptomic data publicly available for *Drosophila* and seek expression patterns that may indicate distinct mtDNA maintenance mechanisms. We believe this may be of particular relevance since large-scale RNAi screening in *Drosophila* S2 cells for mtDNA copy number regulators, in addition to confirming the roles of known factors (see Supplementary Table 2), appears to have primarily revealed processes that are secondary to nucleic acid metabolism, such as

cytoplasmic protein synthesis and degradation, vesicle trafficking, and maintenance of mitochondrial membrane potential (FUKUOH et al., 2014). Interestingly, this study failed to identify the mitochondrial Lon protease (encoded by the *Lon* gene) as a factor involved with another secondary effect on mtDNA copy number: the degradation of TFAM (encoded by the *TFAM* gene), which is likely the most important protein for mtDNA compaction and is also involved with transcription (MATSUSHIMA; GOTO; KAGUNI, 2010). Nonetheless, we realize that analyses of transcript levels like the ones we are presenting here can hardly be used to express protein levels or enzyme function, and do not necessarily reflect maintenance mechanisms. Therefore, our data should be seen more as a hypothesis-generating approach, that we place as perspective and hope can guide future research in this area. We included in these analyses only data from factors whose roles in fly mitochondria are better known, or for which there is strong evidence that its homologue functions in human/mammalian mitochondria. These include 21 proteins involved with replication, transcription, DNA/RNA processing, DNA packaging, and only a few of the repair proteins listed in Supplementary Table 1 (see Supplementary Table 2 for complete list). We also realize that our analyses may be skewed because transcript levels from genes in our list whose products also localize to the nucleus, such as *Fen1*, *DNA2*, *rnh1* and the topoisomerases, may be mostly influenced by their nuclear function, but we still hope to observe patterns worth being pursued experimentally in the future.

We collected transcript data from 40 distinct fly tissues from different developmental stages and sex, deposited in the databank of the FlyAtlas 2 project (www.flyatlas2.org, (KRAUSE et al., 2022; LEADER et al., 2018)), and first performed a hierarchical cluster analysis to reveal coexpression patterns. Figure 2 shows that our mtDNA maintenance genes form two groups: group 1 is represented by *PolrMT*, which encodes the mitochondrial RNA polymerase, and by other mitochondrial transcription-related factors; group 2 contains *PolG1*,

mtDNA-helicase and mostly other replication factors. Genes in group 1 are characterized in general by higher expression in the adult (males and females) hindgut, midgut, brain and thoracicoabdominal ganglion, and in the adult male heart. Group 2 genes are typically expressed at relatively low levels, except in larval brain, trachea and carcass (which is mostly muscle tissue), and in the salivary gland of larvae and adult females. The heart and the ovaries of adult females present strong expression of almost all genes, regardless of group, whereas the larval hindgut, midgut, fat body and Malpighian tubule, the adult male testis and accessory gland, and the adult (males and females) head had low transcript levels of almost all genes (Figure 2). The differences in expression pattern between groups 1 and 2 are not explained by correlations with the expression of selected OXPHOS and other mitochondrial proteins, as groups 1 and 2 cluster to form a mitochondrial nucleic acid metabolism group (Supplementary Figure 1).

Perhaps the most striking finding in our data is the separation of *PolG2* (placed in group 1 with mostly transcription-related factors) from the other mtDNA replisome genes (group 2). This is also very apparent in a principal component analysis (PCA) of the tissue-specific transcript data (Supplementary Figure 2). When *PolG2* transcripts were analyzed in pairwise comparisons with *PolG1*, *mtDNA-helicase* and *mtSSB* transcript levels, no significant correlations were found (Figure 3A). *PolG2* transcript levels in fact correlated significantly with those of mitochondrial RNA metabolism genes, such as *PolrMT*, *mTTF* and *Suv3* (Figure 3C). This pattern of expression is also observed in the tissue-specific transcriptomic data from the modENCODE project (<http://www.modencode.org/>, (CONSORTIUM et al., 2011)), which is deposited in FlyBase (Supplementary Figure 3), strongly suggesting a true biological meaning. Fan & Kaguni (FAN; KAGUNI, 2001) have shown that the fly Pol γ - β can bind an RNA primer with intra-strand base pairing, even if this molecule is not assembled in a primer-template structure that allows initiation of DNA

synthesis. Pol γ - β is in fact a metazoan evolutionary novelty (OLIVEIRA; HAUKKA; KAGUNI, 2015), with sequence and structural similarities to class IIa aminoacyl-tRNA synthetases (FAN et al., 1999), so binding to RNA is not necessarily surprising. However, its lack of correlational expression pattern with other mtDNA replisome factors and its correlations with factors related to mitochondrial transcription and transcript stability/degradation may suggest a dual role for Pol γ - β in mitochondria, assuming that the transcript levels shown here are at least partially reflected as proportional protein levels. The strong correlation with *Suv3* transcript levels (Figure 3 and Supplementary Figure 3) is perhaps the most striking one. This gene encodes a helicase that is able to unwind dsDNA, dsRNA and DNA/RNA heteroduplexes and is required for processing of polycistronic transcripts, removal of antisense RNA, and general messenger and transfer RNA stability in *Drosophila* mitochondria (CLEMENTE et al., 2015; PAJAK et al., 2019). In the next section, we discuss the possible roles of other helicases in fly mtDNA maintenance.

We also analyzed relative transcript levels of *PolG1*, *mtDNA-helicase* and *mtSSB* from fly tissues represented in FlyAtlas 2 and modENCODE in pairwise comparisons, and verified they all correlate (Figure 3B and Supplementary Figure 3B), although PCA analysis indicates *mtSSB* levels are appreciably more distant from those of *PolG1* and *mtDNA-helicase* (Supplementary Figure 2). Considering that we have previously proposed that alterations in the stoichiometry of the mtDNA replisome, which would result from overexpression or depletion of one of its factors, could induce the formation of mtDNA deletions (CIESIELSKI et al., 2018b; OLIVEIRA; PONTES; CIESIELSKI, 2020), we decided to test if the transcriptomic data could provide any insights into this matter. We analyzed the data using the absolute expression values reported in FlyAtlas 2 (in fragments per kilobase million, FPKM), once again making the assumption that these might correlate with protein levels inside mitochondria. We found that *PolG2* levels are consistently higher (~5.8-fold on average, +/-

2.7) than those of *PolG1* across all tissues (Supplementary Table 3). This excess is well above that of the homotetrameric mtSSB (~1.8-fold, +/- 0.6) (Supplementary Table 4), which is considered one of the most abundant mtDNA proteins (BOGENHAGEN; ROUSSEAU; BURKE, 2008; TAKAMATSU et al., 2002). It also indicates there would always be sufficient Pol γ - β to function in association with Pol γ - α to form the dimeric holoenzyme in a 1:1 configuration for mtDNA replication, in agreement with previously published data (LEFAI et al., 2000) and with our speculations on additional roles for the fly Pol γ - β in mitochondrial RNA metabolism. Our data also contrasts with data from human tissues, which indicates 2- to 3-fold excess of Pol γ - α over Pol γ - β (CIESIELSKI et al., 2021). *PolG1* levels were higher than those of *PolG2* (~62%) only in the ovaries, a tissue that also has elevated relative expression of almost all mtDNA maintenance genes (Figure 2) due to the high levels of mtDNA replication and mitochondrial biogenesis that occur during oogenesis (CHEN; XU, 2016; TOURMENTE et al., 1990). The reasons why *PolG2* levels are lower in a tissue with high production of mitochondria and mtDNA are intriguing and warrant further investigation, but it is worth mentioning that the female germline is the only type of cells for which selection against mutated mtDNA molecules has been shown in *Drosophila* (LIEBER et al., 2019).

We also observed in our data another striking correlation between the absolute expression values of *mtDNA-helicase* and *PolG1*: the ratio between their transcript levels averaged at ~1.2 (+/- 0.48) (Supplementary Table 5). Supposing once again that transcript levels are directly reflected in polypeptide levels and that *Drosophila* Twinkle is homohexameric inside mitochondria, these numbers indicate a ~5.8-fold (+/- 2.3) excess of Pol γ holoenzyme over Twinkle, and that the latter is the limiting factor in mtDNA replication, at least in terms of fork progression of the mtDNA replisome in its “static view”. Interestingly, to our knowledge, Twinkle is the only fly mtDNA replisome factor whose

overexpression increases mtDNA copy number (MATSUSHIMA; KAGUNI, 2007b; RODRIGUES et al., 2018; SANCHEZ-MARTINEZ et al., 2012), but it also leads to mtDNA deletions (CIESIELSKI et al., 2018b), indicating its levels might be controlled to determine a functional number of intact copies of mtDNA in each tissue. However, quite surprisingly, there appear to exist tissues in *Drosophila* in which Twinkle dysfunction or misexpression has no measurable phenotypic and biochemical effects (RODRIGUES et al., 2018). We present new data on the matter and discuss the relevance of these findings in the next section. In summary, based solely on transcriptomic data analyses of fly tissues from the FlyAtlas 2 databank, we speculate that on average for each hexameric Twinkle, there are ~5.4 dimeric Pol γ holoenzymes, ~8.5 tetrameric mtSSBs, and ~22 extra Pol γ - β molecules. We believe we present for the first time a rough estimate of the population of mtDNA replisome molecules in *Drosophila* mitochondria from a significant variety of tissues. Although this is potentially informative, it is not conclusive at any level and must be seen with extreme caution. Further analyses of the tissue-specific expression levels of the other mtDNA maintenance genes are required for a better understanding of the DNA and RNA metabolic processes involved, and extensive work is necessary for our predictions to be tested experimentally.

Twinkle and the potential involvement of additional helicases

We have shown previously that ubiquitously expressed, defective versions of Twinkle cause lethality at the *Drosophila* larval stage, but inducing their expression only in neurons or muscles surprisingly does not impact development (RODRIGUES et al., 2018). The nervous system and the musculature are tissues with high demand for OXPHOS-driven ATP synthesis, and therefore mitochondrial dysfunction is expected to have phenotypic outcomes. To explore this further in the context of possible tissue-specific mtDNA maintenance processes, here we present preliminary analyses of Twinkle dysfunction in the adult fly

nervous system and musculature, and a short perspective on possible roles of other helicases in *Drosophila* mtDNA replication. We used the *UAS/GAL4* system to overexpress wild-type Twinkle (WT) or the dominant-negative Twinkle K388A mutant (SANCHEZ-MARTINEZ et al., 2012) using the pan-neuronal *elavGAL4* and the muscle-specific *mhcGAL4* drivers. Overexpression was confirmed by immunoblotting using mitochondrial extracts from adult heads (where most of the central nervous system is located) and thoraces (where the indirect and direct flight muscles are found); once again it did not cause developmental failure when directed to these energy-demanding tissues (Supplementary Figure 4). K388 in the fly Twinkle is the equivalent of human Twinkle K421 and T7 gp4 K318, a highly conserved lysine residue in the Walker A motif of the C-terminal helicase domain of these enzymes, which is essential for ATP binding and hydrolysis, and thus for dsDNA unwinding at the replication fork (MATSUSHIMA; KAGUNI, 2007b; PATEL; HINGORANI; NG, 1994; TORREGROSA-MUÑOZ et al., 2019; WANROOIJ et al., 2007). One could say absence/replacement of this lysine is incompatible with cellular and organismal viability.

We next checked if adult Twinkle overexpressors had altered longevity, and verified a considerable decrease in median and maximum lifespan of flies overexpressing Twinkle K388A in neurons (*elav>Twinkle K388A*) (Figure 4A, upper panels). We also observed that the transgenic construct *elavGAL4*, independent of *UAS-Twinkle*, reduced longevity in *Drosophila*, as both *elavGAL4* driver control (*elav>w¹¹¹⁸*) and *elav>Twinkle WT* flies lived an average of 10 days less than controls without *elavGAL4*. We assume that the *GAL4* transgene in this driver line, which was inserted into the promoter region of the endogenous *elav* gene on the chromosome X (CASAS-TINTÓ; ARNÉS; FERRÚS, 2017; ROBINOW; WHITE, 1991), interferes with some functions of the gene, affecting adult longevity. We also performed climbing assays to verify if the decrease in longevity induced by Twinkle K388A is due to neurolocomotor problems in adult flies, and observed a severe inability of *elavGAL4>Twinkle*

K388A flies to climb (Figure 4B). Some of the individuals were so severely affected that during the course of our experiment, they did not even try to climb (an ability known as negative geotaxis, quite natural to healthy adult flies), or fell backwards immediately after trying (data not shown). The phenotype was more pronounced in males.

Unlike the neuron-specific effects, neither Twinkle *K388A* nor WT overexpression in the muscles led to any detectable changes in longevity and locomotor ability of adult flies (Figure 4A, lower panels, and B). We then measured relative mtDNA copy number in head and thorax extracts, and observed that overexpression of Twinkle WT in neurons and in muscles caused an increase of ~30% in mtDNA levels in both tissues (Figure 4C). This corroborates previously published data for mice (IKEDA et al., 2015b; TYYNISMAA et al., 2005), adult flies and cultured S2 cells (MATSUSHIMA; KAGUNI, 2007b; RODRIGUES et al., 2018), again suggesting that Twinkle is a limiting factor for mtDNA replication. Overexpression of Twinkle *K388A* in the nervous system dropped mtDNA copy number more than 50% (Figure 4C), which is consistent with a mitochondrial dysfunction leading to locomotor defects and reduced lifespan in the *elavGAL4>Twinkle K388A* adult flies. The musculature of *mhc>Twinkle K388A* individuals, on the other hand, showed no significant changes in mtDNA levels (Figure 4C), consistent with the idea that Twinkle *K388A* is neutral in muscle tissues of *Drosophila*, despite being expressed at very high levels (Supplementary Figure 4B). The adult thoracic musculature (which includes the muscles that control the flying and the negative geotaxis behaviors) of *D. melanogaster* is one of the most efficient tissues in OXPHOS-driven ATP production in the animal kingdom (CHATTERJEE; PERRIMON, 2021), with mitochondria occupying up to a third of the total volume of the cells (LEVENBOOK; WILLIAMS, 1956). Therefore, the absence of altered locomotor ability, longevity and mtDNA levels in *mhcGAL4>Twinkle K388A* flies is extremely intriguing. Our results suggest that

although Twinkle is indispensable for mtDNA maintenance in *Drosophila* neurons, it may play no role at all in the adult musculature.

Because in whole adult fly samples the vast majority of isolated mitochondria (and therefore mtDNA molecules) come from the thoracic musculature, it is safe to assume that the main mode of mtDNA replication described for adult individuals ((JÖERS; JACOBS, 2013) and see above) is in fact the mode for this tissue. If that is indeed correct, it is puzzling that mtDNA maintenance has been described basically identically in S2 cells and in adult flight muscles, and yet a severely defective Twinkle enzyme causes a strong mtDNA depletion in the former (MATSUSHIMA; KAGUNI, 2007b) and no detectable phenotype in the latter (Figure 4). Note that the FlyAtlas 2 and modENCODE data in this case does not help us understand the possible tissue-specific roles of Twinkle in *Drosophila*, since expression levels of *mtDNA-helicase* are extremely low in adult heads, brains, eyes and carcasses (Figure 2). The carcass, from which muscle transcriptomic data is derived, is particularly complicated to analyze as it is likely contaminated with the high levels of *mtDNA-helicase* transcripts from ovarian tissues in females (please refer to www.flyatlas2.org (KRAUSE et al., 2022; LEADER et al., 2018) for details on the nature of the carcass), artifactually suggesting sex-specific differences. New methods to analyze mtDNA replication intermediates must then be applied to solve this issue. We envision that these analyses from fly tissues of Twinkle overexpressors might reveal yet new mechanisms of mtDNA maintenance in animals, some of which may be independent of Twinkle. Expanding our knowledge on the diversity of nucleic acid metabolic processes in animal mitochondria will be quite an exciting research path to take in the near future.

