



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de São José do Rio Preto

Ana Paula Campos Rodrigues

Efeitos da expressão da oxidase alternativa em mutantes da  
helicase mitocondrial de *Drosophila melanogaster*

São José do Rio Preto  
2017

Ana Paula Campos Rodrigues

Efeitos da expressão da oxidase alternativa em mutantes da  
helicase mitocondrial de *Drosophila melanogaster*

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

Financiadora: FAPESP – Proc. 2015/14547-7

Orientador: Prof. Dr. Marcos Túlio de Oliveira

São José do Rio Preto  
2017

Rodrigues, Ana Paula Campos.

Efeitos da expressão da oxidase alternativa em mutantes da helicase mitocondrial de *Drosophila melanogaster* / Ana Paula Campos Rodrigues. -- São José do Rio Preto, 2017

71 f. : il., tabs.

Orientador: Marcos Túlio de Oliveira

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética. 2. Enzimas. 3. *Drosófila melanogaster* - Genética. 4. Oftalmoplegia externa progressiva crônica. 5. DNA mitocondrial. 6. Mutação (Genética) I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 575

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE  
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Ana Paula Campos Rodrigues

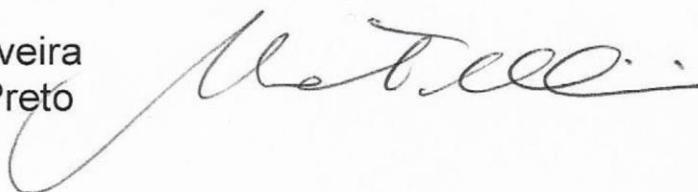
Efeitos da expressão da oxidase alternativa em mutantes da  
helicase mitocondrial de *Drosophila melanogaster*

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

Financiadora: FAPESP – Proc. 2015/14547-7

Comissão Examinadora

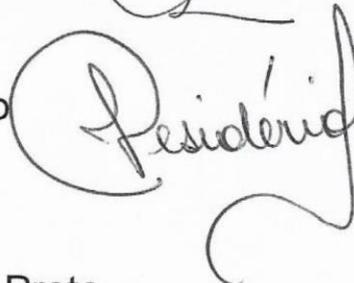
Prof. Dr. Marcos Túlio de Oliveira  
UNESP – São José do Rio Preto  
Orientador



Profa. Dra. Nadja Cristhina de Souza Pinto  
USP – São Paulo



Profa. Dra. Janete Aparecida Desidério  
UNESP – Jaboticabal



São José do Rio Preto  
25 de julho de 2017

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família por ser sempre meu abrigo e lugar de paz. À minha mãe, à minha irmã, ao meu pai e ao Luis por acreditarem no meu sonho junto a mim, por terem fornecido os meios para que eu pudesse aprofundar meus estudos e por serem meus exemplos de honestidade, sabedoria e amor.

Ao professor Marcos Túlio de Oliveira pela oportunidade, confiança e pelos diversos ensinamentos que levarei por toda a vida.

Agradeço aqueles que estão ou que já passaram pelo Laboratório de Biologia Mitocondrial: Marina, Geovana, Laíssa, Karina, André, Murilo, Ailton e Bruno. Toda a troca de conhecimentos, companheirismo, conselhos e momentos de alegria foram muito significativos. Em especial, ao doutorando e amigo André pela grande contribuição nos experimentos realizados, e também às amigas Marina e Geovana, por serem pessoas maravilhosas em minha vida.

Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas e à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias por serem *campi* de excelência, que vêm contribuindo para minha formação profissional desde 2011.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de estudo concedida.

À Andressa de Souza do Depto. de Medicina Veterinária Preventiva pelo auxílio na técnica de PCR em tempo real.

Agradeço às professoras participantes da banca de defesa: Dra. Nadja Cristhina de Souza Pinto e Dra. Janete Aparecida Desidério, cujas contribuições enriqueceram ainda mais minha visão acerca do tema de estudo.

Por fim, agradeço ao Ígor por todo companheirismo, aos amigos que fiz durante a graduação, em especial à Saúva e à Nathi, aos amigos do tempo de escola, aos grandes e verdadeiros professores que transformaram minha vida e a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

Mutações no gene nuclear humano *C10orf2*, que codifica a helicase mitocondrial Twinkle, são apontadas como causa da forma autossômica dominante da doença Oftalmoplegia Progressiva Externa (adPEO), associada a múltiplas deleções no DNA mitocondrial (DNAMt), e de outras doenças humanas. Duas mutações na Twinkle análogas àsquelas encontradas em pacientes humanos (W441C e A442P) e uma mutação no sítio ativo (K388A) foram modeladas em *Drosophila melanogaster*, levando a defeitos na replicação do DNA mitocondrial, danos no processo de fosforilação oxidativa (OXPHOS) e desordens no desenvolvimento. A expressão transgênica da oxidase alternativa mitocondrial (AOX) tem se mostrado eficiente em células animais no combate a disfunções mitocondriais causadas por defeitos genéticos, principalmente por contornar os complexos III e IV da cadeia respiratória (CR). Assim, o objetivo deste trabalho foi testar se a expressão da AOX poderia melhorar os efeitos deletérios causados por mutações na Twinkle no desenvolvimento de *D. melanogaster*. Dados fenotípicos mostraram que a expressão da AOX nos mutantes K388A e A422P da Twinkle foi incapaz de prevenir o fenótipo letal ainda em estágio larval ou pupal e também não alterou a depleção do DNAMt nessas moscas. Os mutantes W441C, na presença ou ausência da AOX, não tiveram problemas no desenvolvimento e nem mudanças no número de cópias de DNAMt. As linhagens superexpressando Twinkle tipo selvagem (WT) e AOX tiveram viabilidade normal e um aumento no número de cópias de DNAMt em adultos, não atribuído à presença da AOX. Ao medir a atividade de OXPHOS em tecidos não relacionados à metamorfose, prejuízos associados à expressão das Twinkles mutantes ou WT não foram detectados, nem alteração significativa pela presença da AOX. Portanto, nossos dados evidenciam que a utilização da AOX como estratégia de terapia gênica para remediar casos de mutações na Twinkle apresenta certas limitações e que talvez o papel da helicase mitocondrial na fisiologia animal seja bem mais complexo do que mostrado até então.

Palavras-chave: Twinkle. AOX. Disfunções mitocondriais. adPEO. *Drosophila melanogaster*.

## **ABSTRACT**

*Mutations in the human nuclear gene C10orf2, which encodes the mitochondrial replicative helicase Twinkle, are associated with cases of autosomal dominant Progressive External Ophthalmoplegia (adPEO) with multiple deletions in the mitochondrial DNA (mtDNA), and other diseases in humans. Two mutations analogous to those found in human patients (W441C and A442P) and an active site mutation (K388A) were modeled in Drosophila melanogaster. The expression of the mutant enzymes led to defects in mtDNA replication, impairment of mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS), and developmental disorders in flies. Transgenic expression of the mitochondrial alternative oxidase (AOX) has been shown to be efficient in animal cells in combatting mitochondrial dysfunctions caused by genetic defects, mainly due to the bypass of complex III and IV. Thus, our aim was to test whether AOX expression can rescue the deleterious developmental effects caused by Twinkle mutations in D. melanogaster. Phenotypic data has shown that AOX expression in Twinkle mutants K388A and A422P was unable to prevent the lethal phenotype at the larval or pupal stage, and AOX was not effective against the mtDNA depletion of these flies. The W441C mutants, in the presence or absence of AOX, did not show developmental problems, nor changes in mtDNA copy number. Lines overexpressing the wild-type Twinkle (WT) and AOX had normal viability, in addition to an increase in mtDNA copy number in adults, not attributed to AOX. By measuring OXPHOS activity in tissues unrelated to metamorphosis, we detected no dysfunctions associated with the expression of mutant or WT Twinkle, nor a significant alteration by the presence of AOX. Our data indicate that the use of AOX as a gene therapy strategy to help cases of Twinkle mutations has limitations, and that perhaps the role of the mitochondrial replicative helicase in animal physiology is much more complex than previously thought.*

**Keywords:** *Twinkle. AOX. Mitochondrial disorders. adPEO. Drosophila melanogaster.*

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Difosfato de adenosina
adPEO	Oftalmoplegia Progressiva Externa autossômica dominante
ANDH	NADH-desidrogenase alternativa
ANT	Adenina nucleotídeo translocase
AOX	Oxidase alternativa
ATP	Trifosfato de adenosina
CI	Complexo I
CII	Complexo II
CIII	Complexo III
CIV	Complexo IV
CR	Cadeia respiratória
CV	Complexo V
Pol $\gamma$	DNA polimerase $\gamma$
DNAmt	DNA mitocondrial
EIM	Espaço intermembrana
EMC	Extrato mitocondrial cru
IOSCA	Ataxia Espinocerebelosa de Início Infantil
L1	1º instar larval
L2	2º instar larval
L3	3º instar larval
MDS	Síndromes de Início Infantil associadas a Depleções do DNAmt
ME	Membrana externa da mitocôndria
MI	Membrana interna da mitocôndria
mRNA	RNA mensageiro
mtSSB	Proteína ligante a DNA simples-fita mitocondrial
OXPPOS	Fosforilação oxidativa
Pi	Fosfato inorgânico
Q	Ubiquinol/Ubiquinona
RITOLS	RNA incorporado ao longo da fita descontínua
ROS	Espécies reativas de oxigênio
rRNA	RNA ribossômico
tRNA	RNA transportador
UAS	<i>Upstream Activation Sequence</i>

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	11
2 OBJETIVO GERAL.....	14
2.1 Objetivos específicos .....	14
3 REVISÃO DE LITERATURA .....	15
3.1 Estrutura e função das mitocôndrias.....	15
3.2 Cadeia respiratória mitocondrial.....	18
3.3 DNA mitocondrial .....	19
3.3.2 Modelos de replicação do DNA mitocondrial .....	24
3.4 Doenças mitocondriais.....	26
3.5 Enzimas alternativas .....	27
3.6 <i>Drosophila melanogaster</i> como organismo modelo .....	30
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	32
4.1 Criação das linhagens de drosófilas carregando dois transgenes .....	32
4.2 Análise fenotípica por ensaios de desenvolvimento.....	34
4.3 Manutenção das linhagens experimentais em laboratório .....	35
4.4 Extração de DNA total.....	35
4.5 Quantificação do nível de DNAm <sub>t</sub> via PCR em tempo real .....	36
4.6 Preparação de extrato mitocondrial cru .....	36
4.7 Western blotting .....	36
4.8 Consumo de oxigênio mitocondrial .....	37
4.9 Análises estatísticas.....	38
5 RESULTADOS .....	39
5.1 Caracterização das linhagens <i>UAS-AOX</i> ; <i>UAS-Twinkle</i> .....	39
5.2 AOX não ajuda nos defeitos de desenvolvimento causados por mutantes da Twinkle.....	40

5.3 A quantidade relativa de DNAm <sub>t</sub> em mutantes da Twinkle não muda na presença de AOX.....	44
5.4 A respiração mitocondrial não é afetada pela superexpressão de Twinkle e nem pela atividade da AOX .....	49
6 DISCUSSÃO .....	53
7 CONCLUSÕES .....	58
REFERÊNCIAS.....	59
APÊNDICE .....	68

## 1 INTRODUÇÃO

A replicação do DNA mitocondrial (DNAMt) em animais é conduzida por um conjunto mínimo de três proteínas codificadas no genoma nuclear, que trabalham diretamente na forquilha de replicação, constituindo o chamado replissomo mitocondrial. À frente desta maquinaria, a helicase do DNAMt, também conhecida como Twinkle, transloca-se em uma das fitas do DNA no sentido 5'-3', hidrolisando trifosfato de adenosina (ATP) e promovendo a abertura do DNA dupla-fita parental. A DNA polimerase  $\gamma$  (Pol  $\gamma$ ) pode então promover a síntese de DNAMt *per se*, usando como molde o DNA simples-fita gerado pela ação da Twinkle. Este DNA simples-fita é protegido contra nucleólise através da ligação com a proteína ligante a DNA simples-fita mitocondrial (mtSSB), que também é responsável por coordenar as funções da Twinkle e da Pol  $\gamma$  (revisado em MCKINNEY; OLIVEIRA, 2013; OLIVEIRA; KAGUNI, 2010).

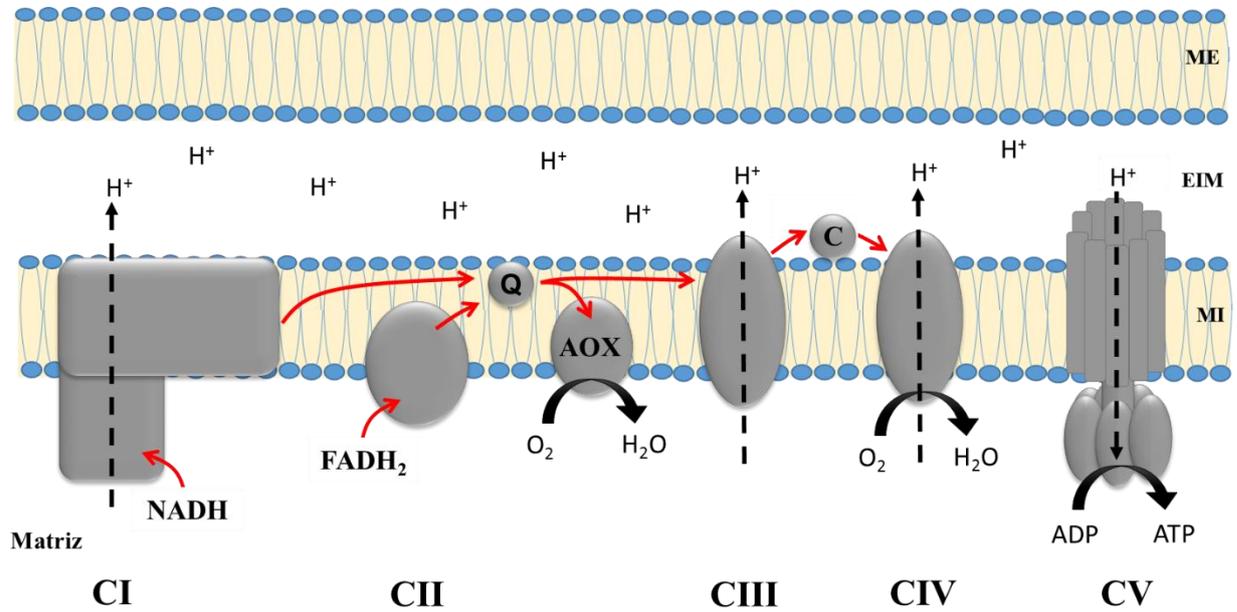
Mutações no gene humano *C10orf2*, que codifica a Twinkle, foram pela primeira vez descritas em 2001 como causa da forma autossômica dominante da Oftalmoplegia Progressiva Externa (adPEO) associada a múltiplas deleções no DNAMt de pacientes (SPELBRINK et al., 2001). Atualmente, há mais de 40 mutações identificadas neste gene que estão associadas a diversas doenças neurodegenerativas, tais como a Síndrome de Perrault, Ataxia Espinocerebelosa de Início Infantil (IOSCA), Epilepsia, Síndromes de Início Infantil associadas a Depleções do DNAMt (MDS) e Tubulopatia Renal (FERNANDÉZ-MILLÁN et al., 2015). Muitas das mutações encontradas no gene da Twinkle já foram testadas bioquimicamente e/ou em células em cultura, mas apenas algumas foram selecionadas para serem expressas em animais modelos transgênicos e avaliadas de um ponto de vista fisiológico mais completo (SANCHEZ-MARTINEZ et al., 2012; TYYNISMAA et al., 2005). Por exemplo, linhagens de *Drosophila melanogaster* que expressam os mutantes da Twinkle K388A, W441C e A442P apresentaram diferentes graus de severidade em relação à redução do nível de DNAMt, mau funcionamento da cadeia respiratória (CR), aumento da apoptose e letalidade (SANCHEZ-MARTINEZ et al., 2012), constituindo-se um modelo interessante para o entendimento das disfunções associadas a estas mutações.

A expressão da oxidase alternativa (AOX) proveniente do tunicado *Ciona intestinalis* (Ascidiacea) em modelos experimentais tem ajudado a provar a premissa

de que a adição de uma via alternativa de transporte de elétrons na mitocôndria pode ser eficaz no combate a doenças de causa mitocondrial. Isso se deve ao fato da AOX poder realizar a oxidação do ubiquinol a ubiquinona e a redução coordenada do oxigênio molecular a água, contornando então os complexos III e IV da CR (Figura 1). Desse modo, estudos propõem a aplicação da AOX como forma de terapia gênica para doenças mitocondriais, baseados na demonstração de que esta enzima melhora consideravelmente os diversos fenótipos associados a deficiências do complexo IV da CR em drosófila (KEMPPAINEN et al., 2014a) e células humanas em cultura (DASSA et al., 2009; HAKKAART et al., 2005). Além disso, a AOX pode remediar defeitos locomotores de moscas-modelo da doença de Parkinson (mutante do gene *dj-1β*) (FERNANDEZ-AYALA et al., 2009) e disfunções mitocondriais e neurodegenerativas causadas por falhas na replicação do DNAm devido ao *knockdown* da Pol  $\gamma$  (HUMPHREY et al., 2012) ou pela produção de  $\beta$ -amilóide em modelos experimentais do mal de Alzheimer (EL-KHOURY et al., 2016).

Problemas de replicação do DNAm geram uma depleção das subunidades dos complexos da CR que são codificadas no DNAm, acarretando assim uma diminuição na produção de ATP e um aumento significativo na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (OLIVEIRA; GARESSE; KAGUNI, 2010). Se os complexos III ou IV possuem defeitos genéticos (como aqueles causados por Twinkle mutantes), os elétrons podem ser transferidos diretamente para o oxigênio molecular formando ROS em abundância. Se AOX estiver presente, estes elétrons podem simplesmente entrar em uma nova rota que leva à redução coordenada do oxigênio molecular, evitando a formação abundante de ROS. A via alternativa de transporte de elétrons introduzida pela AOX fornece então uma válvula de escape que ameniza os efeitos deletérios da elevada produção de ROS.

Figura 1 – Reprodução esquemática da CR mitocondrial e a via adicional de transporte de elétrons fornecida pela oxidase alternativa (AOX). O destino dos elétrons provenientes do NADH e FADH<sub>2</sub> é indicado por setas vermelhas. CI-V representam complexos I-V; Q, ubiquinol (forma reduzida da ubiquinona); C, citocromo c; ME, membrana externa da mitocôndria; MI, membrana interna da mitocôndria; EIM, espaço intermembrana.



Fonte: Elaborada pelo autor.

## **2 OBJETIVO GERAL**

O objetivo do presente projeto de mestrado foi testar se a expressão da AOX pode aliviar ou neutralizar os efeitos negativos causados por mutantes da Twinkle no desenvolvimento de *D. melanogaster*.