In mammals, Twinkle is considered the only mitochondrial replicative helicase, but four other helicases have also been shown to localize to mitochondria (reviewed in (PETER; FALKENBERG, 2020)), all of which have homologues in flies. As mentioned above, the

Drosophila Suv3 appears to be essential for mitochondrial RNA metabolism (CLEMENTE et al., 2015; PAJAK et al., 2019). However, the fact that the human homologue unwinds dsDNA more efficiently than dsRNA and that knockout of the mouse homologue causes accumulation of mtDNA mutations (CHEN et al., 2013) leads us to speculate a potential additional function for this enzyme. It could perhaps function as a replicative helicase, at least when Twinkle is absent or not required for mtDNA maintenance as we suggest here for the fly musculature. It is also possible that Suv3 functions as a mtDNA repair enzyme; in this case in *Drosophila*, the correlation between the expression levels of *Suv3* and *PolG2* would indicate that the putative excess of Pol γ - β molecules inside mitochondria are also for DNA repair purposes.

The *Drosophila* Pif1, Dna2 and RecQ4 helicases (encoded by the *Pif1*, *Dna2* and *RecQ4* genes, respectively), on the other hand, appear to lack mitochondrial targeting sequences (Supplementary Table 1). In addition, mutations in these genes cause no clear mitochondrial and/or mtDNA phenotype (CREVEL et al., 2012; KOCAK et al., 2019; MITCHELL et al., 2022; WU et al., 2008; XU et al., 2009), unlike mutations in the human *DNA2* gene and ablation of the mouse *PIF1* gene, which are clearly associated with mitochondrial myopathy (BANNWARTH et al., 2016; RONCHI et al., 2013). The transcriptomic data presented above again does not provide any hints to which of these might have a replicative function in the absence of Twinkle. Alternatively, it is possible that in the fly musculature Twinkle requires a partner factor for proper function, perhaps a helicase loader, although it has been suggested that the human Twinkle *in vitro* does not require such a partner for loading onto a closed circular mtDNA molecule (JEMT et al., 2011). More extensive coexpression analyses of the muscle transcriptomics, and mutant/RNAi/protein-protein interaction screenings are plausible experimental approaches for future investigations of this issue.

Concluding Remarks

The mechanisms of mtDNA maintenance in *Drosophila*, as in mammals, appear to be diverse, although much still remains to be revealed experimentally. Flies have been and will continue to be important models for our understanding of mtDNA maintenance in human and other animal cells, but the mechanistic differences among these organisms must be taken into consideration for good models to be established. This is especially true for the mtDNA repair processes, which likely occur substantially differently in *Drosophila* and human mitochondria due to the distinct selective pressures that lead to mitochondrial genomes with separate nucleotide composition biases. This is evidenced by the lack of many human mtDNA repair orthologues in flies, and by the fact that factors proven to be important in human mitochondria, such as Ogg1, appear to have insignificant impact on *Drosophila* mtDNA maintenance. On the other hand, the conservation of at least the main mode of mtDNA replication and of the mtDNA replisome and transcription genes between flies and mammals suggests an important correlation with the highly compact structure and the highly conserved gene content of animal mitochondrial genomes, which are unique among eukaryotes. Importantly, more than just considering “a” mtDNA replication mode and “the” mtDNA replication (or transcription) machinery, we believe these are dynamic in nature both in flies and mammals, and may have tissue specificity to accommodate the physiology of particular cell types. This was here exemplified by the distinct roles of the fly Twinkle, “the” mitochondrial replicative helicase, whose dysfunction in the musculature apparently has no effect on tissue and organismal viability, whereas in the nervous system it leads to expected neurolocomotor defects. We hope this review can highlight some of the interesting paths investigators can take to help our community show how *Drosophila* may impact future mtDNA maintenance research.

Methods

In silico tissue-specific gene expression analyses

Genes important for mtDNA maintenance (Supplementary Table 2), and representative OXPHOS and other mitochondrial genes (see legend to Supplementary Figure 3 for FlyBase ID numbers) in *D. melanogaster* were used. Expression values (RNA-seq data) of these genes in different tissues in larva, pupa, and adult male and female were obtained from the FlyAtlas 2 (www.flyatlas2.org) (KRAUSE et al., 2022; LEADER et al., 2018) and the FlyBase (<http://flybase.org/>) (LARKIN et al., 2021) databases, as fragments per kilobase million (FPKM) and reads per kilobase million (RPKM), respectively. The data was normalized per tissue by the expression level of the housekeeping *eIF1A* gene (FlyBase ID FBgn0026250). A mean expression level among all genes of all tissues was calculated and used as a normalization factor across tissues to obtain the relative expression level of a gene per tissue, which was then converted to base 2 logarithm. Hierarchical cluster analyses were conducted using EXPANDER (<http://acgt.cs.tau.ac.il/expander/>) (HAIT et al., 2019), with the complete linkage method and the Pearson's correlation similarity measure. EXPANDER was also used for the principal component analyses. Pairwise correlations and linear regressions were performed using Microsoft Excel. R was used to perform the Kolmogorov-Smirnov test for normal distribution of the log transformed data and the Spearman's ρ correlations, as indicated in the figure legends.

Drosophila stock maintenance, and phenotypic assays

All fly lines were backcrossed into the w^{1118} background for at least six generations. The standard line w^{1118} , the Twinkle lines *UAS-Twinkle WT/TM6B* and *UAS-Twinkle K388A* (SANCHEZ-MARTINEZ et al., 2012), and driver lines *myosin heavy chain-GAL4* (*mhcGAL4*) and *embryonic lethal abnormal vision^{C155}-GAL4* (*elavGAL4*) were used. Flies

were cultured on standard diet (FERNANDEZ-AYALA et al., 2009) at 25°C, with 12 h light/dark cycles and manually controlled humidity.

Fifteen virgin *UAS-Twinkle* females were crossed, per vial, with 5-7 *w¹¹¹⁸* or *mhcGAL4* males to respectively generate progenies of uninduced controls or induced muscle-specific Twinkle overexpressors. For the pan-neuronal overexpressors, virgin *elavGAL4* females were crossed with *UAS-Twinkle* males. For the developmental assays, 60-90 eggs were monitored daily and kept until adult eclosion. Pupal viability was calculated as the mean ratio between the number of eclosed adults and the number of pupae per vial, with eight vials per experiment, and three biological replicates. For the longevity assays, 100-200 recently eclosed adult males and females were collected, kept separately in vials with 10-20 flies each, and transferred to new vials containing fresh food every 2-3 days, at which time dead flies were counted to generate a survival curve.

Climbing assays were conducted as described previously (MADABATTULA et al., 2015), with a few modifications. Forty-eighty adult females and males were collected on ice three days after eclosion. Groups of 10 flies were acclimated for 1 h at 25°C, and were transferred to transparent 19 cm-long climbing vials, which were then tapped on the bench 3-6 times for flies to fall to the bottom and start climbing. The climbing was recorded using a camera positioned 20 cm away from the vials and the videos were analyzed using the Image J software (RUEDEN et al., 2017). The percentage of flies that reached a 6 cm mark within 5 s was defined as climbing index.

Immunoblotting

Approximately 40 thoraces of *mhc>Twinkle* males and 200 heads of *elav>Twinkle* males and females (5 day old) were homogenized in 1 mL of isolation buffer (200 mM sucrose, 5 mM Tris/HCl, 2 mM EGTA, 2 mM DTT, pH 7.4) on ice, and centrifuged at 4°C

for 1 min at 200 g_{max} . The supernatant was recentrifuged at 4°C for 3 min at the same speed, and then for 10 min at 9,000 g_{max} . The pellet was resuspended in 1 mL of isolation buffer, recentrifuged for 10 min at 9,000 g_{max} , and finally resuspended in 200 μ L of isolation buffer to generate a crude mitochondrial fraction. Protein concentration was estimated via absorbance at 280 nm using NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA). Respectively, 80 and 40 μ g of extracts from thorax or head mitochondria were mixed with 4X Laemmli buffer (10% SDS, 50% glycerol, 25% 2-mercaptoethanol, 0.02% bromophenol blue, and 0.3125M Tris- HCl, pH 6.8), and denatured for 5 min at 95°C. Samples were resolved by SDS-PAGE on 12% polyacrylamide gels at 80V for 3 h. Proteins were transferred to a nitrocellulose membrane using a semi-dry gel transfer system (Major Science, USA) for 7 min at room temperature. Membranes were initially blocked overnight at 4°C in PBS/Tween 20 (8 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4 , 150 mM NaCl, 30 mM KCl, 0.05% Tween 20, pH 7.4) containing 5% dried nonfat milk. Afterwards, the membranes containing samples of the thorax mitochondrial extracts were incubated with a mixture of the primary antibodies (1:10,000 dilution of rabbit polyclonal anti-Dm helicase (MATSUSHIMA; KAGUNI, 2007b) and 1:12,000 dilution of mouse monoclonal anti-PDH E1 α (Abcam, UK) in PBS/Tween 20 containing 1% dried nonfat milk) for 1 h 30 min at room temperature, followed by three 30 min washes with PBS/Tween 20 and subsequent incubation with a mixture with the secondary antibodies (HRP-conjugated anti-rabbit and -mouse IgGs (Bio-Rad, USA) and washings, as described above. Membranes were incubated with Immun-Star HRP luminol detection system (Bio-Rad, USA) and chemiluminescence signals were detected using the ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad, USA). The membranes containing samples of the head mitochondrial extracts were first treated with the primary anti-Dm helicase antibody and the secondary HRP-conjugated anti-rabbit IgG, signals were detected as described above, and the membranes were stripped with a solution of 200 mM glycine, 0.1% SDS, 1% Tween 20, pH

2.2, for 30 min at room temperature. The membranes were then re-blocked, treated with the primary mouse monoclonal anti-ATP5A antibody (1:10,000 dilution, Abcam, UK) and the secondary HRP-conjugated anti-mouse IgG, and processed as described above.

Nucleic acid extraction and quantitative PCR

Total DNA was extracted from 10 heads and 3 thoraces of 7 day old *elav>Twinkle* and *mhc>Twinkle* adult males, respectively. Tissues were homogenized in 500 μ L of lysis buffer (75 mM NaCl, 25 mM EDTA, 25 mM HEPES, pH 7.5) on ice, followed by addition of 50 μ L of 10% SDS and 10 μ L of proteinase K (20 mg/mL) and incubation for 1 h at 37°C. Nucleic acids were extracted by adding 500 μ L of phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:14:1), mixing by inversion 4 times, incubating on ice for 1 min, centrifuging at 2000 g_{max} for 5 min at 4°C, recovering the aqueous phase, and repeating the procedure once. Nucleic acids were precipitated by addition of 80 μ L of 10 M ammonium acetate and 1 mL of ice-cold 100% ethanol, and overnight incubation at -20°C. Samples were centrifuged at 16,000 g_{max} for 30 min at 4°C, and washed with ice-cold 70% ethanol. After drying in lyophilizer for 15 min, nucleic acids were resuspended in 30 μ L of TE buffer (10 mM Tris/HCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.5), and DNA concentration was estimated by absorbance at 260 nm using NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA). To estimate the relative mtDNA copy number, 15 ng of total DNA were used as template in quantitative amplification reactions of a fragment of the mitochondrial 16S *rRNA* gene (primers 5'-TCGTCCAACCATTCATTCCA-3' and 5'-TGGCCGCAGTATTTTGAAGT-3'), and a fragment of the single-copy nuclear *RpL32* gene (primers 5'-AGGCCCAAGATCGTGAAAGAA-3' and 5'-TGTGCACCAGGAAGTTCTTGAA-3'), as described previously (RODRIGUES et al., 2018). Reactions were performed using the SYBR Green JumpStart™ Taq ReadyMix™ Kit (Sigma-Aldrich, DE) in the StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, USA),

under the manufacturer's recommended conditions: 95°C for 2 min, 40 cycles of 95°C for 3 sec and 60°C for 30 sec, followed by melting curve. The $\Delta\Delta C_T$ values were calculated by comparing the ratios between the mitochondrial and nuclear target genes.

Data Availability

Processed and raw data of the analyses presented here can be obtained from the corresponding author upon request.

Author contributions

A.P.C.R., A.C.N. and M.T.O. collected data. A.P.C.R., A.C.N., G.L.C. and M.T.O. analyzed data. M.T.O. wrote the manuscript with input from A.P.C.R., A.C.N. and G.L.C.

Acknowledgements

We would like to thank Drs. Carlos A. Couto-Lima and Helen A. Penha for critical review of the manuscript, and Emily A. McKinney for English review. A.P.C.R. was supported by fellowships from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, grant number 140788/2018-2) and the Finnish National Agency for Education (EDUFI, grant number OPH-4426-2020). M.T.O. would like to acknowledge funding from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, grant numbers 2017/04372-0 and 2021/06711-2) and CNPq (grant number 424562/2018-9 and 308940/2021-0). G.L.C. acknowledges funding from the National Institutes of Health (NIH, grant number GM139104).