### **2.1 Objetivos específicos**

Os objetivos específicos foram: (1) analisar fenotipicamente por meio de ensaios de desenvolvimento e (2) bioquimicamente através de respirometria de alta resolução linhagens de drosófila que expressam no mesmo indivíduo as formas mutantes da Twinkle e a AOX; e (3) avaliar a quantidade relativa de DNAmT nessas linhagens via PCR quantitativo.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

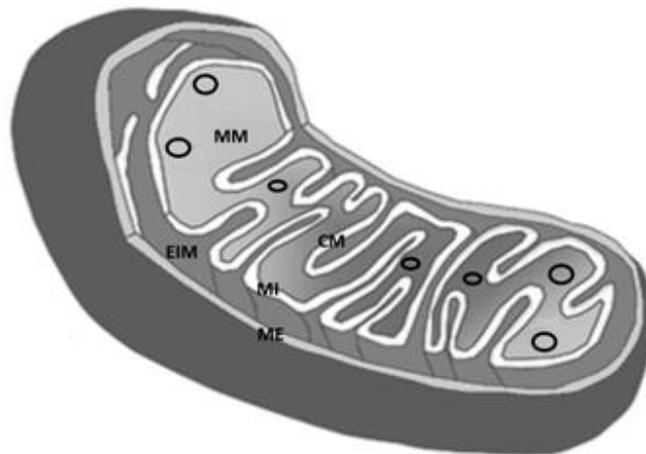
#### 3.1 Estrutura e função das mitocôndrias

No final do século XIX, o pesquisador Richard Altmann reconheceu pela primeira vez a ocorrência ubíqua de estruturas no interior do citoplasma, as quais foram denominadas por ele como “bioblastos”. Segundo Altmann, tais estruturas eram semelhantes a “organismos elementares”, cuja contribuição teria papel vital para a célula (ERNSTER; SCHATZ, 1981). Posteriormente, Carl Benda remeteu-se à aparência dessas organelas durante a espermatogênese para nomeá-las com o termo de origem grega “mitocôndria”, que significa: “estruturas em grânulos ou filamentos” (BERNARD et al., 2007; GIEZEN, 2011). As ideias de Altmann foram revividas por Lynn Margulis no século XX, vinculadas à proposta da teoria endossimbiótica. O conceito reúne evidências de que o surgimento das mitocôndrias teria ocorrido há cerca de 2 bilhões de anos, através do englobamento de uma  $\alpha$ -proteobactéria por uma célula ancestral precursora às eucarióticas. A relação estável e positiva entre ambos os organismos envolvidos explicaria o surgimento das mitocôndrias em células eucarióticas, abrangendo desde fungos e protozoários basais, a plantas e animais complexos. Tal interação teria disponibilizado a energia necessária para o surgimento das variações evolutivas encontradas nos eucariotos, nos quais podem-se caracterizar organismos multicelulares, assim como tecidos e células altamente especializadas (revisado em GUSTAFSSON; FALKENBERG; LARSSON, 2016; LANE; MARTIN, 2010). Embora inúmeras mudanças tenham ocorrido ao longo da evolução, principalmente no que tange à forma e função mitocondrial, o compartilhamento de algumas características entre eucariotos e procariotos serviram como principais bases para a elaboração da teoria (FRIEDMAN; NUNNARI, 2014).

As mitocôndrias são compostas por dois compartimentos distintos (matriz mitocondrial e espaço intermembrana) cercados por dupla membrana (membrana mitocondrial externa e membrana mitocondrial interna) (Figura 2) (NELSON; COX, 2014; PIMENTEL, 2013). A membrana externa possui diversos poros ao longo de sua constituição, os quais a confere alta permeabilidade a moléculas pequenas (até 10 kDa) e a íons, que são capazes de migrar do citoplasma para o interior da organela ou vice-versa. Seus poros são formados pela família de proteínas integrais

de membrana denominadas “porinas” (NELSON; COX, 2014). A entrada de substratos através da membrana interna é mediada por diversos transportadores específicos, tais como carreadores de ânions e cátions. Logo, a membrana interna possui maior seletividade quando comparada à externa, permitindo basicamente a livre passagem de  $O_2$ ,  $CO_2$  e água, além de outras pequenas moléculas por transporte ativo (SOUZA, 2005). A diferença funcional observada entre as duas membranas mitocondriais é consequência direta de sua composição bioquímica: a membrana externa possui 50% de lipídios e 50% de proteínas, enquanto na membrana interna há somente 20% de lipídeos e 80% de proteínas, conferindo-a seletividade (PIMENTEL, 2013).

Figura 2 – Esquema simplificado da mitocôndria. MI: membrana interna. ME: membrana externa; EIM: espaço intermembrana; CM: crista mitocondrial; MM: matriz mitocondrial. Círculos imersos na matriz mitocondrial representam o DNAm.



Fonte: Adaptado de MCKINNEY; OLIVEIRA, 2013, p. 309.

Invaginações no sentido da matriz mitocondrial são observadas na membrana interna, e são conhecidas como “cristas mitocondriais”. Estas são estabilizadas por dimerização ou multimerização do complexo ATP-sintase. Nas regiões de crista, encontram-se proteínas integrais de membrana que são os grandes complexos da CR (FREY; MANNELLA, 2000; FRIEDMAN; NUNNARI, 2014) (ver item 3.2). O espaço delimitado entre as membranas externa e interna é denominado espaço intermembrana, essencial para a formação do gradiente eletroquímico durante o processo de fosforilação oxidativa (OXPHOS) (NELSON; COX, 2014) (ver item 3.2). A matriz mitocondrial, delimitada pela membrana interna, é o local onde se encontra o DNAm, herdado matematicamente, além das enzimas do ciclo de Krebs, da  $\beta$ -

oxidação, RNAs transportadores (tRNAs), RNAs mensageiros (mRNAs), RNAs ribossômicos (rRNAs), chaperonas e, por fim, proteínas constituintes da maquinaria replicativa do DNAmt (NELSON; COX, 2014; SOUZA, 2005).

As mitocôndrias podem variar tanto em tamanho quanto em morfologia entre os diferentes tecidos. Podem ser mais alongadas, como nos túbulos de Malpighi e glândulas salivares de insetos, ou mais arredondadas, como no caso do intestino e fígado de mamíferos (PIMENTEL, 2013). Além disso, foi demonstrado que a membrana mitocondrial interna passa por mudanças conformacionais segundo o gradiente osmótico que a circunda ou mudanças metabólicas (FREY; MANNELLA, 2000). Em outras palavras, mitocôndrias isoladas podem adquirir conformação “condensada”, isto é, a membrana interna se afasta da membrana externa, com isso, a matriz mitocondrial se contrai. Em contrapartida, mitocôndrias *in situ* estão frequentemente na conformação “ortodoxa”, em que há grande volume de matriz mitocondrial e a membrana interna está próxima à externa, com um pequeno espaço intermembrana (FREY; MANNELLA, 2000; SCALETTAR; ABNEY; HACKENBROCK, 1991). Desse modo, as mitocôndrias possuem potencial para se ajustarem às demandas energéticas do meio que a circunda, uma vez que pode haver aumento ou não da superfície de contato entre a matriz e as cristas mitocondriais.

Um dos papéis primordiais das mitocôndrias é a geração de energia na forma de ATP, moeda energética celular, a partir dos produtos da oxidação completa de carboidratos, proteínas e lipídeos advindos da dieta de organismos aeróbios (NELSON; COX, 2014). Entretanto, estas organelas também participam de outros processos vitais, tais como: morte celular programada (apoptose), sinalização intracelular, sinalização de cálcio, produção de intermediários em diversas vias (ciclo de Krebs, ciclo da ureia,  $\beta$  oxidação de ácidos graxos), metabolismo de aminoácidos, lipídeos, colesterol, nucleotídeos, entre outros (CHINNERY, 2006; MCKINNEY; OLIVEIRA, 2013).

As mitocôndrias são as maiores geradoras de espécies reativas de oxigênio (ROS) dentro da célula animal. De todo o  $O_2$  que o organismo aeróbico consome, de 80 a 95% é destinado ao processo de OXPHOS e cerca de 0.2 a 2% dessa porcentagem é convertido em ROS pelas mitocôndrias, principalmente na forma de ânions superóxido (HARPER et al., 2004). A função das ROS ainda é controversa, pois, ao passo que em baixas concentrações atuam na sinalização celular, em grandes concentrações causam sérios danos ao DNA nuclear, mitocondrial e em

outras biomoléculas, estando relacionadas a uma série de doenças humanas (HARPER et al., 2004).

### 3.2 Cadeia respiratória mitocondrial

A cadeia respiratória (CR), também conhecida como cadeia transportadora de elétrons, é um grupo formado por cinco complexos multienzimáticos inseridos na membrana mitocondrial interna (Figura 1) (CHINNERY; SCHON, 2003). De modo geral, o processo de OXPHOS é responsável pela síntese de grande parte do ATP utilizado pelos organismos aeróbios. Os carreadores de elétrons NADH e FADH<sub>2</sub>, provenientes da oxidação de carboidratos, proteínas e lipídeos a partir do ciclo de Krebs e da β-oxidação, chegam, respectivamente, nos complexos I e II da CR (CHINNERY, 2006). O complexo I (CI) (NADH-ubiquinona oxidoredutase) possui 42 polipeptídios, sendo o maior dentre os cinco complexos. O par de elétrons ricos em energia que reduzem o CI são provenientes da oxidação do cofator NADH a NAD<sup>+</sup>. Com isso, o CI torna-se ativo para o bombeamento de quatro prótons através da membrana interna para o espaço intermembrana. Além disso, ocorre também a catálise da transferência de elétrons para a ubiquinona (denominada ubiquinol, quando em estado reduzido). Esses elétrons seguirão para os complexos III e IV, onde serão utilizados para reduzir oxigênio molecular a água, juntamente com a utilização de prótons provenientes da matriz mitocondrial (NELSON; COX, 2014; revisado em SAZANOV, 2015).

O complexo II (CII) (succinato-desidrogenase) é formado por quatro subunidades proteicas (A, B, C e D), sendo duas inseridas na membrana interna (C e D) e duas voltadas para a matriz mitocondrial (A e B). Este complexo fornece uma porta de entrada a mais a elétrons energéticos na CR. Isso porque ele participa diretamente de uma das etapas do ciclo de Krebs, oxidando o substrato succinato e reduzindo o centro FAD (que constitui o CII) a FADH<sub>2</sub>. Desse modo, os elétrons provenientes da oxidação do FADH<sub>2</sub> a FAD serão transferidos para a ubiquinona, assim como ocorre no CI, e seguirão fornecendo energia aos demais complexos da CR. Diferentemente dos complexos I, III e IV, o CII não bombeia prótons através da membrana interna (NELSON; COX, 2014; SAZANOV, 2015).

O CIII (citocromo bc<sub>1</sub>) catalisa a oxidação do ubiquinol à ubiquinona, transferindo os elétrons provenientes dos CI e CII ao citocromo c, ao passo que

também realiza o bombeamento de quatro prótons para o espaço intermembrana. O complexo IV (CIV, citocromo c oxidase) é responsável por transferir os elétrons do citocromo c para o aceptor final de elétrons da CR, o oxigênio molecular, que será reduzido a água na matriz mitocondrial. Os elétrons passam por três centros ativos dentro do CIV responsáveis por realizar reações de óxido-redução e catalisar a formação da molécula de água. A energia produzida pelas reações redox é utilizada para bombear um próton para o espaço intermembrana. O saldo final de todo este bombeamento de prótons até o espaço intermembrana acarreta na formação do gradiente eletroquímico, isto é, diferença na concentração de prótons entre a face da membrana interna voltada para o espaço intermembrana e para a matriz mitocondrial (NELSON; COX, 2014; SAZANOV, 2015).

Por fim, o complexo V (ATP-sintase) acopla o fluxo de prótons do espaço intermembrana para a matriz mitocondrial à fosforilação do difosfato de adenosina (ADP) em ATP (utilizando fosfato inorgânico - Pi). A chegada do Pi na matriz mitocondrial é mediada pelo co-transporte pela proteína fosfato translocase, presente na membrana interna da mitocôndria (NELSON; COX, 2014). Através da proteína translocadora antiporte ANT (adenina nucleotídeo translocase), o ATP formado na matriz ultrapassa a membrana mitocondrial interna e chega aos outros compartimentos celulares, ao passo que o ADP é levado à matriz (CHINNERY; SCHON, 2003). A síntese de ATP é dependente do funcionamento correto e acoplado de todos os complexos da CR, ou seja, do bombeamento de prótons pelos complexos, do fluxo de elétrons provenientes da oxidação dos alimentos ingeridos, bem como da síntese da molécula de água pelo CIV. Qualquer dano aos complexos que impeça sua função esperada pode acarretar em diminuição da afinidade bioquímica entre estes e os carregadores de elétrons (ubiquinona e citocromo c), bem como na formação excessiva de ROS prejudiciais à célula.

### **3.3 DNA mitocondrial**

As mitocôndrias são organelas singulares por serem as únicas dentro da célula animal que possuem uma molécula de DNA independente do genoma nuclear, com maquinaria replicativa própria (CIESIELSKI; OLIVEIRA; KAGUNI, 2016). O DNAm localiza-se próximo à membrana interna da mitocôndria, dentro de estruturas denominadas nucleóides, havendo uma estreita relação entre seu

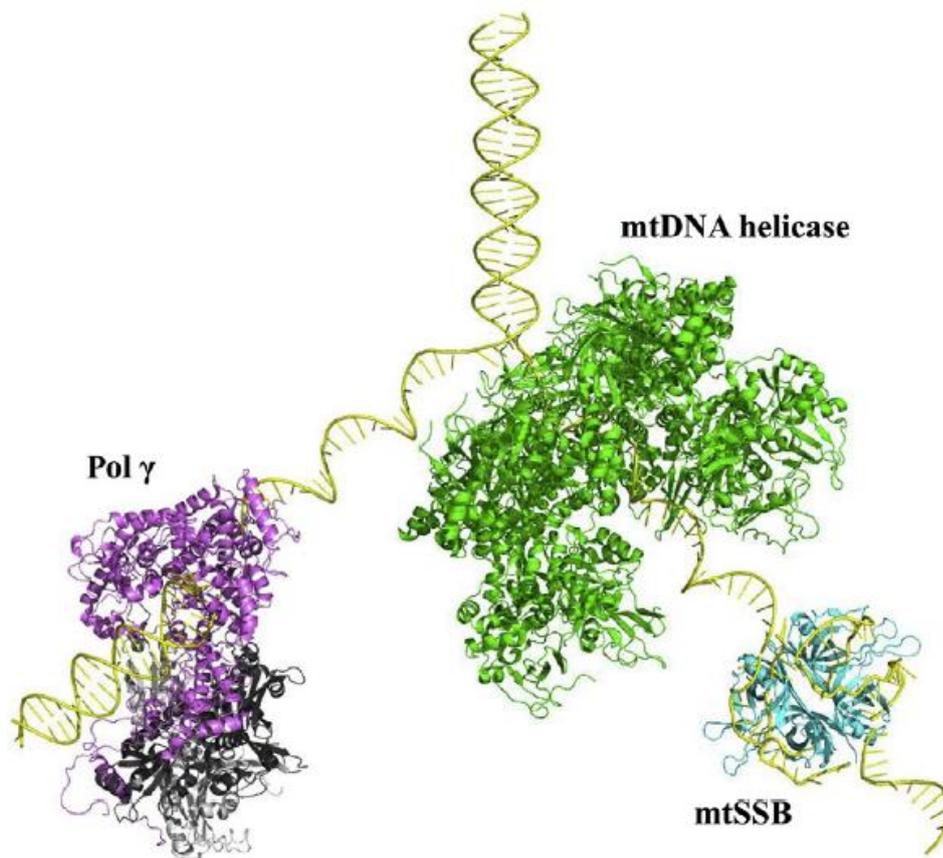
posicionamento e a existência de uma CR funcional. Uma das hipóteses para explicar tal proximidade refere-se à regulação local da expressão gênica sobre este DNA exercida pela mudança do potencial de membrana e/ou pelo estado de óxido-redução criados pela OXPHOS (GUSTAFSSON; FALKENBERG; LARSSON, 2016).

De modo geral, o DNAmT de animais é uma molécula circular dupla-fita compacta de aproximadamente 16 kb, composta por 37 genes. É responsável por codificar 13 proteínas essenciais ao funcionamento correto da CR, dois rRNAs e 22 tRNAs. O sistema OXPHOS é formado por cerca de 90 polipeptídios codificados pelo genoma nuclear e mitocondrial. Assim, estas proteínas podem ser traduzidas tanto nos ribossomos citosólicos quanto naqueles presentes na matriz mitocondrial (GUSTAFSSON; FALKENBERG; LARSSON, 2016; SPINAZZOLA; ZEVIANI, 2005). O DNAmT contribui com sete subunidades do CI da CR (ND1-6, e ND4L); uma subunidade do CIII (citocromo b); três do CIV (COX1-3); e duas da ATP-sintase (ATPase 6 e 8) (Figura 3). O CII é codificado inteiramente pelo genoma nuclear (SOUZA, 2005; ZEVIANI; DONATO, 2004). Embora o DNAmT codifique uma minoria das proteínas constituintes da CR, estas constituem subunidades centrais para o funcionamento dos complexos e mostram-se essenciais, pois, quando na ausência da expressão do DNAmT em camundongos, por exemplo, há falha grave na OXPHOS e inviabilidade dos organismos (LARSSON et al., 1998). Acredita-se que existam aproximadamente 1.200 proteínas diferentes nas mitocôndrias, sendo diversas delas necessárias à replicação, manutenção e expressão do DNAmT (GUSTAFSSON; FALKENBERG; LARSSON, 2016).



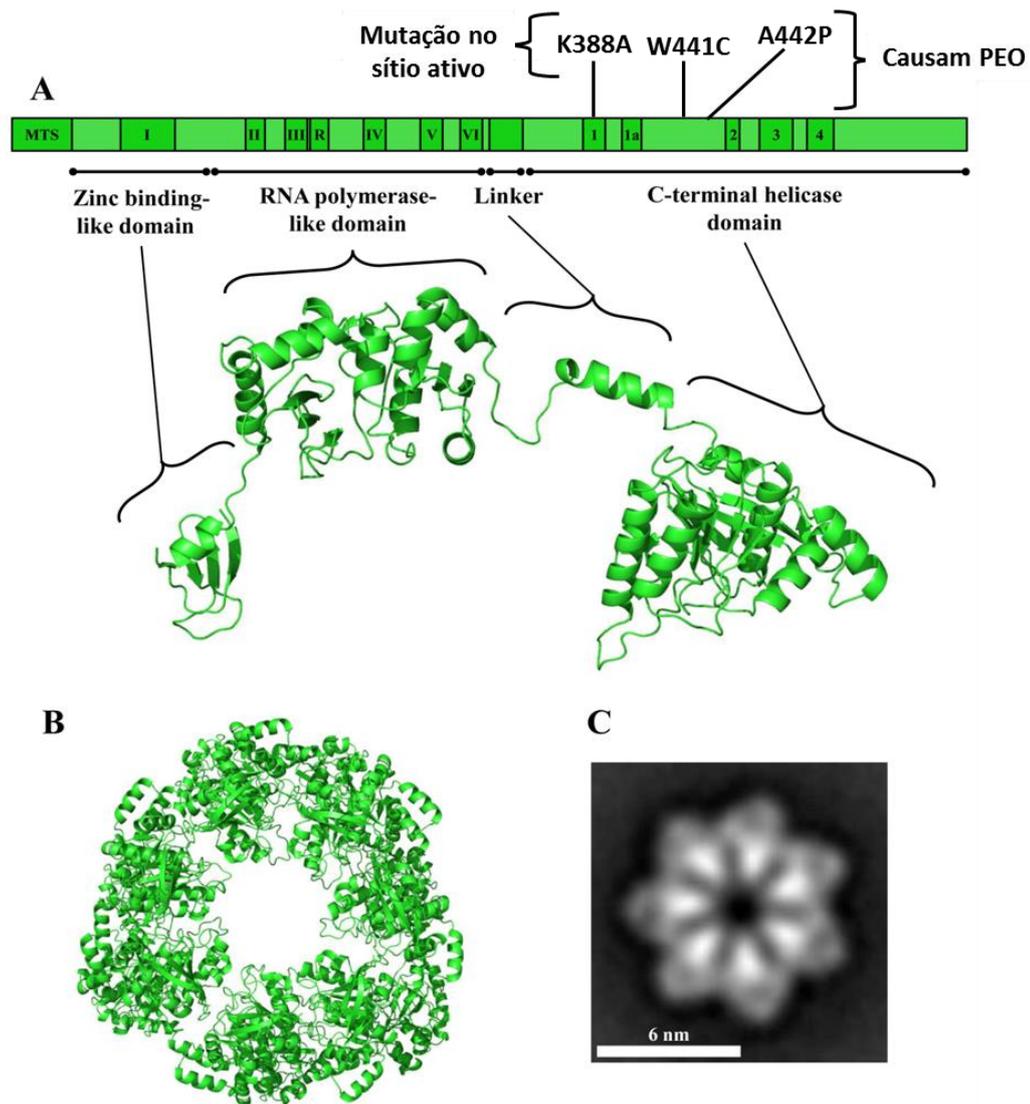
do meio, bem como das variações de temperatura e de ATP (ZIEBARTH et al., 2010). A Twinkle é uma proteína essencial no processo replicativo, comprovada pela letalidade em camundongos *knockout* para esta enzima (MILENKOVIC et al., 2013), e pela incidência de patologias humanas relacionadas ao seu inadequado funcionamento (FERNANDÉZ-MILLÁN et al., 2015; OLIVEIRA; KAGUNI, 2010).

Figura 4 – Representação esquemática do replissomo do DNAm humano, mostrando a estrutura quaternária da Twinkle (*mtDNA helicase*), Pol  $\gamma$  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  $\gamma$  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.

Figura 5 – Representação esquemática e modelo estrutural da Twinkle humana. (A) Representação dos motivos conservados de seqüências de aminoácidos da Twinkle. Acima, mutações modeladas em *Drosophila melanogaster*: K388A (localizada no motivo conservado 1 da Twinkle); W441C e A442P (homólogas às encontradas em Oftalmoplegia Progressiva Externa em humanos). Abaixo, modelo estrutural de um protômero da Twinkle, destacando sua arquitetura modular organizada em domínios. (B) Modelo heptamérico, mostrando o canal central por onde DNA simples-fita poderia passar. (C) Imagem de microscopia eletrônica da Twinkle recombinante, mostrando sua configuração heptamérica.



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

A Pol  $\gamma$  é incapaz de realizar sua atividade de polimerase na ausência da Twinkle, pois ela utiliza a fita simples gerada pela helicase mitocondrial como molde para a síntese das fitas filhas. A Pol  $\gamma$  humana é um heterotrímero com uma subunidade catalítica (Pol  $\gamma$ A) e duas subunidades acessórias (Pol  $\gamma$ B). Esta enzima contém um domínio de atividade exonucleásico 3'-5' que permite a alta fidelidade durante a replicação das fitas filhas, apresentando uma frequência de erro menor

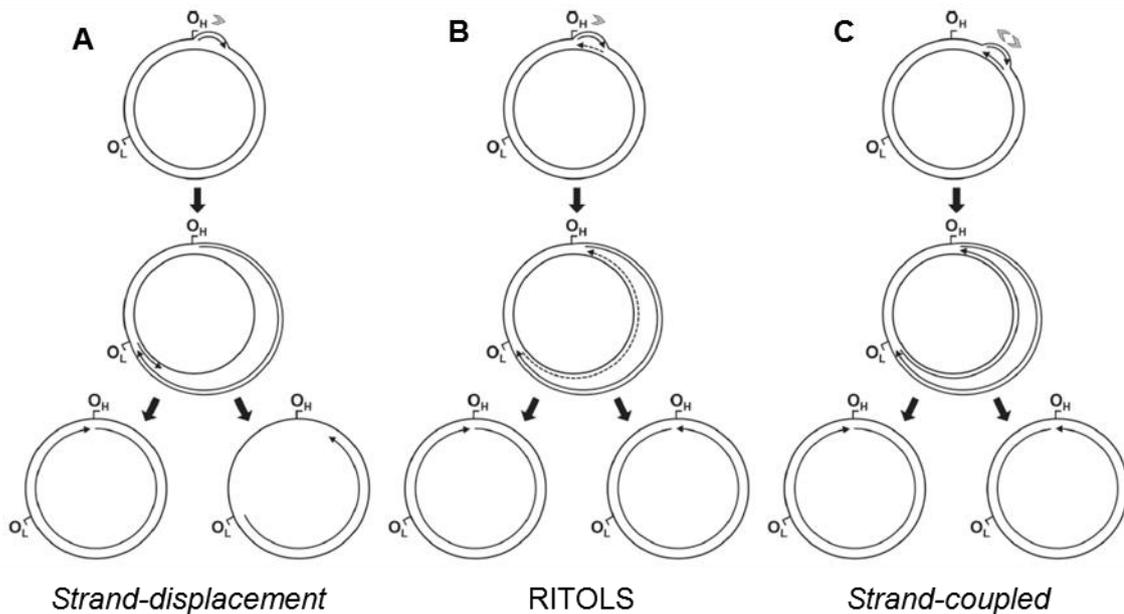
que  $1 \times 10^{-6}$  (LONGLEY et al, 2001). Há também nesta subunidade atividade 5'-3' liase, cuja contribuição no reparo da excisão de bases lesionadas eleva ainda mais a fidelidade replicativa do DNAm (PINZ; BOGENHAGEN, 2006). As subunidades acessórias Pol  $\gamma$ B aumentam a interação entre a fita molde do DNAm e o replissomo mitocondrial, potencializando a atividade de síntese e reparo das subunidades Pol  $\gamma$ A. Em *D. melanogaster*, a Pol  $\gamma$  consiste de somente uma subunidade Pol  $\gamma$ B e uma Pol  $\gamma$ A, e em *Saccharomyces cerevisiae* a subunidade Pol  $\gamma$ B foi perdida e a Pol  $\gamma$ A é monomérica, mostrando as variações existentes entre os eucariotos (GUSTAFSSON; FALKENBERG; LARSSON, 2016). A proteína mtSSB liga-se ao DNA simples fita como um tetrâmero, conferindo-o estabilidade. Além disso, estimula e potencializa a atividade de síntese de DNA da Pol  $\gamma$  e a atividade de abertura do DNA dupla-fita da Twinkle (OLIVEIRA; KAGUNI, 2010, 2011).

### 3.3.2 Modelos de replicação do DNA mitocondrial

Em vertebrados, uma das fitas do DNAm é conhecida por fita pesada (*heavy strand*) devido à alta proporção do nucleotídeo guanilato, enquanto a outra é chamada de fita leve (*light strand*) por causa do acúmulo de citidilatos. Atualmente, são propostos três modelos de replicação do DNAm: *strand-displacement*, RITOLS (RNA incorporado ao longo da fita descontínua) e *strand-coupled* (fita acoplada) (Figura 6) (GUSTAFSSON; FALKENBERG; LARSSON, 2016; MCKINNEY; OLIVEIRA, 2013). No modelo *strand-displacement*, a síntese da fita pesada inicia-se dentro da região não codificadora *D-loop*, na origem de replicação  $O_H$  (Figuras 3 e 6). Após cerca de dois terços da fita pesada já ter sido replicada, inicia-se a síntese da fita leve na origem de replicação  $O_L$ . O processo de síntese das fitas filhas é unidirecional, contínuo, assimétrico e não envolve formação de fragmentos de Okazaki. O modelo RITOLS propõe a existência de extensos segmentos de RNA incorporados à fita leve durante a replicação, que é unidirecional e acoplada entre as fitas, iniciando-se a partir da região *D-loop*. Os segmentos de RNA incorporados seriam, posteriormente, processados em DNA. O modelo *strand-coupled* parece acontecer quando as células estão se recuperando de uma depleção do DNAm induzida, por exemplo, por brometo de etídeo. A principal característica desse modelo são os indícios de replicação acoplada entre a fita contínua e descontínua,

assim como ocorre em DNA bacteriano (GUSTAFSSON; FALKENBERG; LARSSON, 2016; MCKINNEY; OLIVEIRA, 2013).

Figura 6 – Modelos representativos da replicação do DNAm<sub>t</sub> em vertebrados. (A) Modelo *strand-displacement*: a direção da seta partindo do sítio O<sub>H</sub> indica o local de início e o sentido da replicação da fita contínua *heavy*. Após parte desta fita ser sintetizada, inicia-se a replicação da fita descontínua *light* a partir do sítio O<sub>L</sub>. (B) Modelo RITOLS: observa-se a inserção de diversos fragmentos de RNA ao longo da fita descontínua (seta pontilhada). (C) Modelo *strand-coupled*: ocorre a síntese acoplada das fitas filhas. Em todos os modelos propostos as setas indicam síntese de DNA/RNA no sentido 5'-3'.



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

Já em invertebrados, são reconhecidos dois modelos de replicação do DNAm<sub>t</sub> distintos daqueles citados anteriormente, são esses: *rolling circle* e *strand-coupled theta*. No mecanismo *rolling circle*, após clivagem da fita parental por uma endonuclease, inicia-se a síntese das fitas filhas de modo unidirecional através do “rolamento” das fitas parentais e da formação de uma espécie de “calda” contendo a fita recém sintetizada. Caracterizado no nematoide *Caenorhabditis elegans*, o modelo *rolling circle* consiste, resumidamente, na alongação das fitas filhas conforme descrito acima e provável resolução dos produtos multiméricos e circularização do genoma a partir de recombinação homóloga envolvendo a região não codificadora do DNAm<sub>t</sub> (LEWIS et al., 2015). Este mecanismo de replicação é encontrado também em DNAm<sub>t</sub> de fungos e plantas, e para alguns tipos de bacteriófagos. Em *D. melanogaster* descreve-se o modelo *strand-coupled theta*,

caracterizado como uma replicação unidirecional e acoplada entre as fitas leve e pesada, além de ser iniciada dentro de regiões não codificadoras ricas em adenilato e timidilato (JÖERS; JACOBS, 2013). Há também descrito um modelo de *strand-displacement* para *D. melanogaster* parecido com aquele descrito para vertebrados, exceto pelo fato da iniciação da síntese das duas fitas filhas serem bem distintas temporalmente (RUBENSTEIN; BRUTLAG; CLAYTON, 1977).

### 3.4 Doenças mitocondriais

Doenças ou desordens mitocondriais são síndromes clínicas relacionadas a anormalidades que ocorrem na OXPHOS como consequência de mutações no DNA nuclear e/ou mitocondrial (GORMAN et al., 2016; ZEVIANI; DONATO, 2004). Assim, disfunções mitocondriais podem apresentar origens variadas, desde herança autossômica ou ligada ao cromossomo X para mutações no DNA nuclear (herança mendeliana) a herança materna para mutações no DNAm (herança citoplasmática). Diferentemente das disfunções de herança autossômica, em que a combinação de dois alelos pode desencadear a doença, a expressão do fenótipo associado a mutações no DNAm é regido pelo nível de heteroplasmia dentro da célula. Uma vez que o DNAm possui multi-cópias dentro da célula, a proporção de DNAm mutado para DNAm selvagem é determinante no acarretamento ou agravamento da disfunção mitocondrial (GORMAN et al., 2016).

Existe uma variedade de expressões fenotípicas de doenças relacionadas ao DNAm, variando desde manifestações neurológicas a sistêmicas (KORHONEN et al., 2004). São relatadas lesões no nervo óptico, como ocorre na neuropatia hereditária de Leber (LHON), danos na cóclea causados por surdez hereditária maternamente, miopatias, encefalomiopatias, cardiopatias, entre outras complicações clínicas. As disfunções que podem ter início na infância geralmente são: epilepsia, ataxia, apneia, falência hepática, diabetes, anemia, dentre outras. Na fase adulta, as características podem ser: enxaqueca, distúrbios na fala, demência, surdez sensorineural, constipação, insuficiência cardíaca, pneumonia, insuficiência ovariana, oftalmoplegia, catarata e outras (GORMAN et al., 2016; TAYLOR; TURNBULL, 2005; ZEVIANI; DONATO, 2004).

Mutações em genes nucleares responsáveis por manter e codificar proteínas constituintes do replissomo mitocondrial resultam em substituições de nucleotídeos,

deleções e duplicações que levam à perda da integridade do DNAm. Além disso, danos quantitativos no DNAm que alteram o número de moléculas deste genoma nas diferentes células podem impactar o nível de transcrição dos genes do DNAm e, conseqüentemente, o bom funcionamento mitocondrial (SPINAZZOLA; ZEVIANI, 2005). A doença Oftalmoplegia Progressiva Externa de herança autossômica dominante (adPEO) é causada, entre outros fatores, por falhas no processo de replicação do DNAm, sendo associadas com a presença de múltiplas deleções no DNAm (SANCHEZ-MARTINEZ et al., 2012). Este distúrbio pode ter diferentes origens genéticas, por exemplo, mutações no gene da Pol  $\gamma$ A ou no gene *C10orf2*, cujo produto é a enzima Twinkle. As mutações na Twinkle são responsáveis por 30% dos casos de adPEO. Mutações nas enzimas Pol  $\gamma$ A e Twinkle estão associadas também à neuropatia, disartria e oftalmoplegia sensorio-atática (SANDO) e ataxia espinocerebelar de início infantil (IOSCA) (SANCHEZ-MARTINEZ et al., 2012).

### 3.5 Enzimas alternativas

As mitocôndrias de diversos protozoários, fungos, plantas e alguns animais podem apresentar uma via alternativa de transferência de elétrons que contornam os complexos I ou III e IV durante a OXPHOS (NELSON; COX, 2014). Estas vias alternativas podem se dar pelas enzimas NADH-desidrogenase alternativa (ANDH) e oxidase alternativa (AOX). A presença da ANDH foi relatada em todos os domínios da vida, enquanto que a AOX parece não estar presente apenas em Archaea. Dentro do reino animal, há estudos sugerindo a presença de ANDH somente em metazoários mais basais (Placozoa e Cnidaria) e em dois grupos de deuterostomados (Echinodermata e Tunicata) (MATUS-ORTEGA et al., 2011), embora este estudo tenha sido conduzido apenas com dados genômicos. ANDH pode transferir os elétrons ricos em energia do carreador NADH diretamente à ubiquinona, sem bombear prótons para o espaço intermembrana. Assim, os elétrons não necessariamente chegam ao CI e, com isso, este não realizaria o bombeamento de prótons através da membrana mitocondrial interna (NELSON; COX, 2014).

A enzima AOX possui papel análogo aos complexos III e IV da CR, pois, respectivamente, realiza a oxidação do ubiquinol a ubiquinona e reduz oxigênio molecular a água (Figura 1), sem o bombeamento de prótons através da membrana

interna pelos complexos III e IV. Desse modo, esses complexos podem ser contornados pela presença da AOX e, logo, o bombeamento de prótons por eles poderia ser afetado. Como consequência, teoricamente ocorreria uma diminuição do gradiente eletroquímico formado no espaço intermembrana e na capacidade de produção de ATP (MACDONALD; VANLERBERGHE; STAPLES, 2009; MOORE; SIEDOW, 1991). A AOX é uma enzima associada à membrana mitocondrial interna, cuja estrutura homodimérica possui quatro  $\alpha$ -hélices justapostas ao centro ativo di-ferro de cada monômero. Os resíduos glutamato e histidina (E239, H242, E344, H347) que estabilizam e coordenam o centro di-ferro são altamente conservados em eucariotos (ANDJELKOVIC et al., 2015; MCDONALD, 2008).

No passado, pensava-se que AOX estava restrita apenas a plantas, fungos e protozoários, contudo, sua presença foi recentemente confirmada também no reino animal. Foram relatadas 28 espécies de animais representantes de nove filos que possuem o gene da AOX, sendo eles: Porifera, Placozoa, Cnidaria, Mollusca, Annelida, Nematoda, Echinodermata, Hemichordata e Chordata (MACDONALD; VANLERBERGHE; STAPLES, 2009). Artrópodes e vertebrados claramente perderam este gene durante a evolução dos animais, visto que grupos irmãos de ambos o possuem (Nematoda e Tunicata, respectivamente). Considerando que diversos animais dentro de artrópodes e vertebrados são fisicamente ativos (nadam, correm e/ou voam), uma das hipóteses que explica esta perda evolutiva é baseada na diminuição da produção de ATP, pois o gradiente eletroquímico gerado no espaço intermembrana seria reduzido pela presença da AOX (FERNANDEZ-AYALA et al., 2009).

Entretanto, há uma série de benefícios fisiológicos inerentes a presença natural da AOX, tais como: termogênese, manutenção do fluxo de transporte de elétrons na CR, controle da geração de ROS, eliminação de excesso de  $O_2$ , resistência a metal e substâncias tóxicas (MCDONALD, 2008). Por exemplo, observa-se produção de calor em algumas espécies de plantas da família Araceae como consequência do processo de redução da molécula de oxigênio a água, catalisada pela AOX. Algumas espécies dessa família são conhecidas por liberar no meio odores de esterco e carne em putrefação com a finalidade de atrair polinizadores. Desse modo, a termogênese confere valor adaptativo a estas plantas, pois ajuda a volatilizar moléculas atrativas pelo ar (WAGNER et al., 2008). Outro exemplo se trata da expressão da AOX no protozoário parasita intestinal de

humanos e de outros animais, *Cryptosporidium parvum*. Acredita-se que a oxidase alternativa seja responsável por garantir a baixa concentração de oxigênio ideal à sobrevivência do animal dentro do hospedeiro (PUTIGNANI et al., 2004).

No mesmo sentido, a expressão transgênica da AOX em organismos que perderam esta enzima evolutivamente, tais como camundongo e drosófila, ou células de humanos em cultura, tem se mostrado eficaz na atenuação de diversos fenótipos potencialmente letais. Ao submeter células humanas embrionárias de rim em cultura a inibidores dos complexos III (antimicina A) e IV (cianeto), aquelas expressando AOX apresentaram respiração resistente aos inibidores, ou seja, mantiveram elevados os níveis de consumo de oxigênio mitocondrial e a viabilidade celular (DASSA et al., 2009). Para fibroblastos em cultura provenientes de um paciente apresentando cardiomiopatia hipertrófica fatal, cuja causa da doença é uma mutação deletéria no gene COX15 do CIV, foi observada uma melhora significativa no crescimento dessas células expressando AOX quando expostas a cianeto (DASSA et al., 2009).

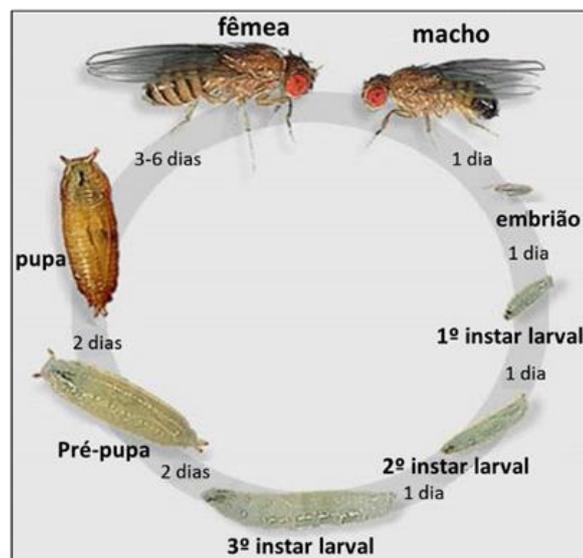
O gene DJ1 em humanos participa do sistema de controle de qualidade mitocondrial, responsável por detectar danos dentro da organela. A ocorrência de mutações neste gene está relacionada ao mal de Parkinson, caracterizado pela progressiva destruição dos neurônios que controlam os movimentos. A linhagem *dj-1 $\beta$*  de *D. melanogaster* possui mutação homóloga àquela que leva à doença de Parkinson em humanos. Contudo, quando AOX foi expressa nesta linhagem, houve redução na formação de ROS e melhoras significativas nas disfunções locomotoras (FERNANDEZ-AYALA et al., 2009).

Defeitos no complexo IV da CR em pacientes humanos geralmente estão ligados a diversos danos em órgãos do sistema nervoso central, músculo cardíaco ou esquelético e fígado. Além disso, também pode haver relação entre disfunções neste complexo e o mal de Alzheimer. A partir do *knockdown* de importantes subunidades constituintes do CIV, em diferentes tecidos, foi observado que drosófilas expressando AOX foram capazes de superar a letalidade na fase pupal e aliviar danos locomotores (HUMPHREY et al., 2012). A adição de uma via alternativa para o fluxo de elétrons poderia prevenir a elevada produção de ROS, que se dá, principalmente, pela transferência de elétrons ao oxigênio molecular de forma não catalisada por uma oxidase, tornando-se, portanto, substâncias tóxicas para a célula.

### 3.6 *Drosophila melanogaster* como organismo modelo

A utilização de *Drosophila melanogaster* como organismo modelo vem se popularizando cientificamente há pouco mais de um século, principalmente após seu uso na descoberta da hereditariedade cromossômica por Thomas Morgan, rendendo a ele o Prêmio Nobel de Medicina em 1933 (revisado em ROBERTS, 2006). Drosófilas têm características essenciais para serem aplicadas em pesquisas na área da genética, evolução, fisiologia, biomedicina, dentre outras, pois são cultivadas facilmente em laboratório, possuem ciclo de vida curto (Figura 7) e, além disso, 75% de doenças genéticas que ocorrem em humanos possuem compatibilidade no genoma dessas moscas (revisado em PROKOP, 2013). É de extrema importância considerar a fisiologia da drosófila para a correta condução dos experimentos. Por exemplo, sabe-se que as fêmeas possuem a capacidade de armazenar esperma em seu aparelho reprodutor por um longo período, portanto, devem ser coletadas fêmeas virgens a fim de que se torne possível planejar com quais machos estas se acasalarão (PROKOP, 2013).