References

1. Boore JL. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res.* 1999;27(8):1767–80. Available from: <https://doi.org/10.1093/nar/27.8.1767>.
2. Gustafsson CM, Falkenberg M, Larsson NG. Maintenance and expression of mammalian mitochondrial DNA. *Annu Rev Biochem.* 2016;85:133–60. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014402>.
3. McKinney EA, Oliveira MT. Replicating animal mitochondrial DNA. *Genet Mol Biol.* 2013;36(3):308–15. Available from: <https://doi.org/10.1590/S1415-47572013000300002>.
4. Chinnery PF, Johnson MA, Wardell TM, Singh-Kler F, Hayes C, Brown DT, et al. The epidemiology of pathogenic mitochondrial DNA mutations. *Ann Neurol.* 2001;48(2):188–93. Available from: [https://doi.org/10.1002/1531-8249\(200008\)48:2%3C188::AID-ANA8%3E3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/1531-8249(200008)48:2%3C188::AID-ANA8%3E3.0.CO;2-P).
5. Elliott HR, Samuels DC, Eden JA, Relton CL, Chinnery PF. Pathogenic Mitochondrial DNA Mutations Are Common in the General Population. *Am J Hum Genet.* 2008;83(2):254–60. Available from: <https://doi.org/10.1016%2Fj.ajhg.2008.07.004>.
6. Tuppen HAL, Blakely EL, Turnbull DM, Taylor RW. Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg.* 2010;1797(2):113–28. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbabo.2009.09.005>.
7. Wong LJC. Diagnostic challenges of mitochondrial DNA disorders. *Mitochondrion.* 2007;7(1–2):45–52. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mito.2006.11.025>.
8. Ugur B, Chen K, Bellen HJ. Drosophila tools and assays for the study of human diseases. *Dis Model Mech.* 2016;9(3):235–44. Available from: <https://doi.org/10.1242/dmm.023762>.
9. Yamamoto S, Jaiswal M, Charng WL, Gambin T, Karaca E, Mirzaa G, et al. A

- Drosophila* genetic resource of mutants to study mechanisms underlying human genetic diseases. Cell. 2014;159(1):200–14. Available from: <https://doi.org/10.1016%2Fj.cell.2014.09.002>.
10. Pastor-Pareja JC, Xu T. Dissecting social cell biology and tumors using *Drosophila* genetics. Annu Rev Genet. 2013;47:51–74. Available from: <https://doi.org/10.1146%2Fannurev-genet-110711-155414>.
 11. Lu B, Vogel H. *Drosophila* models of neurodegenerative diseases. Annu Rev Pathol Mech Dis. 2009;4:315–42. Available from: <https://doi.org/10.1146%2Fannurev.pathol.3.121806.151529>.
 12. Reyes A, Kazak L, Wood SR, Yasukawa T, Jacobs HT, Holt IJ. Mitochondrial DNA replication proceeds via a “bootlace” mechanism involving the incorporation of processed transcripts. Nucleic Acids Res. 2013;41(11):5837–50. Available from: <https://doi.org/10.1093/nar/gkt196>.
 13. González de Cózar JM, Gerards M, Teeri E, George J, Dufour E, Jacobs HT, et al. RNase H1 promotes replication fork progression through oppositely transcribed regions of *Drosophila* mitochondrial DNA. J Biol Chem. 2019;294(12):4331–44. Available from: <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.007015>.
 14. Holt IJ. The mitochondrial R-loop. Nucleic Acids Res. 2019;47(11):5480–9. Available from: <https://doi.org/10.1093/nar/gkz277>.
 15. Fusté JM, Wanrooij S, Jemt E, Granycome CE, Cluett TJ, Shi Y, et al. Mitochondrial RNA polymerase is needed for activation of the origin of light-strand DNA replication. Mol Cell. 2010;37(1):67–78. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.12.021>.
 16. Wanrooij S, Fusté JM, Farge G, Shi Y, Gustafsson CM, Falkenberg M. Human mitochondrial RNA polymerase primes lagging-strand DNA synthesis in vitro. Proc

- Natl Acad Sci U S A. 2008;105(32):11122–7. Available from:
<https://doi.org/10.1073/pnas.0805399105>.
17. Jöers P, Jacobs HT. Analysis of Replication Intermediates Indicates That *Drosophila melanogaster* Mitochondrial DNA Replicates by a Strand-Coupled Theta Mechanism. PLoS One. 2013;8(1). Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053249>.
 18. Lewis DL, Farr CL, Farquhar AL, Kaguni LS. Sequence, organization, and evolution of the A+T region of *Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA. Mol Biol Evol. 1994;11(3):523–38. Available from:
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040132>.
 19. Jöers P, Lewis SC, Fukuoh A, Parhiala M, Ellilä S, Holt IJ, et al. Mitochondrial transcription terminator family members mTTF and mTerf5 have opposing roles in coordination of mtDNA synthesis. PLoS Genet. 2013;9(9). Available from:
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003800>.
 20. Goddard JM, Wolstenholme DR. Origin and direction of replication in mitochondrial DNA molecules from *Drosophila melanogaster*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1978;75(8):3886–90. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.75.8.3886>.
 21. Yang MY, Bowmaker M, Reyes A, Vergani L, Angeli P, Gringeri E, et al. Biased Incorporation of Ribonucleotides on the Mitochondrial L-Strand Accounts for Apparent Strand-Asymmetric DNA Replication. Cell. 2002 Nov;111(4):495–505. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867402010759>.
 22. Yasukawa T, Reyes A, Cluett TJ, Yang M-Y, Bowmaker M, Jacobs HT, et al. Replication of vertebrate mitochondrial DNA entails transient ribonucleotide incorporation throughout the lagging strand. EMBO J. 2006 Nov 15;25(22):5358–71. Available from: <http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1038/sj.emboj.7601392>.
 23. Ciesielski GL, Nadalutti CA, Oliveira MT, Jacobs HT, Griffith JD, Kaguni LS.

- Structural rearrangements in the mitochondrial genome of *Drosophila melanogaster* induced by elevated levels of the replicative DNA helicase. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(6):3034–46. Available from: <https://doi.org/10.1093/nar/gky094>.
24. Ciesielski GL, Oliveira MT, Kaguni LS. Animal Mitochondrial DNA Replication. *The Enzymes*. 2016. 255–292 p. Available from: <https://doi.org/10.1016/bs.enz.2016.03.006>.
 25. Falkenberg M, Gustafsson CM. Mammalian mitochondrial DNA replication and mechanisms of deletion formation. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2020;55(6):509–24. Available from: <https://doi.org/10.1080/10409238.2020.1818684>.
 26. Oliveira MT, Pontes C de B, Ciesielski GL. Roles of the mitochondrial replisome in mitochondrial DNA deletion formation. *Genet Mol Biol.* 2020;43(1):e20190069. Available from: <https://doi.org/10.1590%2F1678-4685-GMB-2019-0069>.
 27. Oliveira MT, Kaguni LS. Reduced stimulation of recombinant DNA polymerase γ and mitochondrial DNA (mtDNA) helicase by variants of mitochondrial single-stranded DNA-binding protein (mtSSB) correlates with defects in mtDNA replication in animal cells. *J Biol Chem.* 2011;286(47):40649–58. Available from: <https://doi.org/10.1074/jbc.m111.289983>.
 28. Kaguni LS. DNA polymerase γ , the mitochondrial replicase. *Annu Rev Biochem.* 2004;73:293–320. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161455>.
 29. Marygold SJ, Attrill H, Speretta E, Warner K, Magrane M, Berloco M, et al. The DNA polymerases of *Drosophila melanogaster*. *Fly (Austin).* 2020;14(1–4):49–61. Available from: <https://doi.org/10.1080/19336934.2019.1710076>.
 30. Oliveira MT, Haukka J, Kaguni LS. Evolution of the metazoan mitochondrial replicase. *Genome Biol Evol.* 2015;7(4):943–59. Available from:

<https://doi.org/10.1093/gbe/evv042>.

31. Longley MJ, Nguyen D, Kunkel TA, Copeland WC. The Fidelity of Human DNA Polymerase γ with and without Exonucleolytic Proofreading and the p55 Accessory Subunit. *J Biol Chem*. 2001 Oct;276(42):38555–62. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820741074>
32. Iyengar B, Luo N, Farr CL, Kaguni LS, Campos AR. The accessory subunit of DNA polymerase γ is essential for mitochondrial DNA maintenance and development in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(7):4483–8. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.072664899>.
33. Wang Y, Farr CL, Kaguni LS. Accessory subunit of mitochondrial DNA polymerase from *Drosophila* embryos: Cloning, molecular analysis, and association in the native enzyme. *J Biol Chem*. 1997;272(21):13640–6. Available from: <https://doi.org/10.1074/jbc.272.21.13640>.
34. Yakubovskaya E, Chen Z, Carrodegua JA, Kisker C, Bogenhagen DF. Functional human mitochondrial DNA polymerase γ forms a heterotrimer. *J Biol Chem*. 2006;281(1):374–82. Available from: <https://doi.org/10.1074/jbc.m509730200>.
35. Matsushima Y, Kaguni LS. Differential phenotypes of active site and human autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia mutations in *Drosophila* mitochondrial DNA helicase expressed in Schneider cells. *J Biol Chem*. 2007;282(13):9436–9444. Available from: <https://doi.org/10.1074/jbc.m610550200>.
36. Lee YS, Lee S, Demeler B, Molineux IJ, Johnson KA, Yin YW. Each monomer of the dimeric accessory protein for human mitochondrial DNA polymerase has a distinct role in conferring processivity. *J Biol Chem*. 2010;285(2):1490–9. Available from: <https://doi.org/10.1074/jbc.m109.062752>.
37. Hudson G, Chinnery PF. Mitochondrial DNA polymerase- γ and human disease. *Hum*

- Mol Genet. 2006;15(SUPPL. 2):244–52. Available from:
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddl233>.
38. Silva-Pinheiro P, Pardo-Hernández C, Reyes A, Tilokani L, Mishra A, Cerutti R, et al. DNA polymerase gamma mutations that impair holoenzyme stability cause catalytic subunit depletion. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(9):5230–48. Available from:
<https://doi.org/10.1093/nar/gkab282>.
 39. Euro L, Farnum GA, Palin E, Suomalainen A, Kaguni LS. Clustering of Alpers disease mutations and catalytic defects in biochemical variants reveal new features of molecular mechanism of the human mitochondrial replicase, Pol γ . *Nucleic Acids Res.* 2011;39(21):9072–84. Available from: <https://doi.org/10.1093/nar/gkr618>.
 40. Ciesielski GL, Bermek O, Rosado-Ruiz FA, Hovde SL, Neitzke OJ, Griffith JD, et al. Mitochondrial single-stranded DNA-binding proteins stimulate the activity of DNA polymerase γ by organization of the template DNA. *J Biol Chem.* 2015;290(48):28697–707. Available from: <https://doi.org/10.1074/jbc.m115.673707>.
 41. Farr CL, Wang Y, Kaguni LS. Functional interactions of mitochondrial dna polymerase and single- stranded DNA-binding protein. Template-primer DNA binding and initiation and elongation of DNA strand synthesis. *J Biol Chem.* 1999;274(21):14779–85. Available from: <https://doi.org/10.1074/jbc.274.21.14779>.
 42. Lewis O L, Farr CL, Kaguni LS. *Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA: Completion of the nucleotide sequence and evolutionary comparisons. *Insect Mol Biol.* 1995;4(4):263–78. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.1995.tb00032.x>.
 43. Ciesielski GL, Kim S, de Bovi Pontes C, Kaguni LS. Physical and Functional Interaction of Mitochondrial Single-Stranded DNA-Binding Protein and the Catalytic Subunit of DNA Polymerase Gamma. *Front Genet.* 2021;12(September). Available

- from: <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.721864>.
44. Matsushima Y, Kaguni LS. Functional importance of the conserved N-terminal domain of the mitochondrial replicative DNA helicase. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1787(5):290–295. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2008.11.005>.
 45. Wang Y, Kaguni LS. Baculovirus expression reconstitutes *Drosophila* mitochondrial DNA polymerase. *J Biol Chem*. 1999;274(41):28972–7. Available from: <https://doi.org/10.1074/jbc.274.41.28972>.
 46. Oliveira MT, Kaguni LS. Comparative purification strategies for *Drosophila* and human mitochondrial DNA replication proteins: DNA polymerase gamma and mitochondrial single-stranded DNA-binding protein. *Methods Mol Biol*. 2009;554:37–58. Available from: https://doi.org/10.1007/978-1-59745-521-3_3.
 47. Bratic A, Kauppila TES, Macao B, Grönke S, Siibak T, Stewart JB, et al. Complementation between polymerase- and exonuclease-deficient mitochondrial DNA polymerase mutants in genomically engineered flies. *Nat Commun* [Internet]. 2015 Dec 10;6(1):8808. Available from: <http://www.nature.com/articles/ncomms9808>
 48. Trifunovic A, Wredenberg A, Falkenberg M, Spelbrink JN, Rovio AT, Bruder CE, et al. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature*. 2004;429(6990):417–23. Available from: <https://doi.org/10.1038/nature02517>.
 49. Garesse R. *Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA: Gene organization and evolutionary considerations. *Genetics*. 1988;118(4):649–63. Available from: <https://doi.org/10.1093/genetics/118.4.649>.
 50. Ameer A, Stewart JB, Freyer C, Hagström E, Ingman M, Larsson NG, et al. Ultra-deep sequencing of mouse mitochondrial DNA: Mutational patterns and their origins. *PLoS Genet*. 2011;7(3):18–21. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002028>.

51. Yu Z, O'Farrell PH, Yakubovich N, DeLuca SZ. The mitochondrial DNA-polymerase promotes elimination of paternal mitochondrial genomes. *Curr Biol.* 2017;27(7):1033–1039. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.02.014>.
52. Spelbrink JN, Li FY, Tiranti V, Nikali K, Yuan QP, Tariq M, et al. Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria. *Nat Genet.* 2001;28(3):223–31. Available from: <https://doi.org/10.1038/90058>.
53. Shutt TE, Gray MW. Twinkle, the mitochondrial replicative DNA helicase, is widespread in the eukaryotic radiation and may also be the mitochondrial DNA primase in most eukaryotes. *J Mol Evol.* 2006;62(5):588–99. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00239-005-0162-8>.
54. Kaguni LS, Oliveira MT. Structure, function and evolution of the animal mitochondrial replicative DNA helicase. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2016;51(1):53–64. Available from: <https://doi.org/10.3109/10409238.2015.1117056>.
55. Park K, Debyser Z, Tabor S, Richardson CC, Griffith JD. Formation of a DNA loop at the replication fork generated by bacteriophage T7 replication proteins. *J Biol Chem.* 1998;273(9):5260–70. Available from: <https://doi.org/10.1074/jbc.273.9.5260>.
56. Farge G, Holmlund T, Khvorostova J, Rofougaran R, Hofer A, Falkenberg M. The N-terminal domain of TWINKLE contributes to single-stranded DNA binding and DNA helicase activities. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(2):393–403. Available from: <https://doi.org/10.1093/nar/gkm1025>.
57. Kato M, Ito T, Wagner G, Richardson CC, Ellenberger T. Modular architecture of the bacteriophage T7 primase couples RNA primer synthesis to DNA synthesis. *Mol Cell.* 2003;11(5):1349–60. Available from: [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(03\)00195-3](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00195-3).
58. Stiban J, Farnum GA, Hovde SL, Kaguni LS. The N-terminal domain of the

- Drosophila* mitochondrial replicative DNA helicase contains an iron-sulfur cluster and binds DNA. J Biol Chem. 2014;289(35):24032–42. Available from: <https://doi.org/10.1074/jbc.m114.587774>.
59. Zhu B, Lee SJ, Richardson CC. Direct role for the RNA polymerase domain of T7 primase in primer delivery. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(20):9099–104. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.1004220107>.
 60. So M, Stiban J, Ciesielski GL, Hovde SL, Kaguni LS. Implications of membrane binding by the Fe-S cluster-containing N-terminal domain in the *Drosophila* mitochondrial replicative DNA helicase. Front Genet. 2021;12(December):1–16. Available from: <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.790521>.
 61. Shi R, Hou W, Wang ZQ, Xu X. Biogenesis of iron–sulfur clusters and their role in DNA metabolism. Front Cell Dev Biol. 2021;9(September):1–13. Available from: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.735678>.
 62. Fukuoh A, Cannino G, Gerards M, Buckley S, Kazancioglu S, Scialo F, et al. Screen for mitochondrial DNA copy number maintenance genes reveals essential role for ATP synthase . Mol Syst Biol. 2014;10(6):734. Available from: <https://doi.org/10.15252/msb.20145117>.
 63. Salminen TS, Oliveira MT, Cannino G, Lillsunde P, Jacobs HT, Kaguni LS. Mitochondrial genotype modulates mtDNA copy number and organismal phenotype in *Drosophila*. Mitochondrion. 2017;34:75–83. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mito.2017.02.001>.
 64. de Miranda JR, Eggleston P. Larval competition in *Drosophila melanogaster*. I. Estimation of larval growth parameters. Heredity (Edinb). 1988;60(2):205–12. Available from: <https://doi.org/10.1038/hdy.1988.33>.
 65. de Miranda JR, Eggleston P. Larval competition in *Drosophila melanogaster*. II.