Figura 7 – Fases do ciclo de vida de *Drosophila melanogaster* a 25°C, um inseto holometábolo (de metamorfose completa). 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.



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

*D. melanogaster* possui três pares de cromossomos autossômicos e um par de cromossomos sexuais (fêmea XX e macho XY). Para representar seu genótipo, é adotada a separação dos alelos em cromossomos homólogos por uma barra e dos genes nos cromossomos distintos (sexuais, 2 e 3; o 4 é geralmente ignorado por seu tamanho muito pequeno em relação aos outros cromossomos) por ponto e vírgula (PROKOP, 2013). Uma importante ferramenta genética criada pelos cientistas foram os cromossomos balanceadores em drosófila (KLUG et al., 2010). Estes 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 (KLUG et al., 2010). Com isso, é possível transmitir ao longo de gerações determinado gene de interesse em seu contexto cromossômico/genômico, sem que eventos de recombinação homóloga leve a alterações do loco de interesse. Além disso, pode-se inferir também o genótipo de determinada mosca, uma vez que os cromossomos balanceadores carregam um gene marcador dominante que expressa no fenótipo características como mudança na coloração dos olhos, curvatura das asas, tipo de cerdas torácicas, comprimento das pupas e larvas, dentre outras (KLUG et al., 2010). Tais características foram muito empregadas nesta dissertação (APÊNDICE A).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Criação das linhagens de drosófilas carregando dois transgenes

As linhagens transgênicas mutantes da 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. As linhagens AOX foram desenvolvidas e cedidas pelo laboratório do Prof. Dr. Howard T. Jacobs, Universidade de Tampere, Finlândia. Por meio de cruzamentos genéticos (APÊNDICE A) foram desenvolvidas as linhagens experimentais *UAS-AOX*; *UAS-Twinkle*, contendo os transgenes da AOX e da Twinkle no mesmo indivíduo (Tabela 1). Moscas *UAS-AOX*; *UAS-Twinkle* homocigotas viáveis foram obtidas apenas para as linhagens Twinkle K388A e W441C, enquanto que as linhagens Twinkle A442P e tipo selvagem (WT) foram mantidas balanceadas com o cromossomo TM6B-GFP.

Como controle para AOX foram construídas duas linhagens de grande importância: *UAS-AOXmut<sup>2nd</sup>*; *UAS-Twinkle* e *UAS-empty<sup>2nd</sup>*; *UAS-Twinkle* (Tabela 1). A primeira expressa, além de uma das formas da Twinkle, uma versão não funcional da AOX (E239A/H242A/E343A/H346A), enquanto que a segunda contém apenas o promotor *UAS*, sem o gene da AOX (ANDJELKOVIC et al., 2015). Duas linhagens expressando AOX funcional foram usadas: quando a expressão é induzida, a linhagem *UAS-AOX<sup>F6</sup>* apresenta altos níveis de AOX funcional, comparada à linhagem *UAS-AOXwt<sup>8.1</sup>* (ANDJELKOVIC et al., 2015; FERNANDEZ-AYALA et al., 2009). Entretanto, vale ressaltar que tanto o gene *UAS-AOX* quanto o *UAS-Twinkle* só são expressos na presença do fator de transcrição GAL4 (ver Figura 8), por este se tratar de um sistema induzível de expressão transgênica.

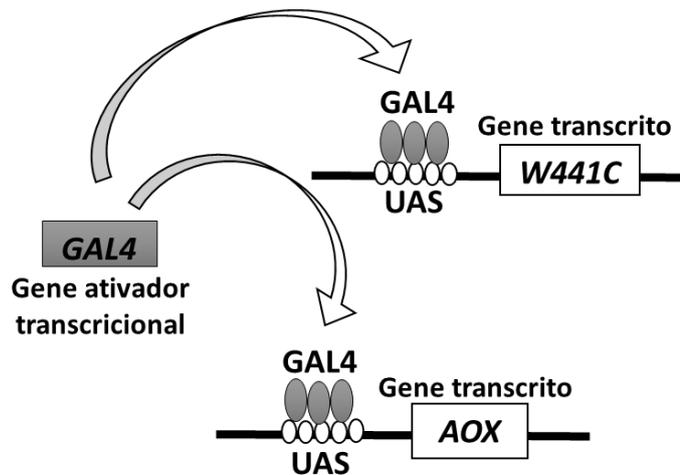
Tabela 1 – Genótipo resumido das linhagens *UAS-AOX*; *UAS-Twinkle* criadas em laboratório. As linhagens Twinkle K388A e W441C são homocigotas para os genes da AOX e da Twinkle, e as linhagens Twinkle WT e A442P encontram-se balanceadas com o cromossomo TM6B-GFP. Todas as linhagens representadas carregam, simultaneamente, os transgenes *UAS-AOX* e *UAS-Twinkle* no segundo e no terceiro cromossomo de *D. melanogaster*, respectivamente.

	<b>UAS-Twinkle WT (Twinkle WT)</b>	<b>UAS-Twinkle W441C (mutante W441C)</b>	<b>UAS-Twinkle A442P (mutante A442P)</b>	<b>UAS-Twinkle K388A (mutante K388A)</b>
<b>AOX ausente (controle)</b>	<i>UAS-empty</i> <sup>2nd</sup> ; <i>UAS-Twinkle</i> WT/TM6B-GFP	<i>UAS-empty</i> <sup>2nd</sup> ; <i>UAS-Twinkle</i> W441C	<i>UAS-empty</i> <sup>2nd</sup> ; <i>UAS-Twinkle</i> A442P/TM6B-GFP	<i>UAS-empty</i> <sup>2nd</sup> ; <i>UAS-Twinkle</i> K388A
<b>AOX mutada (controle)</b>	<i>UAS-AOXmut</i> <sup>2nd</sup> ; <i>UAS-Twinkle</i> WT/TM6B-GFP	<i>UAS-AOXmut</i> <sup>2nd</sup> ; <i>UAS-Twinkle</i> W441C	<i>UAS-AOXmut</i> <sup>2nd</sup> ; <i>UAS-Twinkle</i> A442P/TM6B-GFP	<i>UAS-AOXmut</i> <sup>2nd</sup> ; <i>UAS-Twinkle</i> K388A
<b>AOX funcional (baixo nível)</b>	<i>UAS-AOXwt</i> <sup>8.1</sup> ; <i>UAS-Twinkle</i> WT/TM6B-GFP	<i>UAS-AOXwt</i> <sup>8.1</sup> ; <i>UAS-Twinkle</i> W441C	<i>UAS-AOXwt</i> <sup>8.1</sup> ; <i>UAS-Twinkle</i> A442P/TM6B-GFP	<i>UAS-AOXwt</i> <sup>8.1</sup> ; <i>UAS-Twinkle</i> K388A
<b>AOX funcional (alto nível)</b>	<i>UAS-AOX</i> <sup>F6</sup> ; <i>UAS-Twinkle</i> WT/TM6B-GFP	<i>UAS-AOX</i> <sup>F6</sup> ; <i>UAS-Twinkle</i> W441C	<i>UAS-AOX</i> <sup>F6</sup> ; <i>UAS-Twinkle</i> A442P/TM6B-GFP	<i>UAS-AOX</i> <sup>F6</sup> ; <i>UAS-Twinkle</i> K388A

## 4.2 Análise fenotípica por ensaios de desenvolvimento

Para indução da expressão de AOX e Twinkle, moscas fêmeas virgens das diferentes linhagens *UAS-AOX*; *UAS-Twinkle* (Tabela 1) foram cruzadas com machos das linhagens *daGAL4* ou *w<sup>1118</sup>*. A linhagem *daGAL4* fornece o fator de transcrição GAL4 de *Saccharomyces cerevisiae*, que reconhece especificamente o promotor *UAS* fundido aos transgenes de interesse, constituindo, assim, um sistema induzível de expressão transgênica (Figura 8). A linhagem *daGAL4* foi utilizada por induzir expressão transgênica ubíqua no organismo. Cruzamentos com machos *w<sup>1118</sup>* foram considerados controle, pois a expressão dos transgenes não é induzida nestas condições.

Figura 8 – Representação do sistema induzível *UAS/GAL4*. O gene ativador transcricional é responsável por codificar o fator de transcrição GAL4 (elipses em cinza), que se liga especificadamente ao sítio *UAS* (*Upstream Activation Sequence*, elipses em branco). Após tal interação, os transgenes de interesse (representados pelas caixas em branco *W441C* e *AOX*) serão transcritos, levando à produção das proteínas de interesse.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os cruzamentos foram montados em tubos com cerca de 15 moscas fêmeas virgens e sete machos. De duas a três repetições biológicas foram realizadas, com cerca de oito tubos para cada repetição. A viabilidade dos indivíduos expressando AOX e Twinkle e dos controles foi calculada como a razão entre o número de indivíduos adultos emergentes pelo número de pupas existentes em cada tubo, e os resultados foram expressos como média e desvio padrão em torno da taxa de emergência. Quando a Twinkle mutante causava letalidade na fase larval, os resultados foram analisados qualitativamente, por meio de acompanhamento diário e

registros fotográficos dos indivíduos em desenvolvimento. Por causa da presença do balanceador TM6B-GFP, nos cruzamentos envolvendo Twinkle WT e A442P, o fenótipo das pupas também foi observado para os cálculos da taxa de emergência.

### 4.3 Manutenção das linhagens experimentais em laboratório

As linhagens foram mantidas 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, melação de cana-de-açúcar, farinha de soja e de milho, germe de trigo, ágar e fermento (FERNANDEZ-AYALA et al., 2009). A umidade dos tubos foi mantida diariamente por meio da adição manual de algumas gotas de água destilada autoclavada sobre a dieta.

### 4.4 Extração de DNA total

A extração do DNA total seguiu um protocolo já publicado (JÖERS et al, 2013) e foi realizada a partir de larvas L3, com aproximadamente 5 dias de desenvolvimento após oviposição, para as linhagens *UAS-AOX*; *UAS-Twinkle* K388A, A442P e WT, e de adultos machos (1-3 dias após emergência) para as linhagens *UAS-AOX*; *UAS-Twinkle* W441C e WT. Entre 5 e 10 adultos/larvas foram macerados no gelo em 500 µl de tampão de lise (75 mM NaCl, 50 mM EDTA, 20 mM HEPES, pH 7,8), seguido por adição de 10 µl de SDS 10%. Após centrifugação a 1200  $g_{max}$  por 5 min, foram adicionados 10 µl de proteinase K (10 mg/mL) ao sobrenadante, seguido por incubação de 2 horas a 50°C. O DNA foi precipitado com 412 µL de isopropanol (100%) *overnight* a -20°C. As amostras foram equilibradas a 4°C por 1h, centrifugadas também a 4°C a 16000  $g_{max}$  por 30 min e lavadas com 1 mL de etanol 70% gelado. Após secagem em temperatura ambiente por 15 horas, os *pellets* de DNA foram ressuspensos em 100 µl de tampão TE (10 mM Tris/HCl, 0,1 mM EDTA, pH 7,5) e incubados por cerca de 7 horas a 55°C para completa ressuspensão do material, antes de serem estocados a -20°C. As amostras foram quantificadas por absorvância a 260 nm utilizando NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

#### 4.5 Quantificação do nível de DNAmT via PCR 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 DNAmT em linhagens expressando diferentes variações da AOX e Twinkle. Para tanto, foram amplificadas uma região do DNAmT (gene *16S rRNA*, primers 5'-AAAAAGATTGCGACCTCGAT-3' e 5'-AAACCAACCTGGCTTACACC-3') e uma região do DNA nuclear (gene *RpL32*, primers 5'-AGGCCCAAGATCGTGAAGAA-3' e 5'-TGTGCACCAGGAAGTTCTTGAA-3'), usando protocolos já estabelecidos para *Drosophila* (FUKUOH et al, 2014). As reações foram realizadas utilizando o kit SYBR Green JumpStart™ Taq ReadyMix™ (Sigma-Aldrich) para o sistema de PCR em tempo real StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Life Technologies). A reação foi realizada em 20 µl, contendo 10 µM de cada primer, 10 µl SYBR Green mix e 15 ng de DNA total. 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 DNAmT relativa entre as amostras foi calculada usando o método do  $\Delta\Delta C_t$ .

#### 4.6 Preparação de extrato mitocondrial cru

A obtenção do extrato mitocondrial cru (EMC) foi realizada a partir de uma mistura de pupas e larvas L3 cultivadas a 18°C. Cerca de 60 larvas/pupas foram maceradas em 200 µl de tampão de isolamento (200 mM sacarose, 5mM Tris /HCl, 2mM, EGTA pH 7,5, 2 mM DDT, pH 8,0) no gelo e centrifugadas a 4°C por 3 min a 200  $g_{max}$ . O sobrenadante foi novamente centrifugado a 4°C por 10 min a 9000  $g_{max}$  e o *pellet* contendo o EMC foi ressuspenso em 25 µl de tampão de isolamento. A quantidade total de proteínas das amostras foi quantificada utilizando o NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

#### 4.7 Western blotting

Aproximadamente 100 µg das amostras de EMC foram usadas na corrida de géis de SDS-PAGE (Precast Any kD Criterion TGX, Bio-Rad) por 2 horas a 80V. O conteúdo dos géis foi transferido a membranas PVDF, que foram inicialmente

bloqueadas por 2 h em solução de PBS/Tween 20 contendo 5% de leite em pó desnatado. As membranas foram então incubadas com os anticorpos primários (anti-AOX policlonal de coelho, 1:10.000; anti-Dm helicase policlonal de coelho 1:5.000; e anti-ATP5A monoclonal de camundongo, 1:10.000) por 1h 30 min, seguido por lavagens com PBS/Tween 20 e posterior incubação com os anticorpos secundários (anti-IgGs de coelho e camundongo conjugados a HRP) por 2 h e lavagens como descrito acima. As membranas foram incubadas com o sistema de detecção de luminol Immun-Star HRP (Bio-Rad) e reveladas em filmes de raio-X Fuji Medical (Fujifilm).

#### 4.8 Consumo de oxigênio mitocondrial

Para avaliar a atividade dos complexos da CR em linhagens *UAS-AOX*; *UAS-Twinkle*, foi medida a taxa de respiração mitocondrial via oxígrafo O2k (Oroboros Instruments). A atividade dos complexos I e IV foi inferida através do consumo médio de oxigênio de tecidos larvais, por meio da adição de substratos específicos ou de inibidores da CR (Tabela 2) (GNAIGER, 2012). Primeiramente, foram dissecadas 5 larvas L3 com aproximadamente 5 dias de desenvolvimento após oviposição, provenientes de cruzamentos com machos *daGAL4* ou *w<sup>1118</sup>*, em solução PBS 1X, obtendo-se somente a parede corpórea destas, constituída primariamente de tecido muscular e nervoso. O material dissecado foi pesado e macerado manual no gelo em 100 µl de tampão de isolamento (250 mM sacarose, 5 mM Tris-HCl, 2 mM EGTA, 1% de BSA, pH 7.4). Este foi então adicionado a 2000 µl de tampão de ensaio (120 mM KCl, 0,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3 mM HEPES, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% de BSA, pH 7.2) nas câmaras do oxígrafo a 25°C. O consumo de oxigênio ligado à oxidação de substratos pelo CI foi calculado como a diferença média da respiração mitocondrial (em pmol/s\* mg de tecido) após adição de piruvato, prolina, malato e ADP, seguido por inibição com antimicina A e rotenona. Para a atividade da AOX (respiração resistente à antimicina A), considerou-se a respiração média após adição de piruvato, prolina, malato, ADP e antimicina A, seguido por inibição com propilgalato. Por fim, para o CIV considerou-se a diferença média de consumo de oxigênio após adição de TMPD e ascorbato, seguido por inibição com cianeto de potássio (KCN). Os testes foram realizados em duplicata.

Tabela 2 – Relação dos substratos e inibidores utilizados e sua ação sobre os complexos da CR mitocondrial. Os reagentes foram adicionados em cada experimento segundo a ordem em que estão apresentados na tabela.

Reagente	Ação
Piruvato (5 mM) Prolina (5 mM) Malato (1,5 mM)	Estimulam o ciclo de Krebs, gerando substrato (NADH) para o CI.
ADP (1 mM)	Substrato para o CV (ATP-sintase) e ANT; permite avaliar a capacidade OXPHOS da CR mitocondrial.
Antimicina A (0,025 mM)	Inibe o CIII, proporcionando testar a atividade da AOX.
Propil-galato (0,2 mM)	Inibe a AOX.
Rotenona (0,005mM)	Inibe o CI, extinguindo por completo a entrada de elétrons na CR.
TMPD (1,875 mM) Ascorbato (4 mM)	TMPD é o substrato para o CIV, já o ascorbato age evitando a auto oxidação deste substrato.
Cianeto de Potássio (0,1 mM)	Inibe o CIV.

#### 4.9 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas via análise de variância simples (one-way ANOVA), seguido por teste *a posteriori* de Tukey, utilizando o software SAS University Edition.

## 5 RESULTADOS

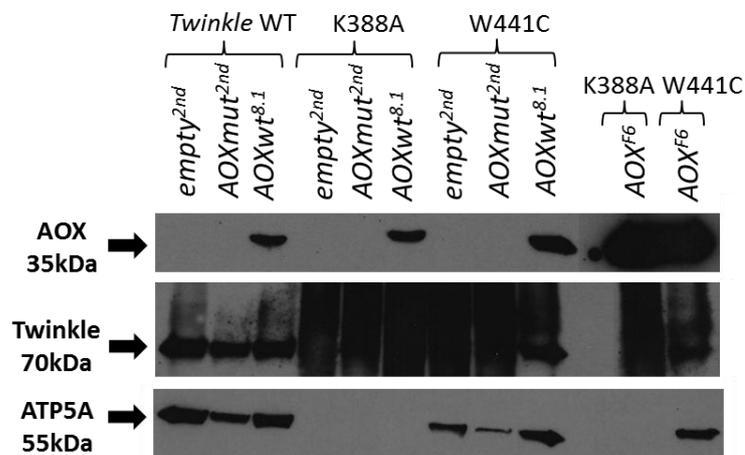
### 5.1 Caracterização das linhagens *UAS-AOX*; *UAS-Twinkle*

Para investigar se AOX pode aliviar os efeitos causados por disfunções da Twinkle, três linhagens que superexpressam mutações nesta enzima e uma linhagem que superexpressa a Twinkle WT foram usadas para criar linhagens duplo transgênicas *UAS-AOX*; *UAS-Twinkle* (Tabela 1). As mutações W441C e A442P da Twinkle de drosófila são análogas às mutações humanas W474C e A475P que causam adPEO (MATSUSHIMA; KAGUNI, 2007; SANCHEZ-MARTINEZ et al., 2012), e a versão *UAS-Twinkle* K388A possui mutação no domínio helicase da Twinkle, que reside em um dos sítios propostos de ligação ao ATP, conservado em diversos organismos (SANCHEZ-MARTINEZ et al., 2012). As novas linhagens foram primeiramente cruzadas com *daGAL4* e um extrato mitocondrial cru de larvas e pupas da prole resultante foi analisado via teste preliminar de western blot (Figura 9), no qual a presença da AOX funcional foi confirmada em todas as linhagens contendo *UAS-AOXwt<sup>8.1</sup>* ou *UAS-AOX<sup>F6</sup>*. Conforme descrito anteriormente (ANDJELKOVIC et al., 2015), as linhagens *UAS-AOX<sup>F6</sup>* apresentaram maiores níveis de AOX do que as linhagens *UAS-AOXwt<sup>8.1</sup>*. Não se observou AOX nas linhagens *UAS-empty<sup>2nd</sup>*, como esperado, já que estas carregam somente o promotor *UAS* sem um transgene associado. Também não foi observada a presença de AOX nas linhagens *UAS-AOXmut<sup>2nd</sup>*, apesar de uma banda tão intensa quanto àquela das linhagens *UAS-AOXwt<sup>8.1</sup>* ser esperada (ANDJELKOVIC et al., 2015). Por este ter sido um teste preliminar, pode ser que o preparo do extrato proteico não tenha sido feito corretamente e, portanto, o experimento deverá ser repetido com extrema cautela.