- Comparing biological and competitive parameters. *Heredity* (Edinb). 1988;60(2):213–9. Available from: <https://doi.org/10.1038/hdy.1988.34>.
66. de Miranda JR, Eggleston P. Genetic analysis of larval competition in *Drosophila melanogaster*. *Heredity* (Edinb). 1988;61(3):339–46. Available from: <https://doi.org/10.1038/hdy.1988.124>.
 67. Sanchez-Martinez A, Calleja M, Peralta S, Matsushima Y, Hernandez-Sierra R, Whitworth AJ, et al. Modeling pathogenic mutations of human Twinkle in *Drosophila* suggests an apoptosis role in response to mitochondrial defects. *PLoS One*. 2012;7(8):1–11. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043954>.
 68. Rodrigues APC, Camargo AF, Andjelković A, Jacobs HT, Oliveira MT. Developmental arrest in *Drosophila melanogaster* caused by mitochondrial DNA replication defects cannot be rescued by the alternative oxidase. *Sci Rep*. 2018;8(1):10882. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-018-29150-x>
 69. Adán C, Matsushima Y, Hernández-Sierra R, Marco-Ferreres R, Fernández-Moreno MÁ, González-Vioque E, et al. Mitochondrial transcription factor B2 is essential for metabolic function in *Drosophila melanogaster* development. *J Biol Chem*. 2008;283(18):12333–42. Available from: <https://doi.org/10.1074%2Fjbc.M801342200>.
 70. Posse V, Al-Behadili A, Uhler JP, Clausen AR, Reyes A, Zeviani M, et al. RNase H1 directs origin-specific initiation of DNA replication in human mitochondria. *PLoS Genet*. 2019;15(1):1–20. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007781>.
 71. Ma H, O’Farrell PH. Selections that isolate recombinant mitochondrial genomes in animals. *Elife*. 2015;4:1–16. Available from: <https://doi.org/10.7554/elif.07247>.
 72. Perera S, Ramos A, Alvarez L, Jurado D, Guardiola M, Lima M, et al. Reappraising the human mitochondrial DNA recombination dogma. *bioRxiv*. 2018;1–20. Available

- from: <https://doi.org/10.1101/304535>.
73. Hagström E, Freyer C, Battersby BJ, Stewart JB, Larsson NG. No recombination of mtDNA after heteroplasmy for 50 generations in the mouse maternal germline. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(2):1111–6. Available from: <https://doi.org/10.1093/nar/gkt969>.
 74. Chen XJ. Mechanism of homologous recombination and implications for aging-related deletions in mitochondrial DNA. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2013;77(3):476–96. Available from: <https://doi.org/10.1128/mmbr.00007-13>.
 75. Bacman SR, Williams SL, Moraes CT. Intra- and inter-molecular recombination of mitochondrial DNA after in vivo induction of multiple double-strand breaks. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(13):4218–26. Available from: <https://doi.org/10.1093/nar/gkp348>.
 76. Morel F, Renoux M, Lachaume P, Alziari S. Bleomycin-induced double-strand breaks in mitochondrial DNA of *Drosophila* cells are repaired. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen.* 2008;637(1–2):111–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.07.007>.
 77. Persson Ö, Muthukumar Y, Basu S, Jenninger L, Uhler JP, Berglund AK, et al. Copy-choice recombination during mitochondrial L-strand synthesis causes DNA deletions. *Nat Commun.* 2019;10(1). Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08673-5>.
 78. Alencar RR, Batalha CMPF, Freire TS, de Souza-Pinto NC. Enzymology of mitochondrial DNA repair. In: *The Enzymes*. 2019. p. 257–87. Available from: <https://doi.org/10.1016/bs.enz.2019.06.002>.
 79. Sekelsky J. DNA repair in *Drosophila*: Mutagens, models, and missing genes. *Genetics.* 2017;205(2):471–90. Available from: <https://doi.org/10.1534/genetics.116.186759>.
 80. Itsara LS, Kennedy SR, Fox EJ, Yu S, Hewitt JJ, Sanchez-Contreras M, et al. Oxidative

- stress is not a major contributor to somatic mitochondrial DNA mutations. *PLoS Genet.* 2014;10(2). Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003974>.
81. Radyuk SN, Michalak K, Rebrin I, Sohal RS, Orr WC. Effects of ectopic expression of *Drosophila* DNA glycosylases dOgg1 and RpS3 in mitochondria. *Free Radic Biol Med.* 2006;41(5):757–764. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.05.021>.
 82. Garreau-Balandier I, Lefebvre M, Jacquard S, Caillat S, Cruz-Rodriguez L, Ishak L, et al. A comprehensive approach to determining BER capacities and their change with aging in *Drosophila melanogaster* mitochondria by oligonucleotide microarray. *FEBS Lett.* 2014;588(9):1673–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.03.008>.
 83. Allkanjari K, Baldock RA. Beyond base excision repair: An evolving picture of mitochondrial DNA repair. *Biosci Rep.* 2021;41(10):1–14. Available from: <https://doi.org/10.1042/bsr20211320>.
 84. Nilsen H, Rosewell I, Robins P, Skjelbred CF, Andersen S, Slupphaug G, et al. Uracil-DNA glycosylase (UNG)-deficient mice reveal a primary role of the enzyme during DNA replication. *Mol Cell.* 2000;5(6):1059–65. Available from: [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80271-3](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80271-3).
 85. Muha V, Horváth A, Békési A, Pukáncsik M, Hodoscsek B, Merényi G, et al. Uracil-containing DNA in *Drosophila*: Stability, stage-specific accumulation, and developmental involvement. *PLoS Genet.* 2012;8(6). Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002738>.
 86. Shutt TE, Gray MW. Bacteriophage origins of mitochondrial replication and transcription proteins. *Trends Genet.* 2006;22(2):90–5. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tig.2005.11.007>.

87. Herbers E, Kekäläinen NJ, Hangas A, Pohjoismäki JL, Goffart S. Tissue specific differences in mitochondrial DNA maintenance and expression. *Mitochondrion*. 2019;44(December 2017):85–92. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mito.2018.01.004>.
88. Milenkovic D, Blaza JN, Larsson NG, Hirst J. The enigma of the respiratory chain supercomplex. *Cell Metab*. 2017;25(4):765–76. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.03.009>.
89. Torregrosa-Muñumer R, Forslund JME, Goffart S, Pfeiffer A, Stojković G, Carvalho G, et al. PrimPol is required for replication reinitiation after mtDNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(43):11398–403. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.1705367114>.
90. Torregrosa-Muñumer R, Hangas A, Goffart S, Blei D, Zsurka G, Griffith J, et al. Replication fork rescue in mammalian mitochondria. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–16. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45244-6>.
91. Sen D, Nandakumar D, Tang GQ, Patel SS. Human mitochondrial DNA helicase Twinkle is both an unwinding and annealing helicase. *J Biol Chem*. 2012;287(18):14545–56. Available from: <https://doi.org/10.1074/jbc.m111.309468>.
92. Sen D, Patel G, Patel SS. Homologous DNA strand exchange activity of the human mitochondrial DNA helicase Twinkle. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(9):4200–10. Available from: <https://doi.org/10.1093/nar/nfw098>.
93. Matsushima Y, Goto YI, Kaguni LS. Mitochondrial Lon protease regulates mitochondrial DNA copy number and transcription by selective degradation of mitochondrial transcription factor A (TFAM). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(43):18410–5. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.1008924107>.
94. Leader DP, Krause SA, Pandit A, Davies SA, Dow JAT. FlyAtlas 2: a new version of

- the *Drosophila melanogaster* expression atlas with RNA-Seq, miRNA-Seq and sex-specific data. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2018 Jan 4;46(D1):D809–15. Available from: <http://academic.oup.com/nar/article/46/D1/D809/4563305>
95. Krause SA, Overend G, Dow JAT, Leader DP. FlyAtlas 2 in 2022: Enhancements to the *Drosophila melanogaster* expression atlas. *Nucleic Acids Res*. 2022;50(D1):D1010–5. Available from: <https://doi.org/10.1093/nar/gkab971>.
 96. Consortium T, Roy S, Ernst J, Kharchenko P V, Kheradpour P, Negre N, et al. Identification of functional elements and regulatory circuits by *Drosophila* modENCODE. *Science* (80-). 2011;330(6012):1787–97. Available from: <https://doi.org/10.1126/science.1198374>.
 97. Fan L, Kaguni LS. Multiple regions of subunit interaction in *Drosophila* mitochondrial DNA polymerase: Three functional domains in the accessory subunit. *Biochemistry*. 2001;40(15):4780–91. Available from: <https://doi.org/10.1021/bi010102h>.
 98. Fan L, Sanschagrin PC, Kaguni LS, Kuhn LA. The accessory subunit of mtDNA polymerase shares structural homology with aminoacyl-tRNA synthetases: Implications for a dual role as a primer recognition factor and processivity clamp. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(17):9527–32. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.96.17.9527>.
 99. Pajak A, Laine I, Clemente P, El-Fissi N, Schober FA, Maffezzini C, et al. Defects of mitochondrial RNA turnover lead to the accumulation of double-stranded RNA in vivo. *PLoS Genet*. 2019;15(7):1–25. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008240>.
 100. Clemente P, Pajak A, Laine I, Wibom R, Wedell A, Freyer C, et al. SUV3 helicase is required for correct processing of mitochondrial transcripts. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(15):7398–413. Available from: <https://doi.org/10.1093/nar/gkv692>.

101. Bogenhagen DF, Rousseau D, Burke S. The layered structure of human mitochondrial DNA nucleoids. *J Biol Chem*. 2008;283(6):3665–75. Available from: <https://doi.org/10.1074/jbc.m708444200>.
102. Takamatsu C, Umeda S, Ohsato T, Ohno T, Abe Y, Fukuoh A, et al. Regulation of mitochondrial D-loops by transcription factor A and single-stranded DNA-binding protein. *EMBO Rep*. 2002;3(5):451–6. Available from: <https://doi.org/10.1093%2Femboreports%2Fkvf099>.
103. Lefai E, Fernandez-Moreno MA, Alahari A, Kaguni LS, Garesse R. Differential regulation of the catalytic and accessory subunit genes of *Drosophila* mitochondrial DNA polymerase. *J Biol Chem*. 2000;275(42):33123–33. Available from: <https://doi.org/10.1074/jbc.m003024200>.
104. Chen Z, Xu H. In situ labeling of mitochondrial DNA replication in *Drosophila* adult ovaries by EdU staining. *J Vis Exp*. 2016;(October):1–8. Available from: <https://doi.org/10.3791/54516>.
105. Tourmente S, Lecher P, Degroote F, Renaud M, Biotechnologie ORSAN De. Mitochondrial development during *Drosophila* oogenesis: Distribution , density and in situ RNA hybridizations. *Biol Cell*. 1990;68:119–27. Available from: [https://doi.org/10.1016/0248-4900\(90\)90296-f](https://doi.org/10.1016/0248-4900(90)90296-f).
106. Lieber T, Jeedigunta SP, Palozzi JM, Lehmann R, Hurd TR. Mitochondrial fragmentation drives selective removal of deleterious mtDNA in the germline. *Nature* [Internet]. 2019 Jun 15;570(7761):380–4. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41586-019-1213-4>
107. Patel SS, Hingorani MM, Ng WM. The K318A mutant of bacteriophage T7 DNA primase-helicase protein is deficient in helicase but not primase activity and inhibits primase-helicase protein wild-type activities by heterooligomer formation.

- Biochemistry. 1994;33(25):7857–68. Available from:
<https://doi.org/10.1021/bi00191a013>.
108. Wanrooij S, Goffart S, Pohjoismäki JLO, Yasukawa T, Spelbrink JN. Expression of catalytic mutants of the mtDNA helicase Twinkle and polymerase POLG causes distinct replication stalling phenotypes. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(10):3238–51. Available from: <https://doi.org/10.1093/nar/gkm215>.
 109. Robinow S, White K. Characterization and spatial distribution of the ELAV protein during *Drosophila melanogaster* development. *J Neurobiol.* 1991;22(5):443–61. Available from: <https://doi.org/10.1002/neu.480220503>.
 110. Casas-Tintó S, Arnés M, Ferrús A. *Drosophila* enhancer-Gal4 lines show ectopic expression during development. *R Soc Open Sci.* 2017;4(3). Available from: <https://doi.org/10.1098/rsos.170039>.
 111. Ikeda M, Ide T, Fujino T, Arai S, Saku K, Kakino T, et al. Overexpression of TFAM or Twinkle increases mtDNA copy number and facilitates cardioprotection associated with limited mitochondrial oxidative stress. *PLoS One.* 2015;10(3):1–19. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119687>.
 112. Tyynismaa H, Mjosund KP, Wanrooij S, Lappalainen I, Ylikallio E, Jalanko A, et al. Mutant mitochondrial helicase Twinkle causes multiple mtDNA deletions and a late-onset mitochondrial disease in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(49):17687–92. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.0505551102>.
 113. Chatterjee N, Perrimon N. What fuels the fly: Energy metabolism in *Drosophila* and its application to the study of obesity and diabetes. *Sci Adv.* 2021;7(24):1–14. Available from: <https://doi.org/10.1126/sciadv.abg4336>.
 114. Levenbook L, Williams CM. Mitochondria in the flight muscles of insects. *J Gen Physiol.* 1956;39(4):497–512. Available from:

- <https://doi.org/10.1085%2Fjgp.39.4.497>.
115. Peter B, Falkenberg M. Twinkle and other human mitochondrial DNA helicases: Structure, function and disease. *Genes Rev.* 2020;11(408):1–21. Available from: <https://doi.org/10.3390/genes11040408>.
 116. Chen P, Chen C, Chen Y, Guo XE, Huang C, Shew J, et al. Mitochondrial genome instability resulting from SUV3 haploinsufficiency leads to tumorigenesis and shortened lifespan. *Oncogene.* 2013;32. Available from: <https://doi.org/10.1038/onc.2012.120>.
 117. Xu Y, Lei Z, Huang H, Dui W, Liang X, Ma J, et al. dRecQ4 is required for DNA synthesis and essential for cell proliferation in *Drosophila*. *PLoS One.* 2009;4(7):36–43. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006107>.
 118. Wu J, Capp C, Feng L, Hsieh T. *Drosophila* homologue of the Rothmund-Thomson syndrome gene: Essential function in DNA replication during development. *Dev Biol.* 2008;323(1):130–42. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.08.006>.
 119. Mitchell C, Becker V, Deloach J, Nestore E, Bolterstein E, Kohl KP. The *Drosophila* mutagen-sensitivity gene *mus109* encodes DmDNA2. *Genes (Basel).* 2022;13(312). Available from: <https://doi.org/10.3390/genes13020312>.
 120. Kocak E, Dykstra S, Nemeth A, Coughlin CG, Rodgers K, Mcvey M. The *Drosophila melanogaster* PIF1 helicase promotes synthesis during double-strand gap repair. *Genetics.* 2019;213(November):835–47. Available from: <https://doi.org/10.1534/genetics.119.302665>.
 121. Crevel G, Vo N, Crevel I, Hamid S, Hoa L, Miyata S, et al. *Drosophila* RecQ4 is directly involved in both DNA replication and the response to UV damage in S2 cells. *PLoS One.* 2012;7(11):1–14. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049505>.

122. Ronchi D, Fonzo A Di, Lin W, Bordoni A, Liu C, Fassone E, et al. Mutations in DNA2 link progressive myopathy to mitochondrial DNA instability. 2013;92(2):293-300.
Available from: <https://doi.org/10.1016%2Fj.ajhg.2012.12.014>.
123. Bannwarth S, Berg-alonso L, Fragaki K, Jill E, Lacas-gervais S, Burel-vandenbos F, et al. Inactivation of Pif1 helicase causes a mitochondrial myopathy in mice.
Mitochondrion. 2016;30:126–37. Available from:
<https://doi.org/10.1016/j.mito.2016.02.005>.
124. Jemt E, Farge G, Backstrom S, Holmlund T, Gustafsson CM, Falkenberg M. The mitochondrial DNA helicase TWINKLE can assemble on a closed circular template and support initiation of DNA synthesis. Nucleic Acids Res. 2011;39(21):9238–49.
Available from: <https://doi.org/10.1093/nar/gkr653>.
125. Larkin A, Marygold SJ, Antonazzo G, Attrill H, dos Santos G, Garapati P V., et al. FlyBase: Updates to the Drosophila melanogaster knowledge base. Nucleic Acids Res. 2021;49(D1):D899–907. Available from: <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1026>.
126. Hait TA, Maron-Katz A, Sagir D, Amar D, Ulitsky I, Linhart C, et al. The EXPANDER Integrated Platform for Transcriptome Analysis. J Mol Biol [Internet]. 2019 Jun;431(13):2398–406. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283619302803>
127. Fernandez-Ayala DJM, Sanz A, Vartiainen S, Kemppainen KK, Babusiak M, Mustalahti E, et al. Expression of the Ciona intestinalis Alternative Oxidase (AOX) in Drosophila Complements Defects in Mitochondrial Oxidative Phosphorylation. Cell Metab [Internet]. 2009 May;9(5):449–60. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413109000643>
128. Madabattula ST, Strautman JC, Bysice AM, O’Sullivan JA, Androschuk A, Rosenfelt C, et al. Quantitative analysis of climbing defects in a drosophila model of

- neurodegenerative disorders. *J Vis Exp*. 2015;2015(100):1–9. Available from: <https://doi.org/10.3791/252741>.
129. Rueden CT, Schindelin J, Hiner MC, DeZonia BE, Walter AE, Arena ET, et al. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics*. 2017;18(1):1–26. Available from: <https://doi.org/10.1038/290457a0>.
130. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MHL, Coulson AR. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 1981;290:457–465. Available from: <https://doi.org/10.1038/290457a0>.

Figure Legends

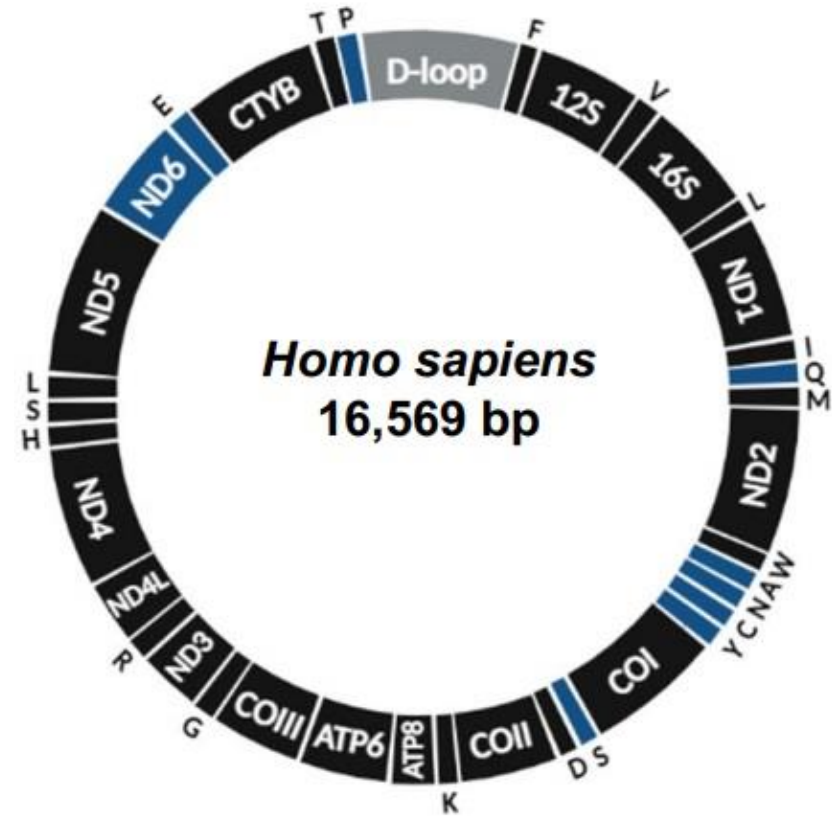
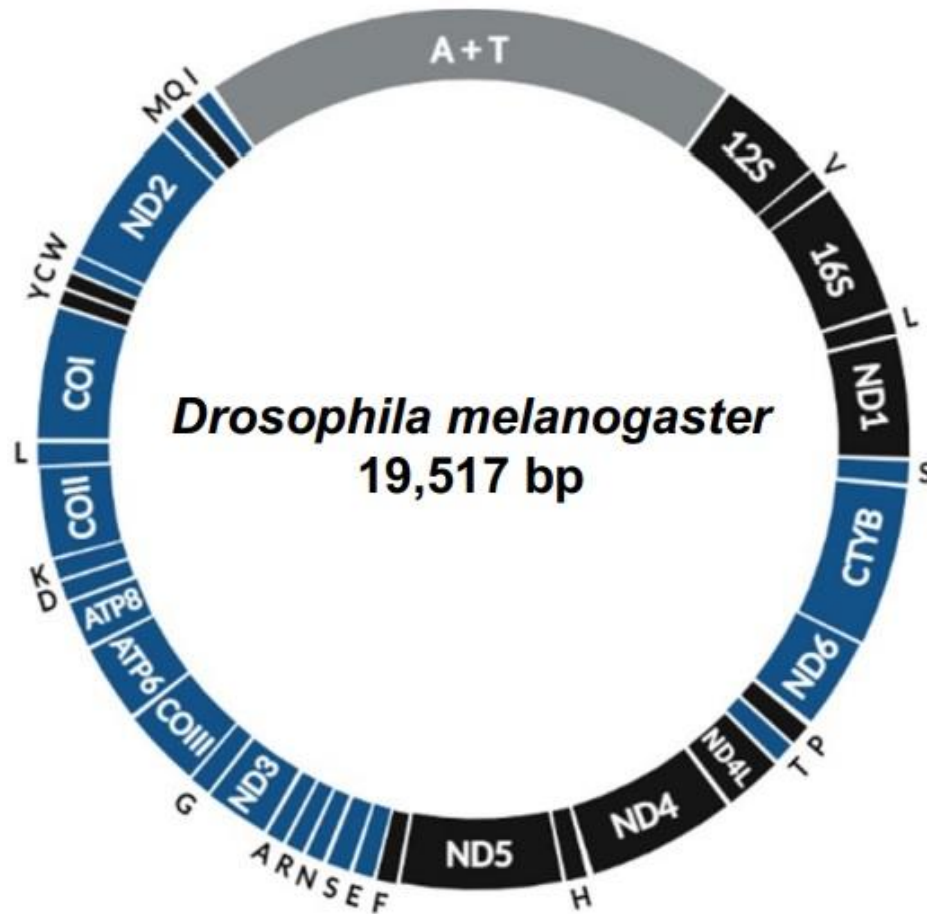
Figure 1. Schematic representation of the *Drosophila melanogaster* and human mitochondrial genomes. The non-coding regions (A+T-rich region in flies, and D-loop in humans) are shown in gray. Genes encoded in the heavy and light strands (or their equivalents in the *Drosophila* mtDNA) are shown in black and blue, respectively. Transfer RNA genes are indicated by single-letter symbols, and the small and large ribosomal RNA genes by 12S and 16S, respectively. The genome size indicated is based on Lewis *et al.* (LEWIS O L; FARR; KAGUNI, 1995) and Anderson *et al.* (ANDERSON et al., 1981b).

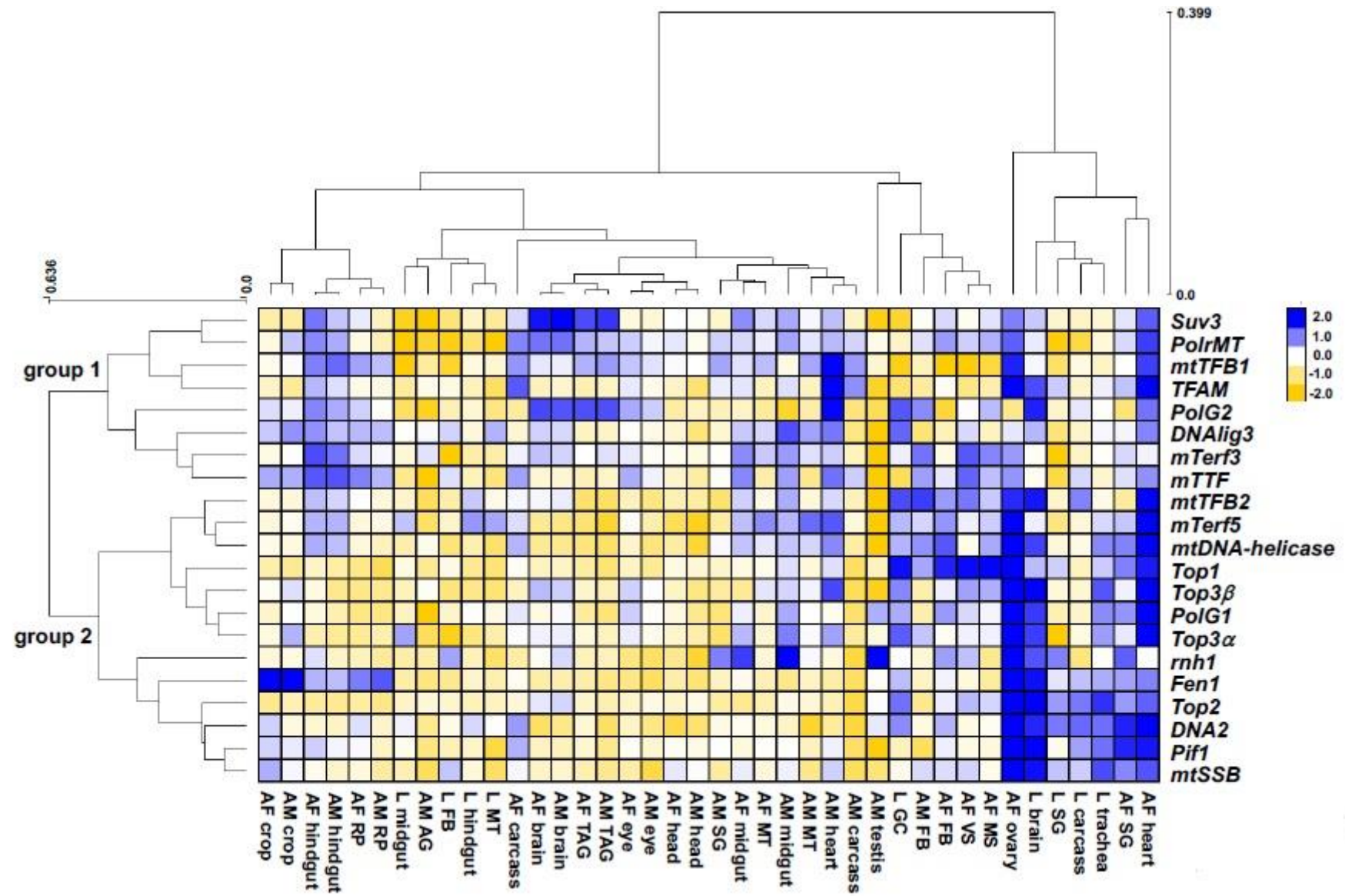
Figure 2. Hierarchical cluster analysis of the relative expression levels of *Drosophila* mtDNA maintenance genes across different fly tissues. Transcript levels were obtained from FlyAtlas 2 (KRAUSE et al., 2022), processed as described in the Methods, and shown in the heatmap as $\log_2(\text{fold change})$. The analysis was performed using EXPANDER (HAIT et al., 2019). L, AM and AF indicate larval, adult male and female, respectively. The tissues sampled were: head, brain, eye, trachea, salivary gland (SG), crop, heart, midgut, hindgut, Malpighian tubules (MT), Garland cells (GC), rectal pad (RP), thoracicoabdominal ganglion (TAG), fat body (FB), carcass, ovary, virgin spermatheca (VS), mated spermatheca (MS), testis and accessory glands (AG). Groups 1 and 2 indicate respectively the “transcription/transcript processing” and “replication” clusters of genes formed with the analysis. See text for more details.

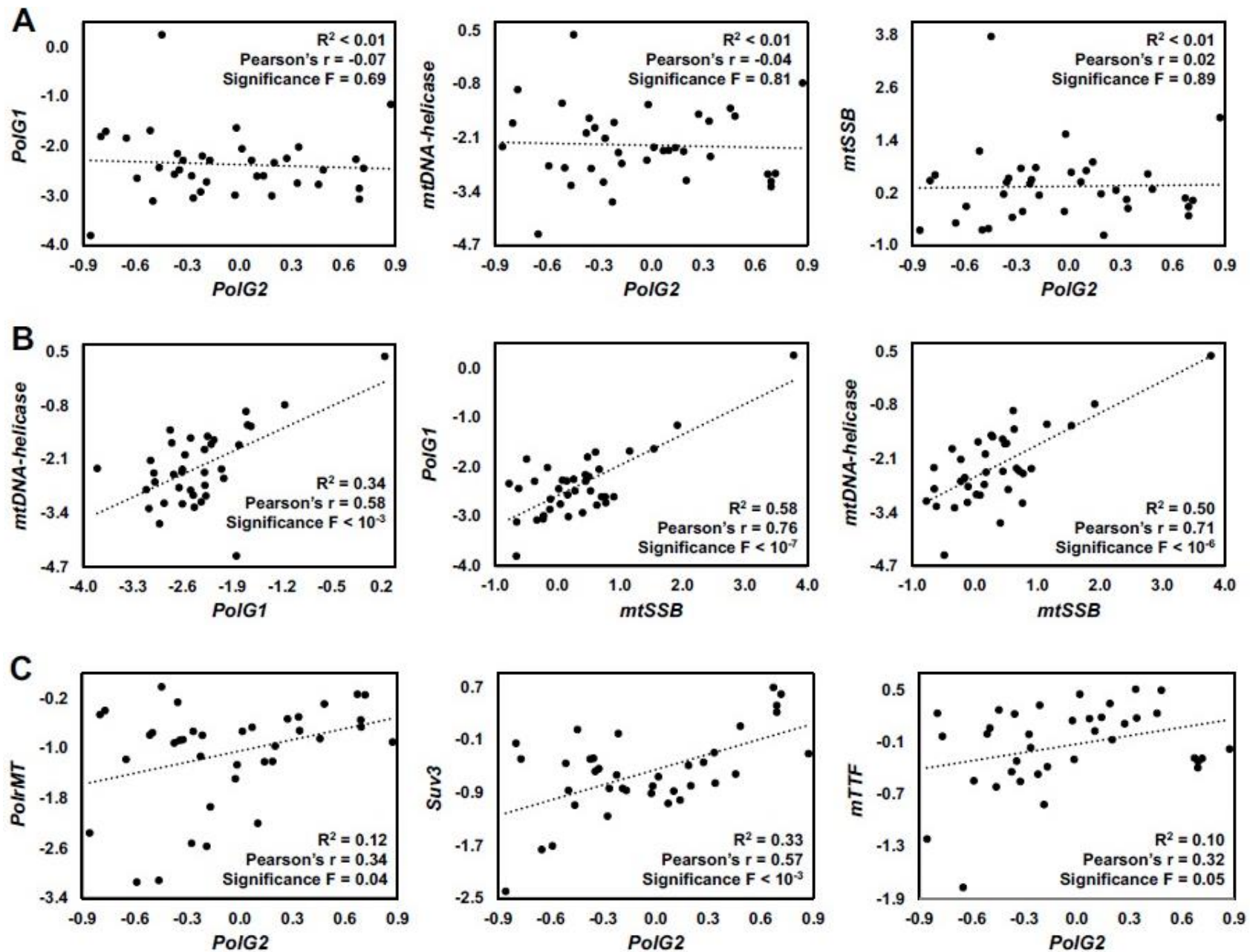
Figure 3. *PolG2* expression across *Drosophila* tissues correlates with mitochondrial RNA metabolism, and not mtDNA replisome genes. Lack of significant correlations between *PolG2* transcript levels and those of the indicated mtDNA replisome genes is shown in **A**. Significant