A expressão de Twinkle WT foi bem documentada pelo western blot (Figura 9), mas o anticorpo anti-Dm helicase (MATSUSHIMA; KAGUNI, 2007) parece ter reagido inespecificamente com outras proteínas das amostras de Twinkle K388A e W441C. Apesar disso, é aparente a presença da banda referente a estas proteínas mutantes nas amostras, e os próximos experimentos deverão mostrar isso com clareza. ATP5A, uma subunidade do CV e um marcador mitocondrial clássico, também não foi detectado homoganeamente em todas as amostras. Interessantemente, as amostras que tiveram a maior proporção de larvas,

especialmente as linhagens expressando Twinkle K388A, apresentaram altos níveis de reação cruzada utilizando o anticorpo anti-Dm helicase e falta ou baixa detecção de ATP5A (Figura 9). Os próximos western blots serão realizados somente com amostras de pupas para evitar tais problemas, e incluirão extratos de linhagens expressando Twinkle A442P.

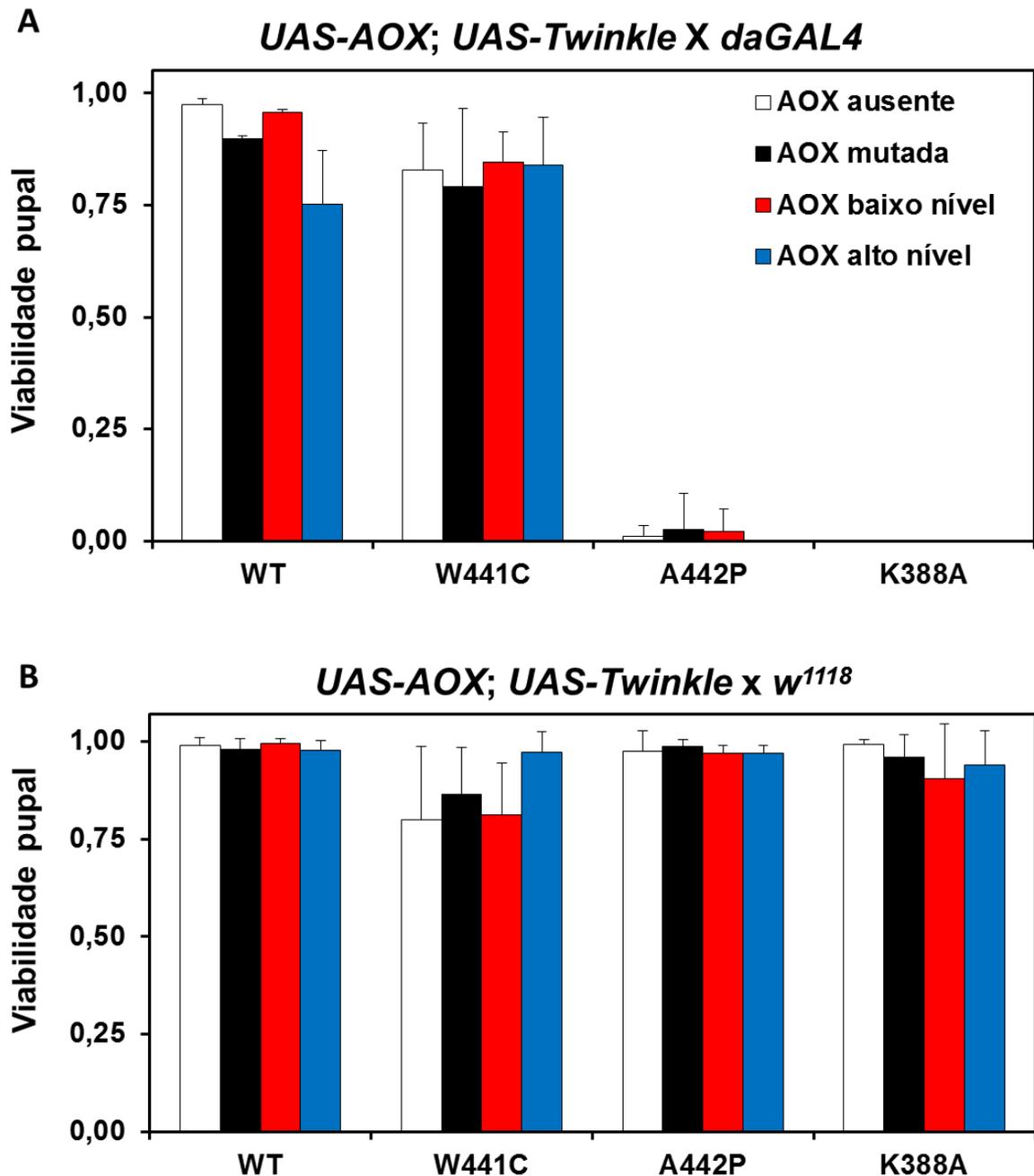
Figura 9 – Expressão de AOX e Twinkle nas linhagens *UAS-AOX*; *UAS-Twinkle*. Teste de western blot confirma a co-expressão de AOX funcional e Twinkle WT, K388A e W441C, apesar da inespecificidade do anticorpo contra Twinkle (anti-Dm helicase) e da ausência do sinal para o marcador mitocondrial ATP5A em algumas amostras.



## 5.2 AOX não ajuda nos defeitos de desenvolvimento causados por mutantes da Twinkle

De modo geral, as linhagens superexpressando Twinkle WT não apresentaram alterações em nenhuma das fases do desenvolvimento analisadas (Figura 10A). Mesmo que para a linhagem expressando AOX em altos níveis (*UAS-AOX<sup>F6</sup>*) tenha ocorrido uma diminuição na taxa de emergência em torno de 20%, isto não parece ser causado pela expressão da Twinkle WT, visto que o mesmo padrão de emergência foi observado para o controle *UAS-AOX<sup>F6</sup>*; TM6B-GFP, no qual o gene da Twinkle está ausente (APÊNDICE B). Provavelmente, tal diminuição na taxa de emergência seja devido a superexpressão da AOX ou ao local de inserção do transgene no genoma, apesar desta característica não ter sido reportada anteriormente (FERNANDEZ-AYALA et al., 2009). Quando as linhagens Twinkle WT foram cruzadas com machos *w<sup>1118</sup>* não foi observada nenhuma alteração na taxa de emergência da prole (Figura 10B).

Figura 10 – Viabilidade pupal em linhagens *UAS-AOX*; *UAS-Twinkle*. (A) Expressão de AOX nos mutantes mais severos da *Twinkle* (A442P e K388A) não é capaz de melhorar a letalidade fenotípica observada nas fases larval/pupal. (B) Prole resultante de cruzamento controle com machos *w<sup>1118</sup>* apresenta taxa de emergência normal (~90-100%). AOX ausente, AOX mutada, AOX em baixo nível e AOX em alto nível correspondem, respectivamente, aos genótipos: *UAS-empty<sup>2nd</sup>*; *UAS-AOXmut<sup>2nd</sup>*; *UAS-AOXwt<sup>8.1</sup>*; *UAS-AOX<sup>F6</sup>* combinados às diferentes formas de *Twinkle* indicadas na imagem (Tabela 1).

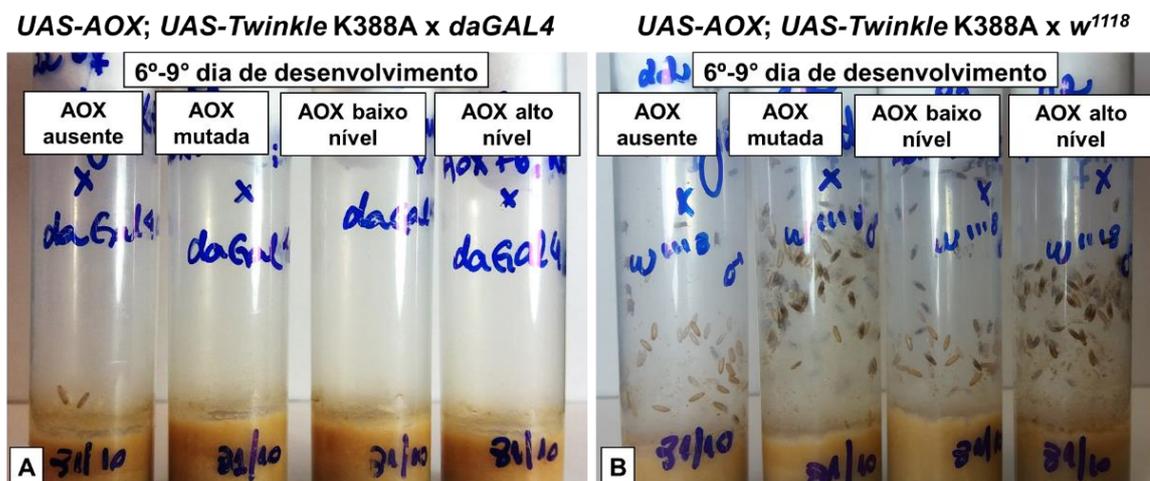


Assim como observado nas linhagens *Twinkle* WT, a expressão da mutação W441C não gerou prejuízo na taxa de emergência da prole (80-97%), isto é, a maioria dos indivíduos provenientes dos cruzamentos com machos *daGAL4*

passaram por todas as fases do desenvolvimento de insetos holometábolos, chegando a adultos (Figura 10A). A presença ou ausência de AOX funcional (em maior ou menor nível) mostrou-se indiferente nestas linhagens. Esses resultados concordam com aqueles que descrevem a mutação W441C da Twinkle como não prejudicial ao desenvolvimento de drosófilas, apesar de causar diminuição significativa na longevidade dos adultos (SANCHEZ-MARTINEZ et al., 2012).

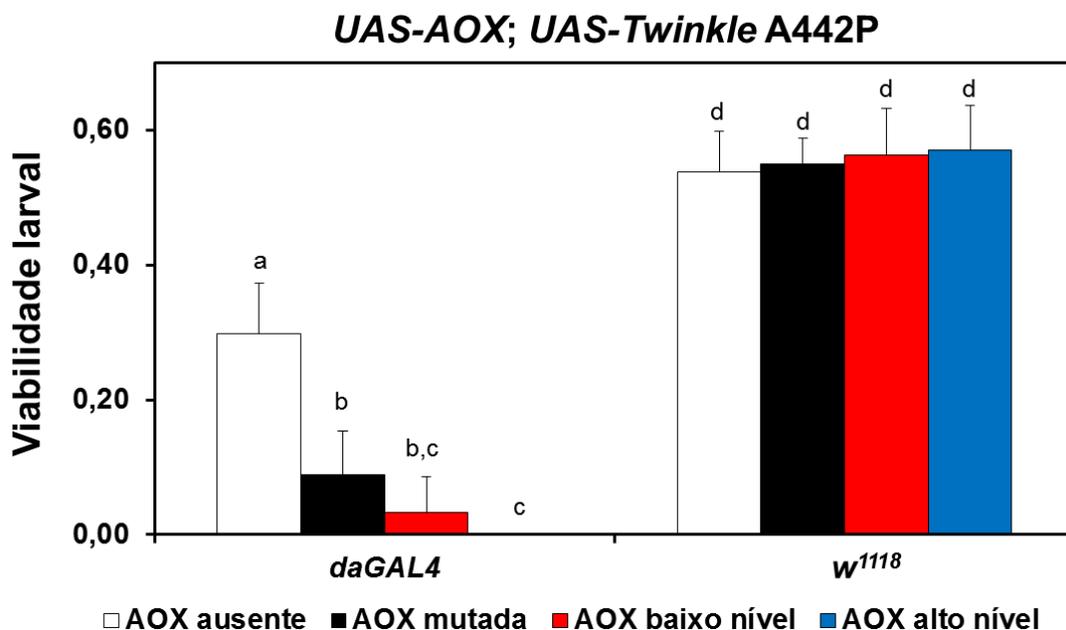
Para os indivíduos expressando, simultaneamente, alguma forma da enzima AOX e a mutação severa K388A na Twinkle, foi observado que a prole não foi capaz de passar por todas as etapas de desenvolvimento (Figuras 10A e 11A). Quando comparados ao cruzamento controle (Figura 11B), os mutantes K388A permaneceram por cerca de 9 dias a mais do que era esperado na fase larval, como larvas L3 ativas e aparentemente normais, mas sem progredirem à fase de pupa. Entretanto, alguns poucos indivíduos foram capazes de entrar em fase de pré-pupa, morrendo imediatamente nesta (Figura 11A). Como controle, pode-se observar que a prole proveniente do cruzamento entre fêmeas carregando os transgenes de interesse e machos  $w^{1118}$  não expressa o fenótipo prejudicial à formação das pupas e à emergência dos adultos, que por sua vez variou entre 90-100% (Figuras 10B e 11B).

Figura 11 – Desenvolvimento de linhagens *UAS-AOX; UAS-Twinkle* K388A. (A) Linhagens expressando a mutação severa K388A e o tipo de AOX indicado permanecem como larvas ou morrem imediatamente na fase de pré-pupa. (B) Linhagens controles que carregam os transgenes da AOX, conforme indicado, e a mutação K388A cruzadas com machos da linhagem  $w^{1118}$  entram na fase de pupa e eventualmente chegam à fase adulta (Figura 10B). AOX ausente, AOX mutada, AOX em baixo nível e AOX em alto nível correspondem, respectivamente, aos genótipos: *UAS-empty*<sup>2nd</sup>, *UAS-AOXmut*<sup>2nd</sup>, *UAS-AOXwt*<sup>8.1</sup>, *UAS-AOX*<sup>F6</sup> combinados à mutação K388A na Twinkle.



As linhagens A442P provenientes do cruzamento com machos *daGAL4*, na ausência de AOX funcional, tiveram dois problemas de desenvolvimento: a taxa de emergência dos adultos foi gravemente afetada (Figura 10A); e o número de larvas que se tornam pupas ficou abaixo da expectativa mendeliana de 1:1 (Figura 12). A expressão de AOX funcional em maior ou menor quantidade não afetou o resultado da taxa de emergência, mas interessantemente parece ter agravado o número de larvas que se desenvolvem a pupa, chegando a zero na linhagem que expressa AOX em altos níveis (*UAS-AOX<sup>F6</sup>*; *UAS-Twinkle* A442P). Com isso, a mutação A442P na Twinkle parece ser letal em 100% dos indivíduos ainda nas fases larvais quando associada à superexpressão de AOX. Não houve prejuízo na taxa de emergência da prole *UAS-AOX*; *UAS-Twinkle* A442P (Figura 10B) ou *UAS-AOX*; TM6B-GFP (APÊNDICE B) nos cruzamentos controles com machos *w<sup>1118</sup>*.

Figura 12 – Viabilidade larval em linhagens *UAS-AOX*; *UAS-Twinkle* A442P. Observa-se uma aparente queda gradual na formação de pupas A442P associadas ao aumento da expressão de AOX nas linhagens *UAS-AOX*; *UAS-Twinkle* A442P provenientes de cruzamentos com machos *daGAL4*, quando comparadas ao cruzamento controle *w<sup>1118</sup>*. AOX ausente, AOX mutada, AOX em baixo nível e AOX em alto nível correspondem, respectivamente, aos genótipos: *UAS-empty<sup>2nd</sup>*; *UAS-AOXmut<sup>2nd</sup>*; *UAS-AOXwt<sup>8.1</sup>*; *UAS-AOX<sup>F6</sup>* combinados à mutação A442P na Twinkle. Letras a-d representam diferentes classes estatísticas ( $p < 0,05$ ), de acordo com uma ANOVA simples, seguido por teste de Tukey.



### 5.3 A quantidade relativa de DNAmT em mutantes da Twinkle não muda na presença de AOX

Diferentemente do DNA nuclear, que geralmente possui duas cópias do genoma, o DNAmT pode expandir ou retrair em número de moléculas para se ajustar às condições metabólicas da célula e este fenômeno é dependente do processo de replicação do DNAmT, dentre outros. Danos na maquinaria replicativa do DNAmT, em especial pela expressão de Twinkles mutantes, podem causar variações em diferentes níveis na quantidade relativa de DNAmT, com implicações diretas na viabilidade dos organismos afetados (SANCHEZ-MARTINEZ et al., 2012). A superexpressão da Twinkle WT em *D. melanogaster* causou um aumento no número de cópias de DNAmT em adultos, quando comparado aos controles (Figura 13), corroborando dados de camundongos (IKEDA et al., 2015; TYYNISMAA et al., 2004), de células de drosófila em cultura (MATSUSHIMA; KAGUNI, 2007) e até mesmo adultos de drosófilas (SANCHEZ-MARTINEZ et al., 2012). Interessantemente, a superexpressão de Twinkle WT não causa nenhuma alteração no número de cópias de DNAmT de larvas L3 (Figura 14), resultado consistente com aquele publicado anteriormente para estas linhagens (SANCHEZ-MARTINEZ et al., 2012), e que indica uma modulação da quantidade de DNAmT pela Twinkle dependente do estágio de desenvolvimento. Na associação entre a expressão de Twinkle WT e AOX, não houve alteração significativa no número de cópias de DNAmT tanto em adultos quanto em larvas (Figuras 13 e 14), apesar da alta variabilidade observada entre as repetições biológicas.

Figura 13 – Linhagens expressando Twinkle WT apresentam aumento aparente no nível relativo de DNAm<sub>t</sub> em adultos, mas AOX não interfere neste aumento. A quantidade relativa de DNAm<sub>t</sub> foi calculada a partir dos resultados de  $\Delta\Delta C_t$  usando como referência o DNA total de um *pool* de adultos *w<sup>1118</sup>*. Todos os valores foram normalizados pela quantidade de DNAm<sub>t</sub> na linhagem *UAS-empty<sup>2nd</sup>; UAS-Twinkle WT x w<sup>1118</sup>*. AOX ausente, AOX mutada, AOX em baixo nível e AOX em alto nível correspondem, respectivamente, aos genótipos: *UAS-empty<sup>2nd</sup>*; *UAS-AOXmut<sup>2nd</sup>*; *UAS-AOXwt<sup>β.1</sup>*; *UAS-AOX<sup>F6</sup>* combinados à superexpressão de Twinkle WT. Os dados representam médias de três repetições biológicas e as barras de erro, o desvio padrão. Letras de a-d representam diferentes classes estatísticas ( $p < 0,05$ ), de acordo com uma ANOVA simples, seguida por teste de Tukey.