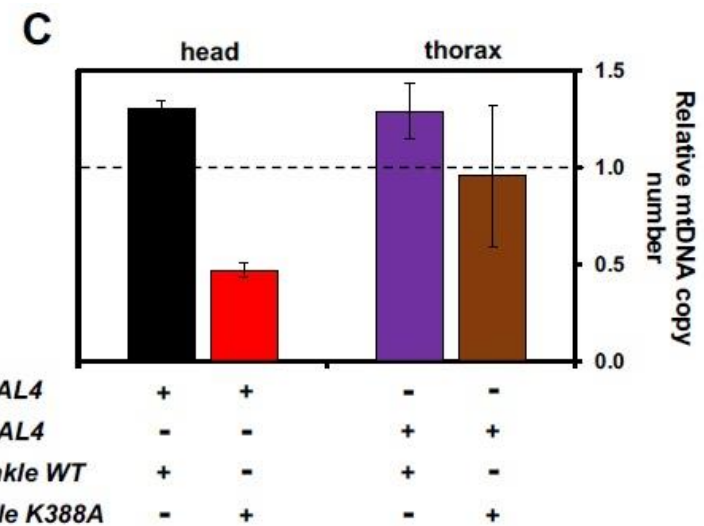
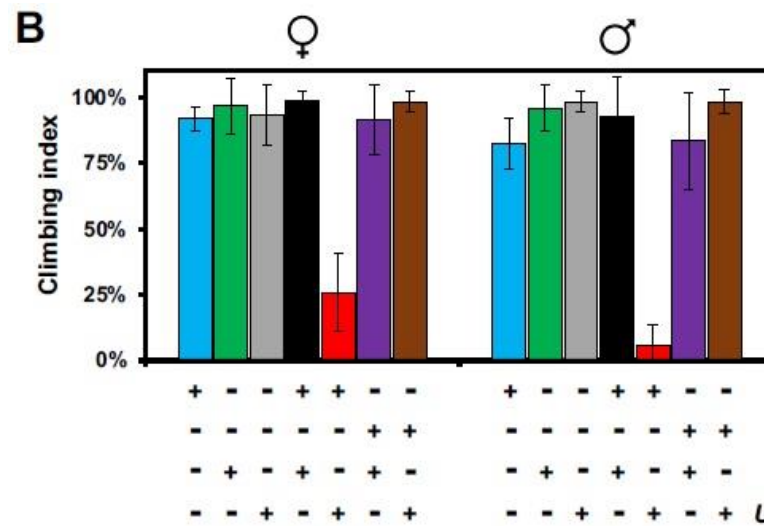
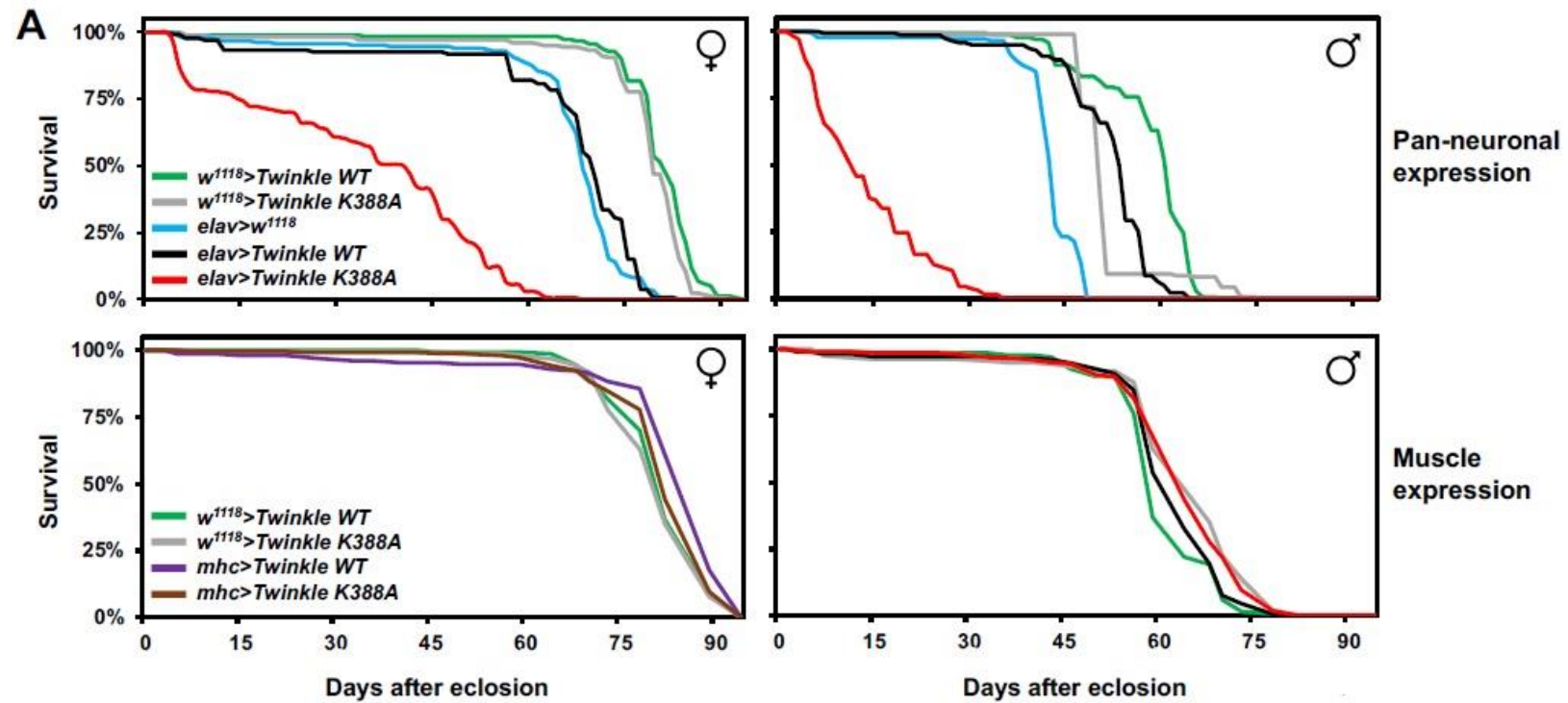
correlations among the transcript levels of the other mtDNA replisome genes, and between *PolG2* transcript levels and those of the indicated mitochondrial RNA metabolism genes are shown, respectively, in **B** and **C**. Transcript levels were obtained from FlyAtlas 2 (KRAUSE et al., 2022) and were processed as described in the Methods. The R^2 , Pearson's r and the significance F values were obtained from linear regression analyses performed using Microsoft Excel. Tissues from which expression levels were calculated are listed in Figure 2.

Figure 4. Twinkle dysfunction has distinct effects on the *Drosophila* nervous system and musculature. Lifespan (**A**), climbing (**B**) and quantitative PCR (**C**) assays were performed as described in the Methods, using flies or fly tissue extracts as indicated. mtDNA copy number of Twinkle overexpressors in **C** was respectively normalized by the levels in each control *UAS-Twinkle* line, which were arbitrarily set to 1.0 (indicated with dashed line).









Supplementary Material

Mitochondrial DNA maintenance in *Drosophila melanogaster*

Ana P. C. Rodrigues, Audrey C. Novaes, Grzegorz L. Ciesielski & Marcos T. Oliveira

Supplementary Tables

Supplementary Table 1. List of DNA repair proteins found in human mitochondria* and their homologues in *D. melanogaster*.

Product of the human gene (HGNC symbol)	<i>Drosophila</i> homologue	
	FlyBase symbol	FlyBase ID
<i>ALKBH1</i>	<i>AlkB</i>	FBgn0065035
<i>APEX1</i>	<i>Rrp1</i>	FBgn0004584
<i>APTX</i>	<i>CG5316</i>	FBgn0038704
<i>CDK1</i>	<i>Cdk1</i>	FBgn0004106
<i>DNA2</i>	<i>Dna2</i>	FBgn0288690
<i>EXD2</i>	<i>Exd2</i>	FBgn0037901
<i>FEN1</i>	<i>Fen1</i>	FBgn0025832
<i>FH</i>	<i>Fum1[£]</i>	FBgn0286222
	<i>Fum2</i>	FBgn0029890
<i>LIG3</i>	<i>DNAlig3[£]</i>	FBgn0286075
<i>MLH1</i>	<i>Mlh1</i>	FBgn0011659
<i>OGG1</i>	<i>Ogg1</i>	FBgn0027864
<i>PARK7</i>	<i>DJ-1β</i>	FBgn0039802
<i>PARP1</i>	<i>Parp</i>	FBgn0010247
<i>PIF1</i>	<i>Pif1</i>	FBgn0031540
<i>PNKP</i>	<i>PNKP</i>	FBgn0037578
<i>POLDIP2</i>	<i>POLDIP2[£]</i>	FBgn0037329
<i>POLG</i>	<i>PolG1[#]</i>	FBgn0004406
<i>POLG2</i>	<i>PolG2[#]</i>	FBgn0004407
<i>RAD51</i>	<i>spn-A</i>	FBgn0003479
<i>RAD51C</i>	<i>spn-D</i>	FBgn0003482
<i>RECQL4</i>	<i>RecQ4</i>	FBgn0040290
<i>RPS3</i>	<i>RpS3</i>	FBgn0002622
<i>RUVBL2</i>	<i>rept</i>	FBgn0040075
<i>SLC30A9</i>	<i>ZnT49B[£]</i>	FBgn0033762
<i>UBE2N</i>	<i>CG3473</i>	FBgn0028913
<i>VCP</i>	<i>TER94</i>	FBgn0286784
<i>XRCC3</i>	<i>spn-B</i>	FBgn0003480
<i>APEX2</i>	-	-
<i>BRCA1</i>	-	-
<i>ERCC6L2</i>	-	-
<i>ERCC8</i>	-	-
<i>FANCG</i>	-	-
<i>FOXM1</i>	-	-
<i>MGME1</i>	-	-
<i>MPG</i>	-	-
<i>MUTYH</i>	-	-
<i>NUDT1</i>	-	-

<i>PRIMPOL</i>	-	-
<i>TIGAR</i>	-	-
<i>UNG</i>	-	-

* according to (ALLKANJARI; BALDOCK, 2021).

[£] *in silico* prediction of at least one polypeptide product containing a mitochondrial targeting sequence, based on TargetP 2.0 analyses (ARMENTEROS et al., 2019).

mitochondrial localization empirically confirmed (WERNETTE; KAGUNI, 1986).

- indicates no gene with significant sequence similarity was found to characterize a true homologue with possible conserved function.

Supplementary Table 2. List of mitochondrial DNA maintenance genes of *D. melanogaster* for which tissue-specific transcript levels were used in this work.

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

Supplementary Table 3. Absolute transcript levels and estimated protein ratios^s of *PolG1* and *PolG2* across *Drosophila* tissues.

Tissues	<i>PolG1</i> [£]	<i>PolG2</i>	<i>PolG2</i> / <i>PolG1</i>	Estimated Pol γ - β / Pol γ - α
AM* accessory glands	0.88	6.80	7.73	7.73
AF brain	1.08	9.68	8.96	8.96
AM brain	1.27	9.75	7.68	7.68
L brain	2.45	10.02	4.09	4.09
AF carcass	1.93	6.71	3.48	3.48
AM carcass	1.19	7.31	6.14	6.14
L carcass	1.11	7.23	6.51	6.51
AF crop	1.25	8.28	6.62	6.62
AM crop	1.48	7.62	5.15	5.15
AF eye	1.84	9.46	5.14	5.14
AM eye	1.56	9.06	5.81	5.81
AF fat body	1.42	2.73	1.92	1.92
AM fat body	0.64	5.93	9.27	9.27
L fat body	1.90	9.54	5.02	5.02
L Garland cells	1.26	6.94	5.51	5.51
AF head	1.34	5.87	4.38	4.38
AM head	0.91	5.97	6.56	6.56
AF heart	3.83	6.58	1.72	1.72
AM heart	1.07	10.90	10.19	10.19
AF hindgut	1.20	9.35	7.79	7.79
AM hindgut	1.05	8.83	8.41	8.41
L hindgut	1.49	6.47	4.34	4.34
AF Malpighian tubules	1.46	6.65	4.55	4.55
AM Malpighian tubules	1.60	6.25	3.91	3.91
L Malpighian tubules	1.57	6.18	3.94	3.94
AF midgut	1.27	5.03	3.96	3.96
AM midgut	1.66	3.32	2.00	2.00
L midgut	1.25	5.23	4.18	4.18
AF ovary	6.13	3.78	0.62	0.62
AF rectal pad	0.84	7.62	9.07	9.07
AM rectal pad	0.89	6.96	7.82	7.82
AF salivary gland	2.04	4.58	2.25	2.25
AM salivary gland	1.05	7.23	6.89	6.89
L salivary gland	1.55	8.96	5.78	5.78
AF virgin spermatheca	0.84	3.54	4.21	4.21
AF mated spermatheca	0.86	4.89	5.69	5.69
AF TAG	1.15	13.45	11.70	11.70

AM TAG	1.06	14.41	13.59	13.59
AM testis	4.39	10.00	2.28	2.28
L trachea	1.93	5.93	3.07	3.07
average (+/- sd)	-	-	5.70 (+/- 2.81)	5.70 (+/- 2.81)
average – ovary	-	-	5.83 (+/- 2.73)	5.83 (+/- 2.73)

^{\$} estimations were based on the assumption that protein levels inside mitochondria are proportional to the transcript levels obtained from transcriptomic data. This information must be used with caution.

* abbreviations: AM, adult male; AF, adult female; L, larval; TAG, thoracicoabdominal ganglion; sd, standard deviation.

[£] transcript data is provided in FPKM, according to FlyAtlas 2 (KRAUSE et al., 2022).

Supplementary Table 4. Absolute transcript levels and estimated protein ratios^s of *PolG1* and *mtSSB* across *Drosophila* tissues.

Tissues	<i>PolG1</i> [£]	<i>mtSSB</i>	<i>mtSSB</i> / <i>PolG1</i>	<i>mtSSB</i> [#] / Pol γ
AM* accessory glands	0.88	7.82	8.89	2.22
AF brain	1.08	5.99	5.55	1.39
AM brain	1.27	6.48	5.10	1.28
L brain	2.45	20.69	8.44	2.11
AF carcass	1.93	11.72	6.07	1.52
AM carcass	1.19	6.59	5.54	1.38
L carcass	1.11	11.00	9.91	2.48
AF crop	1.25	14.04	11.23	2.81
AM crop	1.48	9.91	6.70	1.67
AF eye	1.84	6.69	3.64	0.91
AM eye	1.56	4.62	2.96	0.74
AF fat body	1.42	7.09	4.99	1.25
AM fat body	0.64	6.69	10.45	2.61
L fat body	1.90	19.60	10.32	2.58
L Garland cells	1.26	5.35	4.25	1.06
AF head	1.34	10.80	8.06	2.01
AM head	0.91	9.23	10.14	2.54
AF heart	3.83	12.67	3.31	0.83
AM heart	1.07	8.92	8.34	2.08
AF hindgut	1.20	8.16	6.80	1.70
AM hindgut	1.05	7.25	6.90	1.73
L hindgut	1.49	8.06	5.41	1.35
AF Malpighian tubules	1.46	9.68	6.63	1.66
AM Malpighian tubules	1.60	6.09	3.81	0.95
L Malpighian tubules	1.57	5.55	3.54	0.88
AF midgut	1.27	8.28	6.52	1.63
AM midgut	1.66	8.07	4.86	1.22
L midgut	1.25	7.31	5.85	1.46
AF ovary	6.13	70.81	11.55	2.89
AF rectal pad	0.84	7.57	9.01	2.25
AM rectal pad	0.89	6.07	6.82	1.71
AF salivary gland	2.04	14.56	7.14	1.78
AM salivary gland	1.05	7.45	7.10	1.77
L salivary gland	1.55	17.46	11.26	2.82
AF virgin spermatheca	0.84	5.56	6.62	1.65
AF mated spermatheca	0.86	4.87	5.66	1.42
AF TAG	1.15	7.67	6.67	1.67

AM TAG	1.06	7.12	6.72	1.68
AM testis	4.39	11.18	2.55	0.64
L trachea	1.93	17.46	9.05	2.26
average (+/- sd)	-	-	6.86 (+/- 2.42)	1.71 (+/- 0.61)
average – testis	-	-	6.97 (+/- 2.35)	1.74 (+/- 0.59)
average – testis and eye	-	-	7.17 (+/- 2.24)	1.79 (+/- 0.56)

[§] estimations were based on the assumption that protein levels inside mitochondria are proportional to the transcript levels obtained from transcriptomic data. This information must be used with caution.

* abbreviations: AM, adult male; AF, adult female; L, larval; TAG, thoracicoabdominal ganglion; sd, standard deviation.

[£] transcript data is provided in FPKM, according to FlyAtlas 2 (KRAUSE et al., 2022).

[#] considering functional mtSSB as a homotetrameric protein.

Supplementary Table 5. Absolute transcript levels and estimated protein ratios^s of *PolG1* and *mtDNA-helicase* across *Drosophila* tissues.

Tissues	<i>PolG1</i> [£]	<i>mtDNA-helicase</i>	<i>mtDNA-helicase</i> / <i>PolG1</i>	Estimated Pol γ / Twinkle [#]
AM* accessory glands	0.88	2.47	2.81	2.14
AF brain	1.08	0.76	0.70	8.53
AM brain	1.27	0.77	0.61	9.90
L brain	2.45	3.20	1.31	4.59
AF carcass	1.93	2.78	1.44	4.17
AM carcass	1.19	1.45	1.22	4.92
L carcass	1.11	1.28	1.15	5.20
AF crop	1.25	1.48	1.18	5.07
AM crop	1.48	1.37	0.93	6.48
AF eye	1.84	1.27	0.69	8.69
AM eye	1.56	0.90	0.58	10.40
AF fat body	1.42	2.43	1.71	3.51
AM fat body	0.64	1.66	2.59	2.31
L fat body	1.90	1.28	0.67	8.91
L Garland cells	1.26	1.43	1.13	5.29
AF head	1.34	1.04	0.78	7.73
AM head	0.91	0.56	0.62	9.75
AF heart	3.83	3.85	1.01	5.97
AM heart	1.07	2.25	2.10	2.85
AF hindgut	1.20	2.25	1.88	3.20
AM hindgut	1.05	2.16	2.06	2.92
L hindgut	1.49	1.09	0.73	8.20
AF Malpighian tubules	1.46	2.17	1.49	4.04
AM Malpighian tubules	1.60	2.16	1.35	4.44
L Malpighian tubules	1.57	0.89	0.57	10.58
AF midgut	1.27	1.75	1.38	4.35
AM midgut	1.66	1.73	1.04	5.76
L midgut	1.25	1.15	0.92	6.52
AF ovary	6.13	6.79	1.11	5.42
AF rectal pad	0.84	1.24	1.48	4.06
AM rectal pad	0.89	1.13	1.27	4.73
AF salivary gland	2.04	2.72	1.33	4.50
AM salivary gland	1.05	2.00	1.90	3.15
L salivary gland	1.55	1.85	1.19	5.03
AF virgin spermatheca	0.84	0.70	0.83	7.20
AF mated spermatheca	0.86	1.40	1.63	3.69

AF TAG	1.15	0.94	0.82	7.34
AM TAG	1.06	0.92	0.87	6.91
AM testis	4.39	0.73	0.17	36.08
L trachea	1.93	2.43	1.26	4.77
average (+/- sd)	-	-	1.21 (+/- 0.56)	6.48 (+/- 5.32)
average – testis	-	-	1.24 (+/- 0.54)	5.72 (+/- 2.32)
average – testis and AG	-	-	1.20 (+/- 0.48)	5.82 (+/- 2.27)

^{\$} estimations were based on the assumption that protein levels inside mitochondria are proportional to the transcript levels obtained from transcriptomic data. This information must be used with caution.

* abbreviations: AM, adult male; AF, adult female; L, larval; TAG, thoracicoabdominal ganglion; sd, standard deviation; AG, accessory gland.

[£] transcript data is provided in FPKM, according to FlyAtlas 2 (KRAUSE et al., 2022).

[#] considering functional Twinkle as a homohexameric protein.

Supplementary Figure Legends

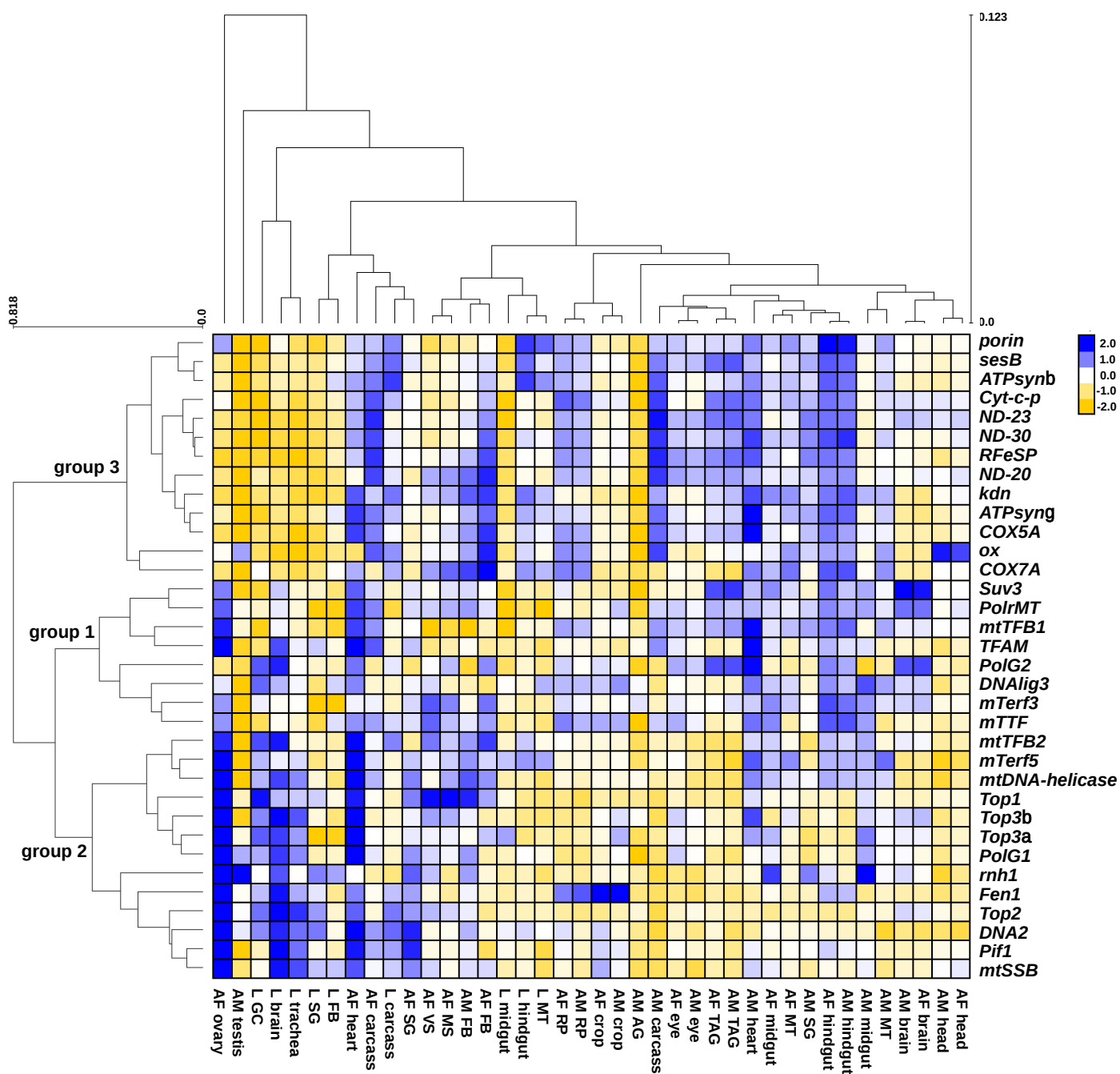
Supplementary Figure 1. Hierarchical cluster analysis of the relative expression levels of *Drosophila* mtDNA maintenance and other mitochondrial genes across different fly tissues. Transcript levels were obtained from FlyAtlas 2 (KRAUSE et al., 2022), processed as described in the Methods, and shown in the heatmap as $\log_2(\text{fold change})$. The analysis was performed using EXPANDER (HAIT et al., 2019). L, AM and AF indicate larval, adult male and female, respectively. The tissues sampled were as described in the legend to Figure 2. The FlyBase ID of group 3 genes are: *ATPsyn β* , FBgn0010217; *ATPsyn γ* , FBgn0020235; *COX5A*, FBgn0019624; *COX7A*, FBgn0040529; *Cyt-c-p*, FBgn0284248; *kdn*, FBgn0261955; *ND-20*, FBgn0030718; *ND-23*, FBgn0017567; *ND-30*, FBgn0266582; *ox*, FBgn0011227; *porin*, FBgn0004363; *RFeSP*, FBgn0021906; and *sesB*, FBgn0003360.

Supplementary Figure 2. Principal component analysis of the tissue-specific transcript data from *Drosophila* mtDNA maintenance genes. Transcript levels were obtained from FlyAtlas 2 (KRAUSE et al., 2022), processed as described in the Methods, and analyzed using EXPANDER (HAIT et al., 2019).

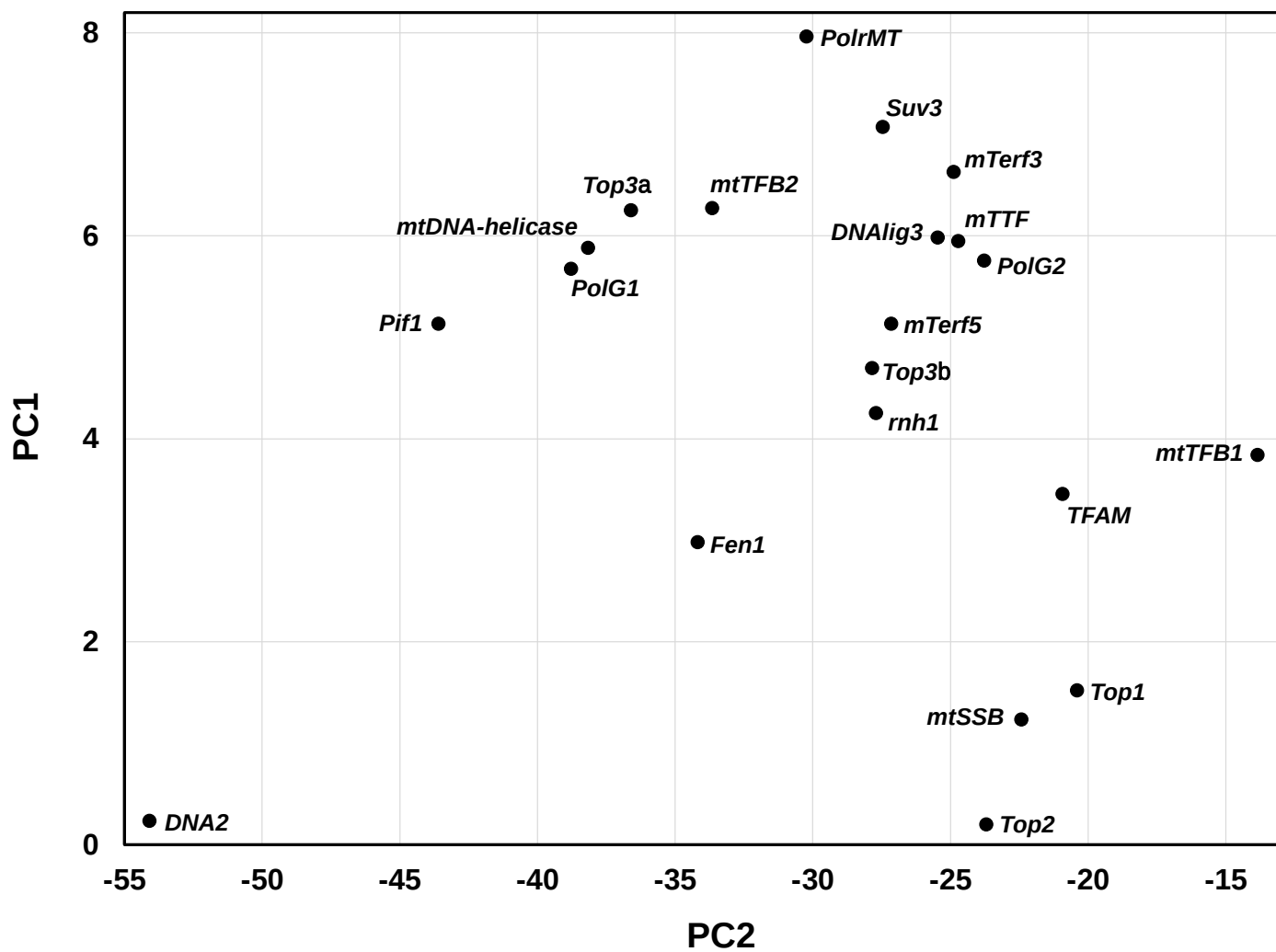
Supplementary Figure 3. *PolG2* expression across *Drosophila* tissues from the modENCODE project also correlates with mitochondrial RNA metabolism, and not mtDNA replisome genes. Lack of significant correlations between *PolG2* transcript levels and those of the indicated mtDNA replisome genes is shown in **A**. Significant correlations among the transcript levels of the other mtDNA replisome genes, and between *PolG2* transcript levels and those of the indicated mitochondrial RNA metabolism genes are shown, respectively, in **B** and **C**. Transcript levels were obtained from modENCODE (<http://www.modencode.org/>, (CONSORTIUM et al., 2011)) and were processed as described in the Methods. The R^2 ,

Pearson's r and the significance F values were obtained from linear regression analyses performed using Microsoft Excel. Because the log converted expression data of *PolrMT* was not normally distributed, Spearman's ρ was also calculated for the pairwise comparison with *PolG2* and is shown in the graph. Tissues from which expression levels were calculated were: accessory gland from 4-day old mated adult male; carcass from wandering L3 larva, 1-, 4- and 20-day old adult; central nervous system from L3 larva and P8 pupa; digestive system from wandering L3 larva, 1-, 4- and 20-day old adult; fat body, wandering L3 larva, white prepupa and P8 pupa; head from 1-, 4- and 20-day old virgin adult female; head from 1-, 4- and 20-day old mated adult female; head, 1-, 4- and 20-day old mated adult male; imaginal disc from wandering L3 larva; ovary from 4-day old virgin and mated adult female; salivary gland from wandering L3 larva and white prepupa; testis from 4-day old mated adult male.