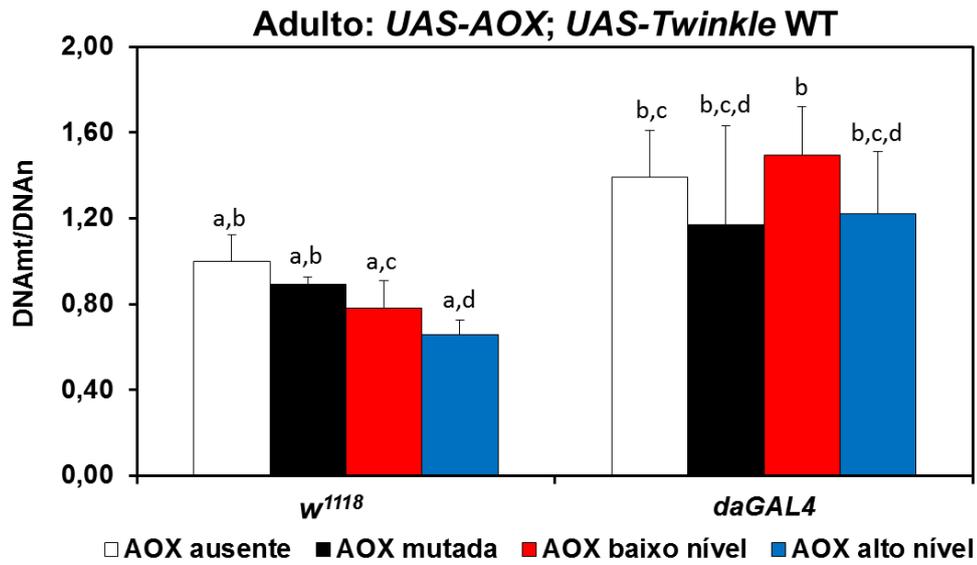
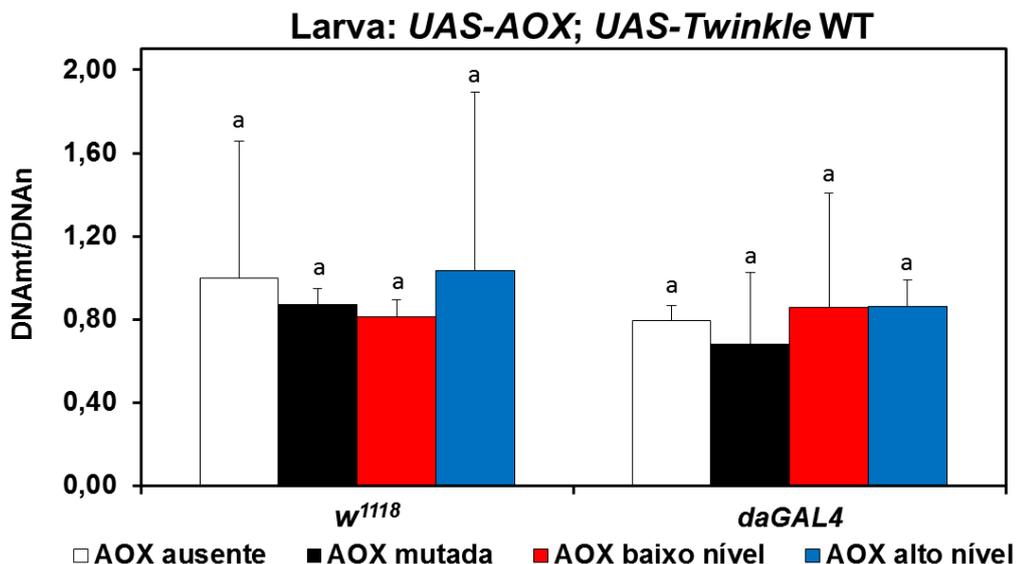
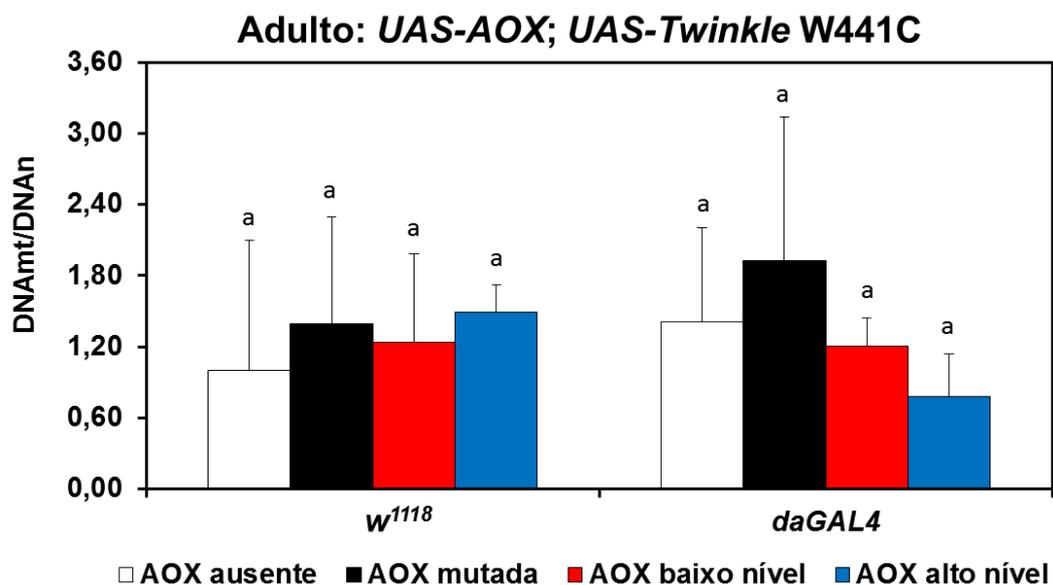


Figura 14. Larvas expressando Twinkle WT não apresentaram variação no nível relativo de DNAm<sub>t</sub> na presença ou ausência de AOX. A quantidade relativa de DNAm<sub>t</sub> foi calculada a partir dos resultados de  $\Delta\Delta C_t$  usando como referência o DNA total de um *pool* de adultos *w<sup>1118</sup>*. Todos os valores foram normalizados pela linhagem *UAS-empty<sup>2nd</sup>; UAS-Twinkle WT x w<sup>1118</sup>*. AOX ausente, AOX mutada, AOX em baixo nível e AOX em alto nível correspondem, respectivamente, aos genótipos: *UAS-empty<sup>2nd</sup>*; *UAS-AOXmut<sup>2nd</sup>*; *UAS-AOXwt<sup>β.1</sup>*; *UAS-AOX<sup>F6</sup>* combinados à superexpressão de Twinkle WT. Os dados representam médias de três repetições biológicas e as barras de erro, o desvio padrão. Letra “a” representa a mesma classe estatística ( $p < 0,05$ ), de acordo com uma ANOVA simples, seguido por teste de Tukey.



Para as linhagens W441C, associada às diferentes formas da AOX, o número relativo de cópias de DNAm<sub>t</sub> em adultos não variou entre as moscas expressando tal mutação e os cruzamentos controle (Figura 15). Esse resultado é consistente com o fenótipo dessas moscas, que aparentam ter desenvolvimento tão normal quanto as linhagens Twinkle WT. Apesar de mais repetições técnicas e biológicas precisarem ser feitas para garantir os resultados da Figura 15, estes no momento mostram que os níveis de DNAm<sub>t</sub> não sobem nas linhagens que expressam W441C, assim como ocorre para a superexpressão da Twinkle WT em larvas. AOX expressa em grandes quantidades (*UAS-AOX<sup>F6</sup>*; *UAS-Twinkle W441C x daGAL4*) parece reduzir o número de cópias do DNAm<sub>t</sub>, mas esta diferença não é estatisticamente significativa.

Figura 15 – Adultos Twinkle W441C não apresentaram variação no número relativo de cópias de DNAm<sub>t</sub>, na presença ou ausência de AOX. A quantidade relativa de DNAm<sub>t</sub> foi calculada a partir dos resultados de  $\Delta\Delta C_t$  usando como referência o DNA total de um *pool* de adultos *w<sup>1118</sup>*. Todos os valores foram normalizados pela linhagem *UAS-empty<sup>2nd</sup>*; *UAS-Twinkle W441C x w<sup>1118</sup>*. AOX ausente, AOX mutada, AOX em baixo nível e AOX em alto nível correspondem, respectivamente, aos genótipos: *UAS-empty<sup>2nd</sup>*; *UAS-AOXmut<sup>2nd</sup>*; *UAS-AOXwt<sup>8.1</sup>*; *UAS-AOX<sup>F6</sup>* combinados à mutação W441C na Twinkle. Os dados representam médias de três repetições biológicas e as barras de erro, o desvio padrão. Letra “a” representa a mesma classe estatística ( $p < 0,05$ ), de acordo com uma ANOVA simples, seguido por teste de Tukey.



Larvas L3 expressando a mutação A442P na Twinkle tiveram uma depleção significativa no número de cópias de DNAm<sub>t</sub> e, assim como para Twinkle WT, AOX não interferiu nos resultados (Figura 16). No caso do mutante severo K388A, no entanto, não foi constatada a diminuição esperada do número relativo de cópias de DNAm<sub>t</sub> para larvas provenientes do cruzamento com *daGAL4* (Figura 17), quando

os dados foram normalizados pela quantidade de DNAm<sub>t</sub> em *UAS-empty*<sup>2<sup>nd</sup></sup>; *UAS-Twinkle* K388A x *w*<sup>1118</sup>. Quando os valores foram normalizados pelos dados de *UAS-empty*<sup>2<sup>nd</sup></sup>; *UAS-Twinkle* WT x *w*<sup>1118</sup>, é observado então que os níveis de DNAm<sub>t</sub> nas linhagens *UAS-AOX*; *UAS-Twinkle* K388A são extremamente baixos, mesmo nos cruzamentos com *w*<sup>1118</sup> (Figura 18). Novos experimentos precisam ser conduzidos para confirmar se as linhagens *UAS-AOX*; *UAS-Twinkle* K388A x *w*<sup>1118</sup> realmente têm um número de cópias do DNAm<sub>t</sub> tão baixo quanto aquelas cruzadas com *daGAL4*, o que parece ser inconsistente com o fato do desenvolvimento destas linhagens controles não ser prejudicado (Figura 11).

Figura 16 – Larvas expressando A442P apresentaram aparente depleção no número relativo cópias de DNAm<sub>t</sub>. Observa-se que mesmo na presença de AOX funcional, larvas expressando a mutação A442P não apresentaram melhora frente à depleção causada pela mutação na Twinkle. A quantidade relativa de DNAm<sub>t</sub> foi calculada usando como referência o *pool* genético de moscas *w*<sup>1118</sup>. Todos os valores foram normalizados pela linhagem *UAS-empty*<sup>2<sup>nd</sup></sup>; *UAS-Twinkle* A442P x *w*<sup>1118</sup>. AOX ausente, AOX mutada, AOX em baixo nível e AOX em alto nível correspondem, respectivamente, aos genótipos: *UAS-empty*<sup>2<sup>nd</sup></sup>; *UAS-AOXmut*<sup>2<sup>nd</sup></sup>; *UAS-AOXwt*<sup>8.1</sup>; *UAS-AOX*<sup>F6</sup> combinados à mutação A442P na Twinkle. Os dados representam médias de três repetições biológicas e as barras de erro, o desvio padrão. Letras de a-c representam diferentes classes estatísticas ( $p < 0,05$ ), de acordo com a ANOVA simples, seguido por teste de Tukey.

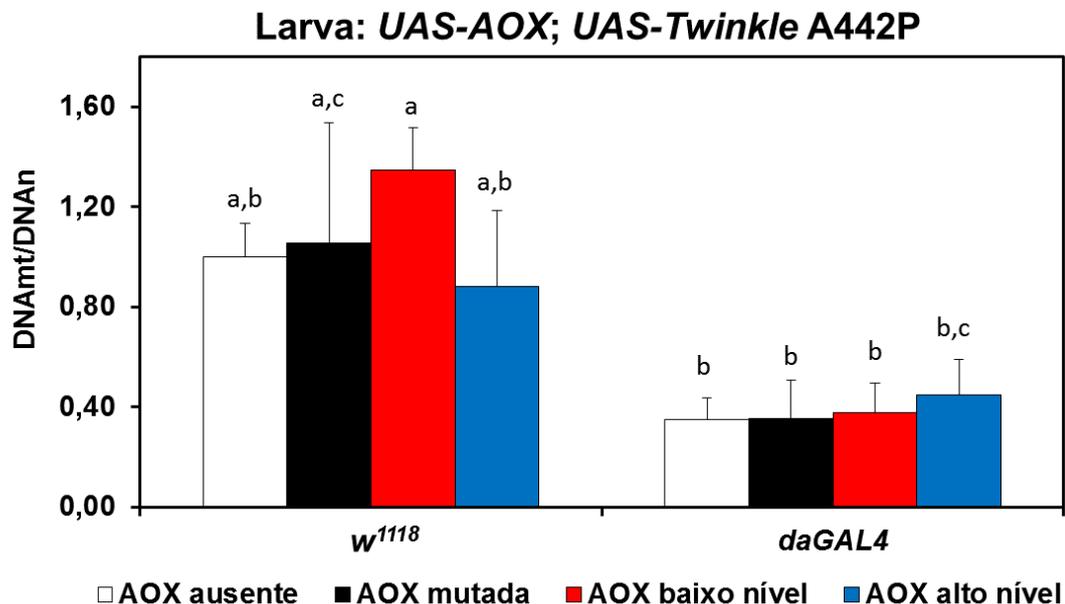


Figura 17 – Queda na quantidade relativa de DNAmT não foi observada para as linhagens expressando a mutação severa K388A da Twinkle. A quantidade relativa de DNAmT foi calculada a partir dos resultados de  $\Delta\Delta Ct$  usando como referência o DNA total de um *pool* de adultos  $w^{1118}$ . Todos os valores foram normalizados pela linhagem  $UAS-empty^{2nd}; UAS-Twinkle$  K388A x  $w^{1118}$ . AOX ausente, AOX mutada, AOX em baixo nível e AOX em alto nível correspondem, respectivamente, aos genótipos:  $UAS-empty^{2nd}$ ;  $UAS-AOXmut^{2nd}$ ;  $UAS-AOXwt^{8.1}$ ;  $UAS-AOX^{F6}$  combinados à mutação K388A na Twinkle. Os dados representam médias de três repetições biológicas e as barras de erro, o desvio padrão. Letras “a” e “b” representam diferentes classes estatísticas ( $p < 0,05$ ), de acordo com a ANOVA simples, seguido por teste de Tukey.

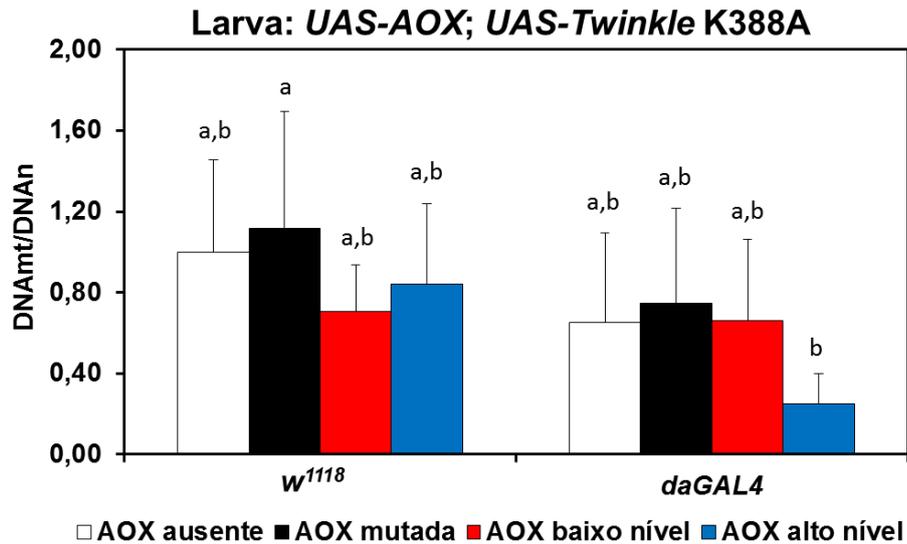
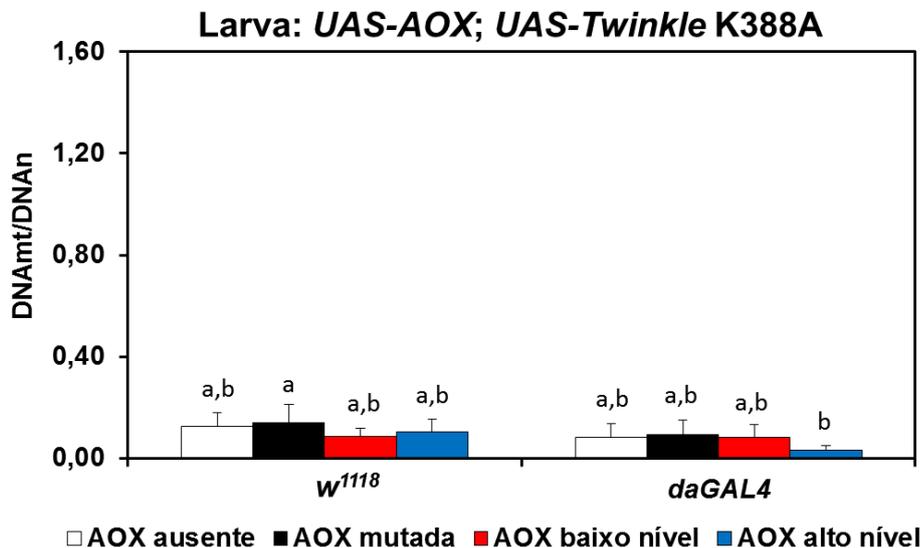


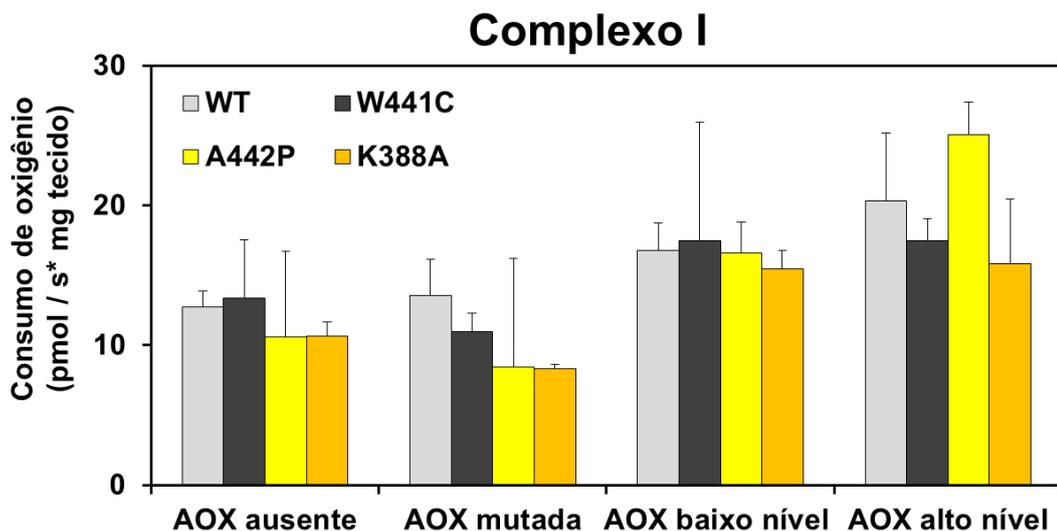
Figura 18. Baixos níveis de DNAmT para as linhagens  $UAS-AOX$ ;  $UAS-Twinkle$  K388A quando normalizadas pelo valor de  $UAS-empty^{2nd}; UAS-Twinkle$  WT x  $w^{1118}$  em larva. A quantidade relativa de DNAmT foi calculada a partir dos resultados de  $\Delta\Delta Ct$  usando como referência o DNA total de um *pool* de adultos  $w^{1118}$ . Todos os valores foram normalizados pela linhagem  $UAS-empty^{2nd}; UAS-Twinkle$  WT x  $w^{1118}$  (Figura 14). AOX ausente, AOX mutada, AOX em baixo nível e AOX em alto nível correspondem, respectivamente, aos genótipos:  $UAS-empty^{2nd}$ ;  $UAS-AOXmut^{2nd}$ ;  $UAS-AOXwt^{8.1}$ ;  $UAS-AOX^{F6}$  combinados à mutação K388A na Twinkle. Os dados representam médias de três repetições biológicas e as barras de erro, o desvio padrão. Letras “a” e “b” são diferentes classes estatísticas ( $p < 0,05$ ), de acordo com a ANOVA simples, seguido por teste de Tukey. Note a diferença entre os valores apresentados na Figura 14.



#### 5.4 A respiração mitocondrial não é afetada pela superexpressão de Twinkle e nem pela atividade da AOX

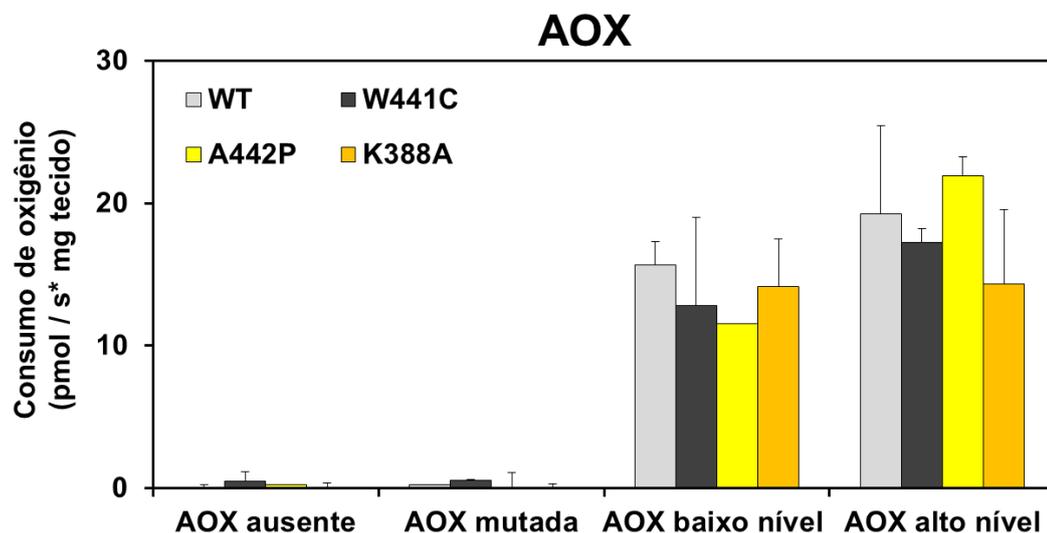
Embora a enzima AOX não tenha sido eficaz na melhora do fenótipo causado pelos mutantes mais severos da Twinkle (A442P e K388A) e não tenha afetado o número de cópias do DNAm<sub>t</sub>, resolvemos testar se a sua ação poderia afetar bioquimicamente a CR, que é prejudicada nesses tipos de mutações (SANCHEZ-MARTINEZ et al., 2012). Ao adicionar piruvato, prolina, malato e ADP às amostras de larvas L3, há a produção de NADH, que fornece elétrons ao CI da CR, iniciando-se um fluxo de elétrons que leva ao consumo de oxigênio pelo CIV e formação de ATP pela ATP-sintase (GNAIGER et al., 2012). Diferentemente do esperado, os resultados para a respiração associada à oxidação de substrato pelo CI demonstram que a expressão das diferentes formas da Twinkle, seja tipo selvagem ou mutante, não afeta significativamente a CR em drosófila na fase larval. AOX não altera estes parâmetros, apesar de não se poder ignorar o fato de haver um aparente aumento no consumo de oxigênio quando AOX funcional é expressa, principalmente em maiores níveis (Figura 20).