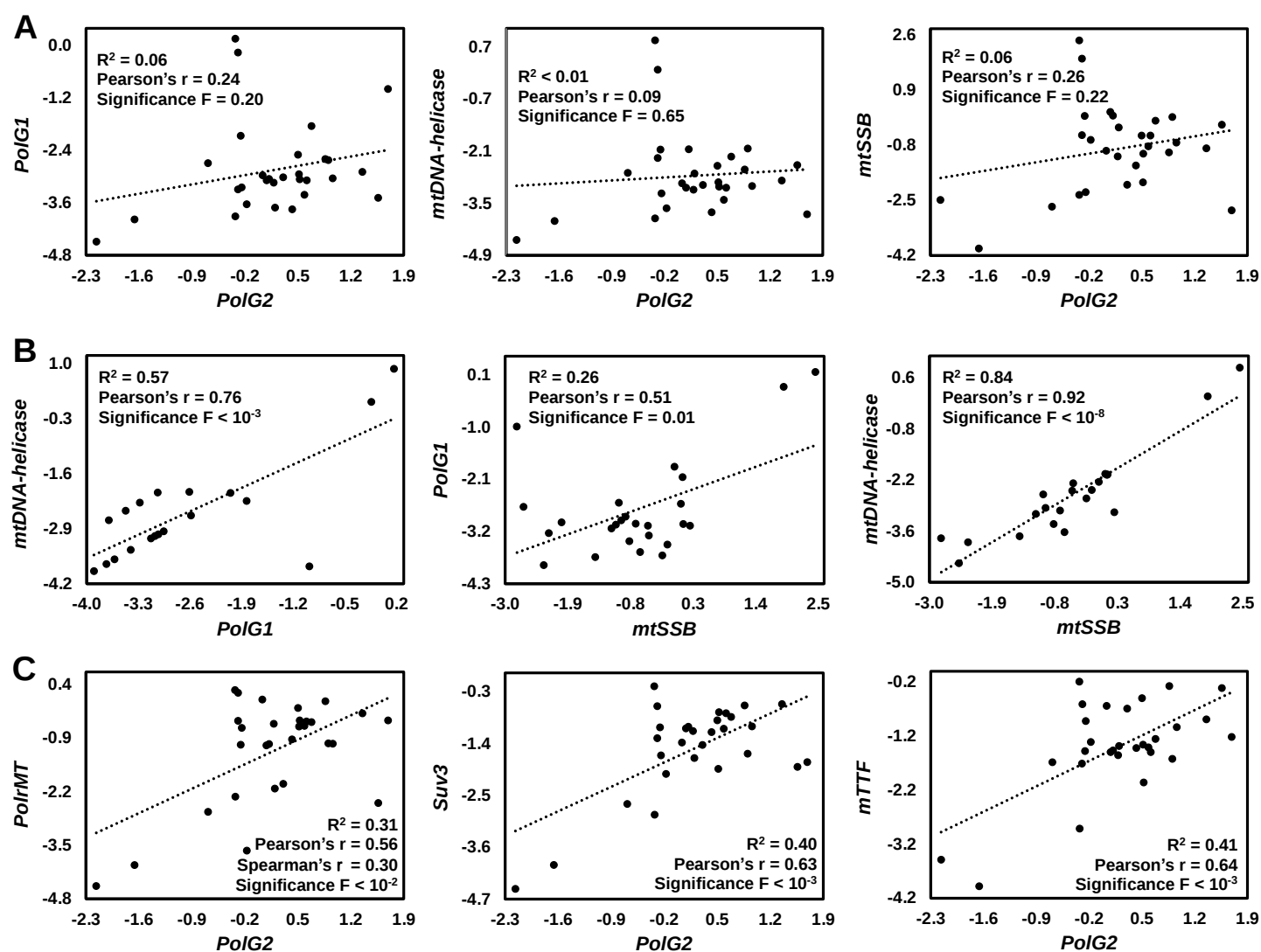
Supplementary Figure 4. Tissue-specific overexpression of Twinkle in flies. Pan-neuronal and muscle induction was respectively achieved as described in the Methods using the driver lines *elavGAL4* and *mhcGAL4*, and was confirmed via immunoblotting in crude mitochondrial extracts from adult heads (**A**) and thoraces (**B**) using the anti-Dm helicase antibody (MATSUSHIMA; KAGUNI, 2007b) to detect Twinkle. Levels of the alpha subunit of the ATP synthase complex (ATP5A) and the E1alpha subunit of the pyruvate dehydrogenase complex (PDH E1 α) were respectively used as loading controls in **A** and **B**. “cross reaction” in **B** indicates an unspecific signal from the anti-Dm helicase antibody detected in extracts from thorax or whole adult mitochondria (RODRIGUES et al., 2018; SANCHEZ-MARTINEZ et al., 2012). MW, molecular weight marker Precision Plus ProteinTM Standards (Bio-Rad, USA). **C**, pupal viability was calculated as the average ratio between the number of eclosed adult flies and the number of pupae per vial, as described in the Methods.



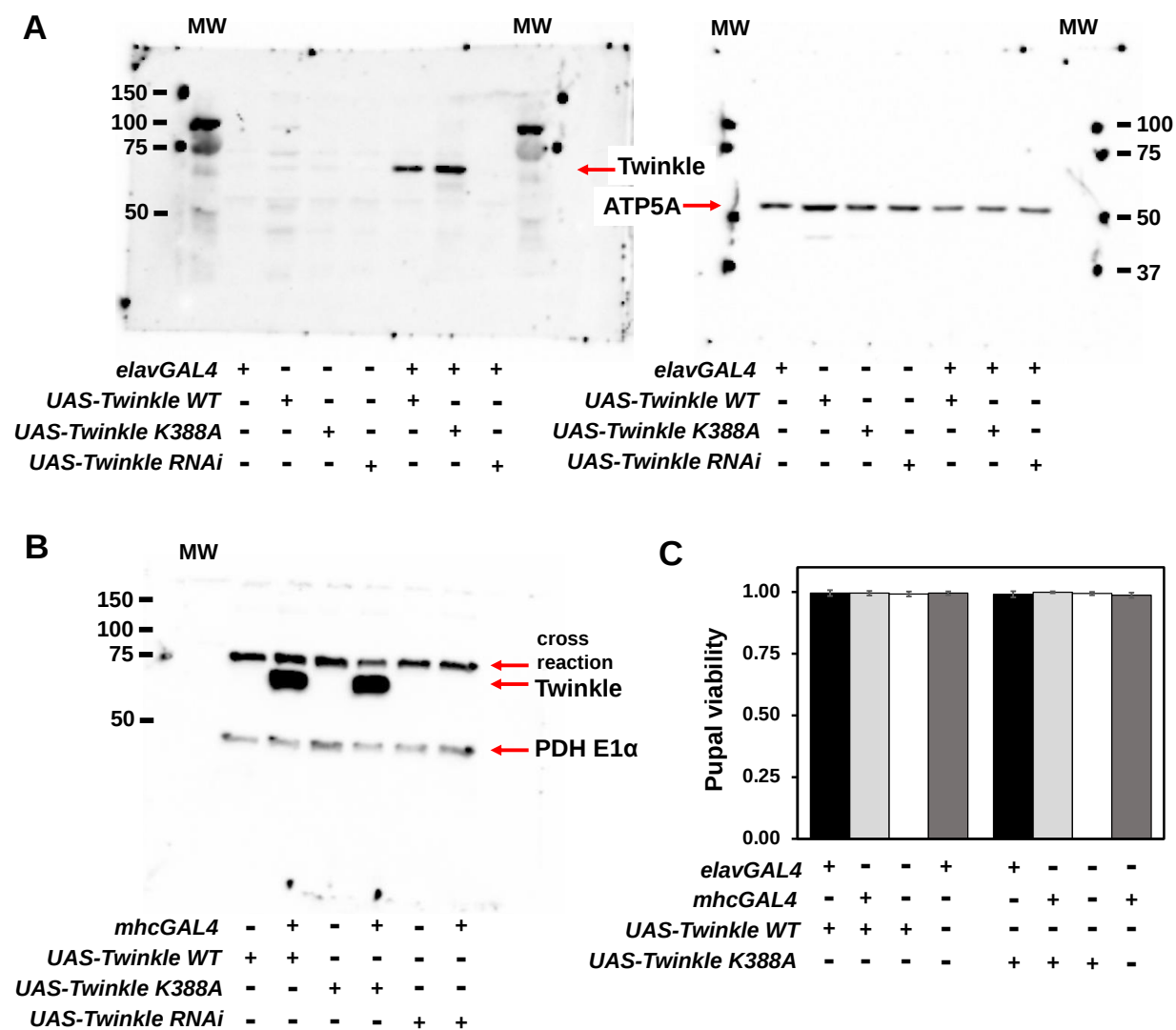
Supplementary Figure 1.



Supplementary Figure 2.



Supplementary Figure 3.



Supplementary Figure 4.

References

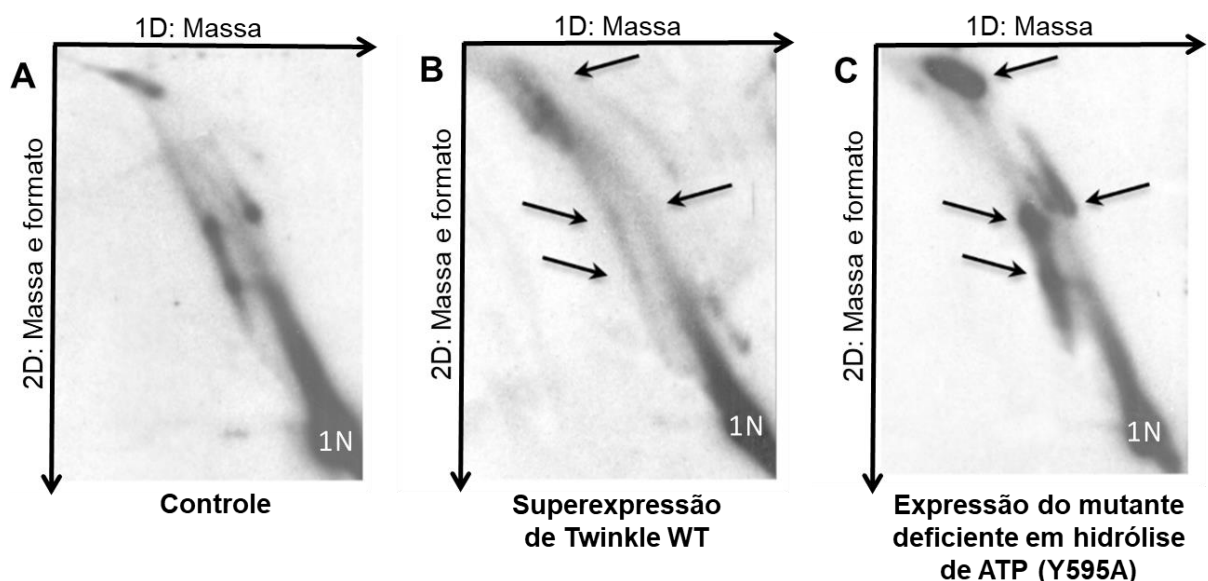
1. Allkanjari K, Baldock RA. Beyond base excision repair: An evolving picture of mitochondrial DNA repair. *Biosci Rep*. 2021;41(10):1–14. Available from: <https://doi.org/10.1042/BSR20211320>.
2. Armenteros JJA, Salvatore M, Emanuelsson O, Winther O, Von Heijne G, Elofsson A, et al. Detecting sequence signals in targeting peptides using deep learning. *Life Sci Alliance*. 2019;2(5):1–14. Available from: <https://doi.org/10.26508/lsa.201900429>.
3. Wernette CM, Kaguni LS. A mitochondrial DNA polymerase from embryos of *Drosophila melanogaster*. Purification, subunit structure, and partial characterization. *J Biol Chem*. 1986;261(31):14764–70. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)66938-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)66938-8).
4. Krause SA, Overend G, Dow JAT, Leader DP. FlyAtlas 2 in 2022: Enhancements to the *Drosophila melanogaster* expression atlas. *Nucleic Acids Res*. 2022;50(D1):D1010–5. Available from: <https://doi.org/10.1093/nar/gkab971>.
5. Hait TA, Maron-Katz A, Sagir D, Amar D, Ulitsky I, Linhart C, et al. The EXPANDER Integrated Platform for Transcriptome Analysis. *J Mol Biol*. 2019;431(13):2398–406. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.05.013>.
6. Roy S, Ernst J, Kharchenko P V, Kheradpour P, Negre N, et al. Identification of Functional Elements and Regulatory Circuits by *Drosophila* modENCODE. *Science*. 2011;330(6012):1787–97. Available from: <https://doi.org/10.1126/science.1198374>.
7. Matsushima Y, Kaguni LS. Differential Phenotypes of Active Site and Human Autosomal Dominant Progressive External Ophthalmoplegia Mutations in *Drosophila* Mitochondrial DNA Helicase Expressed in Schneider Cells. *J Biol Chem*. 2007;282(13):9436–9444. Available from: <https://doi.org/10.1074/jbc.M610550200>.
8. Sanchez-Martinez A, Calleja M, Peralta S, Matsushima Y, Hernandez-Sierra R,

- Whitworth AJ, et al. Modeling Pathogenic Mutations of Human Twinkle in *Drosophila* Suggests an Apoptosis Role in Response to Mitochondrial Defects. PLoS One. 2012;7(8):1–11. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043954>.
9. Rodrigues APC, Camargo AF, Andjelković A, Jacobs HT, Oliveira MT. Developmental arrest in *Drosophila melanogaster* caused by mitochondrial DNA replication defects cannot be rescued by the alternative oxidase. Sci Rep. 2018;8(1):1–10. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29150-x>.

ANEXO A – Intermediários da replicação do DNAm_t provenientes de células S2 de *D. melanogaster*

Resultado utilizando células Schneider S2 em cultura aplicadas à técnica de eletroforese bidimensional em gel de agarose (2D-NAGE) (Figura 1) (OLIVEIRA, 2011). São demonstrados os padrões dos intermediários da replicação (IRs) obtidos em diferentes tipos amostrais de Twinkle: (A) células controle, sem superexpressão de Twinkle; (B) sob indução de superexpressão de Twinkle WT; (C) Twinkle mutante no sítio de ATPase (Y595A).

Figura 1 - Intermediários da replicação (IRs) do genoma mitocondrial de células S2 de *D. melanogaster*. Após digestão com a enzima de restrição *EcoRV*, as amostras de DNAm_t submetidas à eletroforese de primeira dimensão (1D) tiveram seus fragmentos separados, no sentido da seta, segundo sua massa. Em seguida, os fragmentos passaram por eletroforese de segunda dimensão (2D), na qual a massa e o formato foram os critérios de separação dos fragmentos. Após hibridização com DNAm_t radioativo, os arcos característicos da técnica formados pelos IRs puderam ser observados em células S2 controle (A), em células superexpressando Twinkle tipo selvagem (B) e Twinkle deficiente em ATPase (C). As setas apontam para diminuição (B) ou aumento (C) dos IRs associados aos locais de pausa da replicação e aos sítios de ligação do DmTTF. 1N representa as moléculas de DNA não replicadas.



Fonte: Adaptado de OLIVEIRA, 2011, p. 158.