Figura 20 – Expressão das diferentes variações da Twinkle não altera a respiração mitocondrial relacionada ao CI. Nota-se um aparente aumento na respiração ligado à expressão de AOX funcional, que não é estatisticamente significativo. A respiração de larvas L3 provenientes de cruzamentos com *daGAL* foi calculada como o consumo médio de oxigênio após a adição de piruvato, prolina, malato e ADP, seguido por inibição com antimicina A e rotenona. AOX ausente, AOX mutada, AOX em baixo nível e AOX em alto nível correspondem, respectivamente, aos genótipos: *UAS-empty*<sup>2<sup>nd</sup></sup>; *UAS-AOXmut*<sup>2<sup>nd</sup></sup>; *UAS-AOXwt*<sup>8.1</sup>; *UAS-AOX*<sup>F6</sup> combinados às diferentes formas de Twinkle indicadas na imagem.



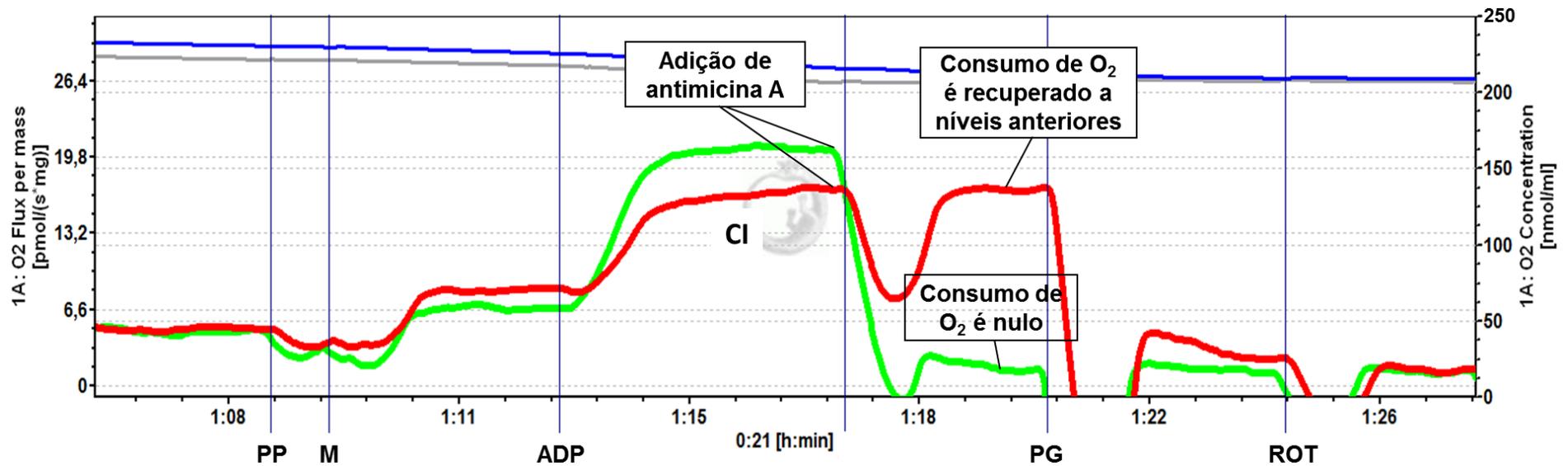
Conforme era esperado, após inibição do CIII pela adição de antimicina A, o consumo médio de oxigênio foi mantido em todas as linhagens expressando AOX funcional (Figura 21), comprovando então sua ação enzimática de oxidação do ubiquinol e redução do oxigênio molecular a água (MACDONALD; VANLERBERGHE; STAPLES, 2009; MOORE; SIEDOW, 1991). Além disso, embora não seja estatisticamente significativo, observa-se aparente tendência ao aumento de consumo de oxigênio resistente à antimicina A naquelas linhagens que expressam AOX em maiores níveis, apesar deste aumento não ser proporcional ao nível da enzima nas amostras (Figura 9 e Andjelkovic et al 2015). Já as linhagens que não expressam AOX funcional (AOX ausente ou mutada) ou que foram cruzadas com machos controle  $w^{1118}$  (APÊNDICE E) apresentaram consumo de oxigênio praticamente nulo nessas condições.

Figura 21 – Atividade da AOX (respiração resistente à antimicina A) em larvas L3 de linhagens expressando AOX funcional (em baixo ou alto nível), ou AOX não funcional (ausente ou mutada), provenientes de cruzamentos com machos *daGAL*. Os valores foram calculados como o consumo médio de oxigênio após a adição de piruvato, prolina, malato, ADP e antimicina A, seguido por inibição com propil-galato e rotenona. AOX ausente, AOX mutada, AOX em baixo nível e AOX em alto nível correspondem, respectivamente, aos genótipos: *UAS-empty*<sup>2nd</sup>; *UAS-AOXmut*<sup>2nd</sup>; *UAS-AOXwt*<sup>8.1</sup>; *UAS-AOX*<sup>F6</sup> combinados às diferentes formas de Twinkle indicadas na imagem.



Interessantemente, a atividade respiratória mitocondrial das linhagens expressando AOX funcional em maior ou menor quantidade na ausência ou presença de antimicina A foi muito semelhante (Figuras 20-22), indicando uma manutenção quase total do consumo médio de oxigênio pela presença de AOX após o bloqueio do fluxo de elétrons pelo eixo do citocromo c (CIII e CIV).

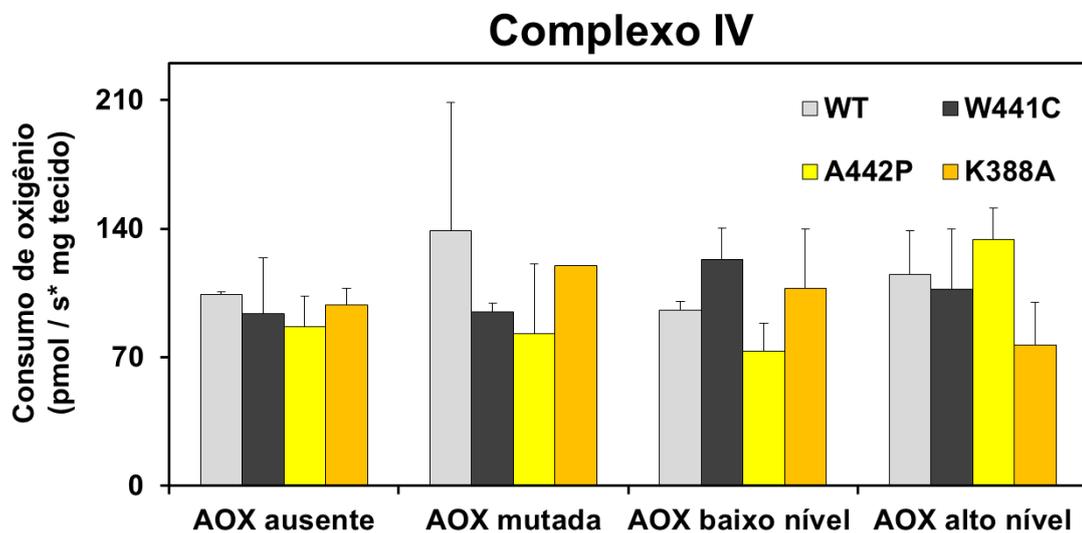
Figura 22 – Exemplo de experimento mostrando a manutenção da respiração mitocondrial em uma linhagem expressando AOX após bloqueio do fluxo de elétrons pelos complexos III e IV. Após adição de piruvato, prolina (PP), malato (M) e ADP, tem-se a respiração relacionada ao CI. Ao adicionar antimicina A, esta taxa cai de modo acentuado naquelas linhagens que não expressam AOX funcional ou que são provenientes de cruzamentos com machos  $w^{1118}$  (linha em verde). Contudo, observa-se uma manutenção no consumo de oxigênio pela presença de AOX funcional (em maior ou menor nível) após adição de antimicina A em linhagens provenientes de cruzamentos com machos *daGAL4* (linha em vermelho). Com a adição de propil-galato (PG) e o consequente bloqueio da atividade da AOX, o consumo de oxigênio torna-se nulo em ambas as linhagens. A adição de rotenona (ROT) bloqueia o CI, abolindo totalmente o fluxo de elétrons pela CR. Esses dados são referentes à linhagem *UAS-AOXwt<sup>8.1</sup>*; *UAS-Twinkle* WT cruzada com machos controle  $w^{1118}$  ou *daGAL4*, entretanto, o mesmo padrão de manutenção do consumo oxigênio pela presença de AOX funcional foi observado para as demais linhagens *UAS-AOX*; *UAS-Twinkle*. Linhas azul e cinza: concentração de  $O_2$  (nmol/ml).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Testamos também a atividade do CIV isoladamente pela adição de TMPD e ascorbato e quantificação do consumo de oxigênio (Figura 23). Assim como para CI, foi observado que a superexpressão das Twinkles não afetou o CIV, visto que um padrão semelhante também foi encontrado para as linhagens provenientes de machos controle  $w^{1118}$ , nas quais não há expressão da AOX ou da Twinkle (APÊNDICE F).

Figura 23 – Atividade do CIV em larvas L3, provenientes de cruzamentos com machos *daGAL*, após inibição dos complexos I, III e da AOX. Os valores foram calculados como o consumo médio de oxigênio após a adição de TMPD e ascorbato, seguido por inibição por cianeto de potássio. AOX ausente, AOX mutada, AOX em baixo nível e AOX em alto nível correspondem, respectivamente, aos genótipos: *UAS-empty<sup>2nd</sup>*; *UAS-AOXmut<sup>2nd</sup>*; *UAS-AOXwt<sup>8.1</sup>*; *UAS-AOX<sup>F6</sup>* combinados às diferentes formas de Twinkle indicadas na imagem.



## 6 DISCUSSÃO

Alterações genéticas responsáveis por afetar diretamente o replissomo mitocondrial estão intimamente relacionadas a diminuições no número de cópias do DNAm<sub>t</sub>, assim como observado nos mutantes A442P e K388A da Twinkle associados às diferentes formas da AOX (Figuras 16 e 18). Tal depleção no DNAm<sub>t</sub> poderia explicar a letalidade fenotípica encontrada tanto na fase larval do mutante K388A (Figura 11A), quanto nas fases larval/pupal do mutante A442P (Figura 12), como já relatado anteriormente (SANCHEZ-MARTINEZ et al., 2012). Isso se deve ao fato do DNAm<sub>t</sub> codificar subunidades centrais para o funcionamento dos complexos I, III, IV e V da CR e que, portanto, sua correta replicação e manutenção em número de cópias mostra-se essencial à OXPHOS (SPINAZZOLA; ZEVIANI, 2005). Corroborando esta ideia, Sanchez-Martinez et al. (2012), ao avaliar a oxidação do citocromo c e o fluxo de elétrons pelo CIV, relataram uma deficiência no processo de OXPHOS relacionada aos mutantes A442P e K388A da Twinkle, mostrando uma das consequências causadas por danos na helicase mitocondrial que poderiam estar prejudicando essas moscas. Já as linhagens expressando a mutação W441C e quaisquer uma das formas da AOX apresentaram taxa de emergência semelhante às linhagens Twinkle WT, não havendo prejuízo em nenhuma das fases do desenvolvimento (Figura 10A), corroborando dados anteriores (SANCHEZ-MARTINEZ et al., 2012). Provavelmente isso se deve ao fato do mutante W441C não alterar significativamente o número de cópias do DNAm<sub>t</sub>, não prejudicando por exemplo a OXPHOS, diferentemente do que foi observado nos outros mutantes da Twinkle (SANCHEZ-MARTINEZ et al., 2012). É interessante observar que a mesma mutação em humanos (W474C) está relacionada ao desenvolvimento/desencadeamento de doença mitocondrial (SPELBRINK et al., 2001), indicando que este resíduo de triptofano tem papel diferente no funcionamento das enzimas de drosófila e de humanos, apesar de ser altamente conservado em espécies animais (SANCHEZ-MARTINEZ et al., 2012).

Em relação ao mutante K388A, cuja substituição de aminoácido é extremamente deletéria ao funcionamento da Twinkle (IKEDA et al., 2015; MATSUSHIMA; KAGUNI, 2007), foi constatada queda no número de cópias do DNAm<sub>t</sub> apenas quando os dados são normalizados por *UAS-empty*<sup>2<sup>nd</sup></sup>; *UAS-Twinkle*

WT x  $w^{1118}$  (Figura 18). Esta queda foi observada inclusive para as linhagens controles *UAS-AOX*; *UAS-Twinkle* K388A x  $w^{1118}$ , e não ficou evidenciada para as linhagens *UAS-AOX*; *UAS-Twinkle* K388A x *daGAL4* quando os dados foram normalizados por *UAS-empty*<sup>2nd</sup>; *UAS-Twinkle* K388A x  $w^{1118}$  (Figura 17). Especula-se que a construção *UAS-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 esteja afetando então o número de cópias do DNAmT, mas sem prejudicar o desenvolvimento das linhagens (Figuras 10B e 11B). Tal fenômeno já foi visto em células humanas e de drosófila em cultura, em que houve redução no número de cópias de DNAmT mesmo na ausência do indutor de expressão desta mutação (MATSUSHIMA; KAGUNI, 2007; POHJOISMÄKI; GOFFART; SPELBRINK, 2011). Porém, novas repetições biológicas e técnicas serão realizadas a fim de se obter dados mais consolidados sobre a quantidade de DNAmT para o mutante K388A associado às diferentes formas da AOX.

Devido à redução no número de cópias de DNAmT nos mutantes A442P e K388A da Twinkle, esperava-se como consequência uma queda na função da OXPHOS, assim como foi observado em extrato mitocondrial proveniente de larvas inteiras de drosófila (SANCHEZ-MARTINEZ et al., 2012). Contudo, ao dissecarmos as larvas e utilizarmos a parede corpórea do organismo, contendo basicamente tecidos muscular e nervoso, não encontramos danos no consumo de oxigênio vinculado às atividades do CI e CIV da CR, quando as Twinkles mutantes foram expressas (Figuras 20 e 23). Tal resultado levanta a hipótese de que danos causados por disfunções na Twinkle talvez não afetem necessariamente os tecidos de alta demanda energética mais tradicionais, mas sim aqueles envolvidos nas vias metabólicas endócrinas de ativação da passagem da fase de larva para pupa, considerando que as larvas mutantes continuam ativas por cerca de nove dias após o período em que deveriam se tornar pupas. De acordo com tal hipótese, dados preliminares mostram que a expressão de Twinkle A442P e K388A somente nos tecidos muscular ou nervoso (através de cruzamentos com *mhcGAL4* e *elavGAL4*, respectivamente) promove um desenvolvimento normal dos indivíduos, que chegam à fase adulta com taxas tão altas quanto os controles (CAMARGO, 2017,

comunicação pessoal<sup>1</sup>). Desse modo, ao dissecar a larva, removemos grande parte da hemolinfa, discos imaginais, intestino e outros tecidos, como a glândula anelar e células neurosecretoras do cérebro, responsáveis pela produção dos hormônios desencadeadores da metamorfose (hormônios juvenil e ecdisona, respectivamente) (FLANAGAN et al., 1988). Muito provavelmente, as Twinkles mutantes não causam defeitos na OXPPOS de tecidos constituintes da parede corpórea larval, explicando os resultados fornecidos pelas figuras 20 e 23.

Embora na maioria dos estudos já publicados a expressão transgênica da AOX tenha se mostrado eficiente na melhora de diversos fenótipos deletérios associados a disfunções mitocondriais (DASSA et al., 2009; EL-KHOURY et al., 2016; FERNANDEZ-AYALA et al., 2009; HAKKAART et al., 2005; HUMPHREY et al., 2012; KEMPPAINEN et al., 2014a), os resultados fenotípicos e moleculares mostrados neste projeto de mestrado evidenciam que a expressão de uma via alternativa de elétrons não é capaz de ajudar os fenótipos causados por mutações na Twinkle. É importante ressaltar também a possibilidade da expressão da AOX estar agravando a viabilidade dos mutantes A442P, pois quando AOX estava presente em altos níveis (via *UAS-AOX<sup>F6</sup>*), não foi observada sequer a formação de pupas (Figura 12), assim como em qualquer combinação da AOX no mutante K388A. Sanchez-Martinez et al. (2012) propõem que as mutações na Twinkle possam desencadear um processo de apoptose irregular na fase larval de drosófila, pois os níveis de caspase 3 aumentam significativamente nos mutantes K388A (~60%) e A442P (~10%). Desse modo, é possível especular que a presença de altos níveis de AOX nos mutantes A442P possa aumentar o desencadeamento da apoptose a níveis semelhantes à mutação severa K388A. Por ser uma enzima que não bombeia prótons através da membrana interna da mitocôndria, AOX tem o potencial de alterar o potencial de membrana mitocondrial, que influenciaria o processo apoptótico em mitocôndrias já afetadas por Twinkle A442P.

Era esperado que a expressão da enzima AOX funcional em drosófilas mutantes da Twinkle fosse eficaz na melhora fenotípica, visto que em linhagens com o *knockdown* da subunidade catalítica da Pol  $\gamma$ , AOX foi capaz de remediar disfunções na locomoção, na degeneração de neurônios dopaminérgicos e no envelhecimento precoce em drosófila (HUMPHREY et al., 2012). Em outras

---

<sup>1</sup>Comunicação pessoal do doutorando André Ferreira de Camargo, em maio de 2017, obtida por meio de experimentos realizados em paralelo a este projeto de mestrado.

palavras, mesmo afetando a DNA polimerase constituinte do replissomo mitocondrial e, conseqüentemente, a produção das proteínas codificadas pelo DNAm, este defeito mitocondrial foi amenizado significativamente pela presença de AOX, diferentemente do que se observa aqui para os mutantes A442P e K388A da Twinkle. Sabe-se que a replicação do DNAm ocorre *in vitro* utilizando um replissomo mitocondrial mínimo de apenas três proteínas recombinantes, Pol  $\gamma$ , mtSSB e Twinkle (CIESIELSKI; OLIVEIRA; KAGUNI, 2016; OLIVEIRA; GARESSE; KAGUNI, 2010). Contudo, a replicação *in vivo* ocorre dentro de estruturas denominadas “nucleóides”, sendo um processo complexo e pouco compreendido, envolvendo a associação do DNAm à TFAM, enzimas metabólicas, chaperonas, proteínas intramitocondriais relacionadas à síntese proteica, dentre outras (SPELBRINK, 2010). Além disso, recentemente foi descoberto que Twinkle tem atividade de recombinase *in vitro*, além de helicase (SEN; GAYATRI; PATEL, 2016), e que sua superexpressão em camundongos previne o acúmulo de mutações no DNAm (POHJOISMÄKI et al., 2013). Desse modo, a ação da Pol  $\gamma$  e da Twinkle no funcionamento mitocondrial em geral e suas implicações na fisiologia animal podem ser diferentes, apesar dessas enzimas estarem envolvidas no mesmo processo de replicação do DNAm. Entretanto, vale ressaltar que as estratégias usadas para modelar defeitos na Pol  $\gamma$  e na Twinkle foram diferentes: *knockdown* e superexpressão de alelos mutantes, respectivamente. Portanto, os possíveis efeitos da expressão de AOX em linhagens com disfunções nos componentes do replissomo mitocondrial deverão ser quantificados em situações genéticas equivalentes, para se ter uma conclusão mais precisa sobre os limites de ação desta enzima alternativa.

Recentemente, foi mostrado que AOX também é incapaz de remediar o fenótipo prejudicial causado por danos na maquinaria de síntese proteica intramitocondrial (KEMPPAINEN et al., 2014b). Mutantes do gene *tko* (*technical knockout*), responsável por codificar uma proteína ribossômica mitocondrial S12 defeituosa, possuem sensibilidade a convulsões induzidas e atraso no desenvolvimento, além de fenótipos relacionados a doenças em humanos, tais como problemas auditivos (LEE; WU, 2002; TOIVONEN et al., 2001). Uma das hipóteses para explicar a ineficácia da AOX no resgate de moscas mutantes *tko* é baseada na ideia de que o CI da CR é aquele que mais sofre pela ação de um ribossomo

mitocondrial defeituoso, pois 7 das 13 proteínas codificadas pelo DNAm<sub>t</sub> são subunidades essenciais ao funcionamento correto deste complexo (KEMPPAINEN et al., 2014b). Já que os mutantes K388A e A442P da Twinkle teoricamente estão prejudicando a replicação correta do DNAm<sub>t</sub> e, conseqüentemente, a transcrição e síntese de proteínas constituintes da OXPHOS, é possível que eles estejam afetando o CI do mesmo modo que se observa em moscas mutantes *tko*, porém, com maior agravamento nos órgãos desencadeadores da metamorfose. Desse modo, a adição de uma oxidase alternativa na cadeia transportadora de elétrons contornaria somente os complexos III e IV potencialmente prejudicados, e o CI juntamente com sua atividade de NADH desidrogenase continuariam disfuncionais. Neste caso, era de se esperar que problemas com a Pol  $\gamma$  também não fossem remediados pela presença de AOX, mas, no entanto, estes o são (HUMPHREY et al., 2012). O uso da energia da hidrólise do ATP para realizarem suas funções pode ser um fator em comum entre a Twinkle e o ribossomo mitocondrial, ausente na Pol  $\gamma$ . Como discutido acima, o fato da AOX não realizar o bombeamento de prótons através da membrana mitocondrial interna (MACDONALD; VANLERBERGHE; STAPLES, 2009; MOORE; SIEDOW, 1991) poderia resultar na diminuição do gradiente eletroquímico e, conseqüentemente, prejudicar a formação de ATP pelo CV. Logo, a possível queda nos níveis de ATP causada pela AOX, mesmo que apenas marginalmente, poderia afetar enzimas que dependem da hidrólise desta molécula energética para seu funcionamento, como no caso da Twinkle e do ribossomo mitocondrial. Portanto, futuros estudos deveriam investigar estas diferenças na eficácia da AOX, para que o uso desta como possível enzima terapêutica, assim como se tem sido proposto, seja implementado de forma cautelosa e prudente.

## 7 CONCLUSÕES

Os resultados das análises fenotípicas, bioquímicas e moleculares descritas neste trabalho apontaram que a expressão transgênica da AOX em um organismo modelo amplamente utilizado não foi capaz de melhorar satisfatoriamente os efeitos prejudiciais causados pela ação de uma Twinkle mutante, apresentando então certas limitações para o tratamento de determinadas disfunções mitocondriais usando AOX. Contudo, o aumento no nível de DNAmT relacionado à superexpressão de Twinkle WT em moscas adultas evidenciam um importante papel desta enzima na fisiologia do organismo, que desperta forte interesse na continuação da pesquisa com esta enzima.

## REFERÊNCIAS

- ANDJELKOVIC, A. et al. Diiron centre mutations in *Ciona intestinalis* alternative oxidase abolish enzymatic activity and prevent rescue of cytochrome oxidase deficiency in flies. **Scientific Reports**, London, v. 5, n. 18295, p. 1-9, 2015. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/srep18295.pdf>>. Acesso em: 5 abril 2017.
- BERNARD, G. et al. Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 120, n. 5, p. 838-848, 2007. Disponível em: <<http://jcs.biologists.org/content/120/5/838.long>>. Acesso em: 9 dezembro 2016.
- CHINNERY, P. F. Mitochondrial DNA in *Homo sapiens*. **Nucleic Acids and Molecular Biology**, New York, v. 18, p. 03-15, 2006.
- CHINNERY, P. F.; SCHON, E. A. Mitochondria. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, London, v. 74, n. 9, p. 1188-1119, 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1738655/pdf/v074p01188.pdf>>. Acesso em: 4 outubro 2016.
- CIESIELSKI, G. L.; OLIVEIRA, M. T.; KAGUNI, L. S. Animal Mitochondrial DNA Replication. In: KAGUNI, L. S.; OLIVEIRA, M. T. (Ed.). **The Enzymes**. New York: Academic Press, 2016. p. 255-292.
- DASSA, E. P. et al. Expression of the alternative oxidase complements cytochrome c oxidase deficiency in human cells. **EMBO Molecular Medicine**, Chichester, v. 1, n. 1, p. 30-36, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3378104/>>. Acesso em: 9 março 2017.
- EL-KHOURY, R. et al. Expression of the alternative oxidase mitigates beta-amyloid production and toxicity in model systems. **Free Radical Biology and Medicine**, Philadelphia, v. 96, p. 57-66, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584916300259?via%3Dihub>>. Acesso em: 5 março 2017.

ERNSTER, L.; SCHATZ, G. Mitochondria: A historical review. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 91, n. 3, p. 227-255, 1981. Disponível em: <<http://jcb.rupress.org/content/91/3/227s.long>>. Acesso em: 2 fevereiro 2017.

FERNANDEZ-AYALA, D. J. et al. Expression of the *Ciona intestinalis* alternative oxidase (AOX) in *Drosophila* complements defects in mitochondrial oxidative phosphorylation. **Cell Metabolism**, Cambridge, v. 9, n. 5, p. 449-460, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1550413109000643?via%3Dihub>>. Acesso em: 25 setembro 2016.

FERNANDEZ-MILLÁN, P. et al. The hexameric structure of the human mitochondrial replicative helicase Twinkle. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 43, n. 8, p. 4284-4295, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4417153/>> Acesso em: 26 setembro 2016.

FLANAGAN, T. R. et al. Neuroendocrine regulation of insect development. In: STEFFENS, G. L.; THERON, S. (Org.). **Biomechanisms Regulating Growth and Development**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1988. p. 116-135.

FREY, T. G.; MANNELLA, C. A. The internal structure of mitochondria. **Trends in biochemical sciences**, Oxford, v. 25, n. 7, p. 319-324, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968000400016091?via%3Dihub>> Acesso em: 7 dezembro 2016.

FRIEDMAN, J. R.; NUNNARI, J. Mitochondrial form and function. **Nature**, London, v. 505, p. 335-343, 2014.

FUKUOH, A. et al. Screen for mitochondrial DNA copy number maintenance genes reveals essential role for ATP synthase. **Molecular Systems Biology**, Chichester, v. 10, p. 01-21, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4265055/>>. Acesso em: 9 setembro 2016.

GIEZEN, M. V. Mitochondria and the rise of eukaryotes. **BioScience**, Washington, v. 61, n. 8, p. 594-601, 2011. Disponível em: <<https://academic.oup.com/bioscience/article/61/8/594/336975/Mitochondria-and-the-Rise-of-Eukaryotes>>. Acesso em: 8 setembro 2016.

GNAIGER, E. **Mitochondrial pathways and respiratory control: an introduction to OXPHOS analysis: Mitochondria Physiology Network**. 3<sup>rd</sup> ed. Innsbruck: OROBOROS MiPNet Publications. 2012. p. 1-64.

GORMAN, G. S. et al. Mitochondrial diseases. **Nature**, London, v. 2, p. 01-22, 2016.

GUSTAFSSON, C. M.; FALKENBERG, M.; LARSSON, N. G. Maintenance and expression of mammalian mitochondrial DNA. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 85, p. 133-160, 2016. Disponível em: <[http://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev-biochem-060815014402?url\\_ver=Z39882003&rfr\\_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3Dpubmed](http://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev-biochem-060815014402?url_ver=Z39882003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed)>. Acesso em: 8 março 2017.

HAKKAART, G. A. et al. Allotopic expression of a mitochondrial alternative oxidase confers cyanide resistance to human cell respiration. **EMBO Reports**, Chichester, v. 7, n. 3, p. 341-345, 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1456879/>>. Acesso em: 9 março 2016.

HUMPHREY, D. M. et al. Alternative oxidase rescues mitochondria-mediated dopaminergic cell loss in *Drosophila*. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 21, n. 12, p. 2698-2712, 2012. Disponível em: <<https://academic.oup.com/hmg/article-lookup/doi/10.1093/hmg/dds096>>. Acesso em: 20 agosto 2016.

IKEDA, M. et al. Overexpression of TFAM or twinkle increases mtDNA copy number and facilitates cardioprotection associated with limited mitochondrial oxidative stress. **PLoS One**, San Francisco, v. 10, n. 3, p. 1-19, 2015. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0119687&type=printable>>. Acesso em: 6 abril 2017.

JÕERS, P; JACOBS, H. T. Analysis of replication intermediates indicates that *Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA replicates by a strand-coupled theta mechanism, **PLoS One**, San Francisco, v. 8, p. 1-12, 2013. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0053249&type=printable>>. Acesso em: 7 abril 2017.

JÕERS, P. et al. Mitochondrial transcription terminator family members mTTF and mTerf5 have opposing roles in coordination of mtDNA synthesis. **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 9, n. 9, p. 00-00, 2013. DOI: 10.1371/journal.pgen.1003800. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosgenetics/article/file?id=10.1371/journal.pgen.1003800&type=printable>>. Acesso em: 4 abril 2017.

KAGUNI, L. S.; OLIVEIRA, M. T. Structure, function and evolution of the animal mitochondrial replicative DNA helicase. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, Abingdon, v. 51, n. 1, p. 53-94, 2016.

KEMPPAINEN, K. K. et al. Expression of alternative oxidase in *Drosophila* ameliorates diverse phenotypes due to cytochrome oxidase deficiency. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 23, n. 8, p. 2078-2093, 2014a. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3959817/>>. Acesso em: 10 fevereiro 2017.

KEMPPAINEN, K. K.; KEMPPAINEN, E.; JACOBS, H. T. The alternative oxidase AOX does not rescue the phenotype of *tko<sup>25t</sup>* mutant flies. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, Bethesda, v. 4, p. 2013-2021, 2014b. Disponível em: <<http://www.g3journal.org/content/4/10/2013.long>>. Acesso em: 14 fevereiro 2017.

KLUG, W. S. et al. Análise genômica: dissecação da função gênica. **Conceitos de genética**. 9. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 605-632.

KORHONEN, J. et al. Reconstitution of a minimal mtDNA replisome *in vitro*. **The EMBO Journal**, Chichester, v. 23, n. 12, p. 2423-2429, 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC423294/>>. Acesso em: 11 novembro 2016.

LANE, N.; MARTIN, W. The energetics of genome complexity. **Nature**, London, v. 467, p. 929-934, 2010. DOI: 10.1038/nature09486.

LARSSON, N. G. et al. Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. **Nature genetics**, New York, v. 18, p. 231-236, 1998. DOI: 10.1038/ng0398-231.

LEE, J.; WU, C. F. Electroconvulsive seizure behavior in *Drosophila*: analysis of the physiological repertoire underlying a stereotyped action pattern in bang-sensitive mutants. **Journal of Neuroscience**, Washington, DC, v. 22, n. 24, p. 11065-11079, 2002. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/content/22/24/11065.long>>. Acesso em: 30 outubro 2016.

LEWIS, S. C. et al. A rolling circle replication mechanism produces multimeric lariats of mitochondrial DNA in *Caenorhabditis elegans*, **PLOS Genetics**, v. 11, n. 2, p. 1-16, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4334201/>>. Acesso em: 17 maio 2017.

LONGLEY, M. J. et al. The fidelity of human DNA polymerase  $\gamma$  with and without exonucleolytic proofreading and the p55 accessory subunit. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 276, n. 42, p. 38555-38562, 2001. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/276/42/38555.long>>. Acesso em: 19 maio 2017.

MACDONALD, A. E.; VANLERBERGHE, G. C.; STAPLES, J. F. Alternative oxidase in animals: unique characteristics and taxonomic distribution. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 212, n. 16, p. 2627-2634, 2009. Disponível em: <<http://jeb.biologists.org/content/212/16/2627.long>>. Acesso em: 22 janeiro 2016.

MACDONALD, A. E. Alternative oxidase: an inter-kingdom perspective on the function and regulation of this broadly distributed 'cyanide-resistant' terminal oxidase. **Functional Plant Biology**, Clayton, v. 35, n. 7, p. 535-552, 2008. DOI: 10.1071/FP08025.

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. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 282, n. 13, p. 9436-9444, 2007. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/282/13/9436.full>>. Acesso em: 25 janeiro 2017.

MATUS-ORTEGA, M. G. et al. The alternative NADH dehydrogenase is present in mitochondria of some animal taxa. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part D: Genomics and Proteomics**, Philadelphia, v. 6, n. 3, p. 256-263, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1744117X11000141?via%3Dihub>>. Acesso em: 7 novembro 2016.

MCKINNEY, E. A.; OLIVEIRA, M. T. Replicating animal mitochondrial DNA. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 36, n. 3, p. 308-315, 2013. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/gmb/v36n3/a02v36n3.pdf>>. Acesso em: 9 setembro 2015.

MILENKOVIC, D. et al. Twinkle is an essential mitochondrial helicase required for synthesis of nascent D-loop strands and complete mtDNA replication. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 22, n. 10, p. 1983-1993, 2013. Disponível em: <<https://academic.oup.com/hmg/article-lookup/doi/10.1093/hmg/ddt051>>. Acesso em: 9 maio 2016.

MOORE, A. L.; SIEDOW, J. N. The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 2, n. 2, p. 121-140, 1991.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Fosforilação oxidativa e fotofosforilação. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. p. 731-797.

OLIVEIRA, M. T.; GARESSE, R.; KAGUNI, L. S. Animal models of mitochondrial DNA transactions in disease and ageing. **Experimental Gerontology**, Philadelphia, v. 45, n. 7-8, p. 489-502, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3320732/>>. Acesso em: 30 julho 2016.

OLIVEIRA, M. T.; KAGUNI, L. S. Functional roles of the N- and C-terminal regions of the human mitochondrial single-stranded DNA-binding protein. **PLoS One**, San Francisco, v. 5, p. 1-10, 2010. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0015379>>. Acesso em: 28 maio 2016.

OLIVEIRA, M. T.; KAGUNI, L. S. Reduced stimulation of recombinant DNA polymerase gamma and mitochondrial DNA (mtDNA) helicase by variants of mitochondrial single-stranded DNA-binding protein (mtSSB) correlates with defects in mtDNA replication in animal cells. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 286, n. 47, p. 40649-40658, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3220507/>>. Acesso em: 31 julho 2016.

PIMENTEL, E. Mitocôndria. In: CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL, S. M. (Org.). **A célula**. 3. ed. Barueri: Manole, 2013. p. 369-386.

PINZ, K. G.; BOGENHAGEN, D. F. The influence of the DNA polymerase  $\gamma$  accessory subunit on base excision repair by the catalytic subunit. **DNA Repair**, Amsterdam, v. 5, n. 1, p. 121-128, 2006. Disponível em: <[https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1568-7864\(05\)00219-3](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1568-7864(05)00219-3)>. Acesso em: 15 março 2017.

POHJOISMÄKI, J. L. et al. Overexpression of Twinkle-helicase protects cardiomyocytes from genotoxic stress caused by reactive oxygen species. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 48, n. 48, p. 19408-19413, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3845095/>>. Acesso em: 11 maio 2017.

POHJOISMÄKI, J. L.; GOFFART, S.; SPELBRINK, J. N. Replication stalling by catalytically impaired Twinkle induces mitochondrial DNA rearrangements in cultured cells. **Mitochondrion**, Amsterdam, v. 4, p. 630-634, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567724911001838>>. Acesso em: 14 abril 2017.

PROKOP, A. **A rough guide to *Drosophila* mating schemes (version 1.2)**. Nevada: University of Nevada, 2015. Disponível em: <[http://wolfweb.unr.edu/homepage/pmiura/drosophila/Roote\\_Prokop\\_SupplMat1\\_v1.2.pdf](http://wolfweb.unr.edu/homepage/pmiura/drosophila/Roote_Prokop_SupplMat1_v1.2.pdf)>. Acesso em: 16 abril 2017.

PUTIGNANI, L. et al. Characterization of a mitochondrion-like organelle in *Cryptosporidium parvum*. **Parasitology**, Cambridge, v. 129, n. 1, p. 1-18, 2004.

ROBERTS, D. B. *Drosophila melanogaster*: the model organism. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Chichester, v.121, p. 93–103, 2006. DOI: 10.1111/j.1570-8703.2006.00474.x.

RUBENSTEIN, J. L.; BRUTLAG, D; CLAYTON, D. A. The mitochondrial DNA of *Drosophila melanogaster* exists in two distinct and stable superhelical forms. **Cell**, Cambridge, v. 12, n. 2, p. 471-482, 1977.

SANCHEZ-MARTINEZ, A. et al. Modeling Pathogenic Mutations of Human Twinkle in *Drosophila* Suggests an Apoptosis Role in Response to Mitochondrial Defects. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, p. 1-11, 2012. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0043954>>. Acesso em: 18 janeiro 2017.

SAZANOV, L. A. A giant molecular proton pump: structure and mechanism of respiratory complex I. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 16, p. 1-14, 2015. DOI: 10.1038/nrm3997.

SCALETAR, B. A.; ABNEY, J. R.; HACKENBROCK, C. R. Dynamics, structure, and function are coupled in the mitochondrial matrix. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 88, n. 18, p. 8057-8061, Sept. 1991. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC52445/>>. Acesso em: 1 setembro 2016.

SEN, D.; GAYATRI, P.; PATEL, S. S. Homologous DNA strand exchange activity of the human mitochondrial DNA helicase Twinkle. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 44, n. 9, p. 1-11, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4872091/>>. Acesso em: 12 agosto 2016.

SOUZA, C. F. M. **Um estudo químico, bioquímico, histoquímico e genético-molecular de pacientes com doenças do DNA mitocondrial**. 2005. 136 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2005.

SPELBRINK, J. N. Functional organization of mammalian mitochondrial DNA in nucleoids: history, recent developments, and future challenges. **IUBMB Life**, Chichester, v. 62, n. 1, p. 19-32, 2010. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/iub.282/epdf>>. Acesso em: 18 novembro 2016.

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**, New York, v. 28, n. 3, p. 223-231, 2001.

SPINAZZOLA, A.; ZEVIANI, M. Disorders of nuclear-mitochondrial intergenomic signaling. **Gene**, Amsterdam, v. 354, p. 162-168, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378111905001769>>. Acesso em: 8 outubro 2016.

TAYLOR, R. W.; TURNBULL, D. M. Mitochondrial DNA mutations in human disease. **Nature**, London, v. 6, n. 5, p. 389-402, 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1762815/>>. Acesso em: 23 novembro 2016.

TOIVONEN, J. M. et al. Technical knockout, a *Drosophila* model of mitochondrial deafness. **Genetics**, Bethesda, v. 159, n. 1, p. 241-254, 2001. Disponível em: <<http://www.genetics.org/content/159/1/241.long>>. Acesso em: 8 fevereiro 2017.

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**, Washington, v. 102, n. 49, p. 17687-17692, 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1308896/>>. Acesso em: 9 março 2017.

TYYNISMAA, H. et al. Twinkle helicase is essential for mtDNA maintenance and regulates mtDNA copy number. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 13, n. 24, p. 3219-3227, 2004. Disponível em: <<https://academic.oup.com/hmg/article/13/24/3219/709156/Twinkle-helicase-is-essential-for-mtDNA>>. Acesso em: 14 janeiro 2016.

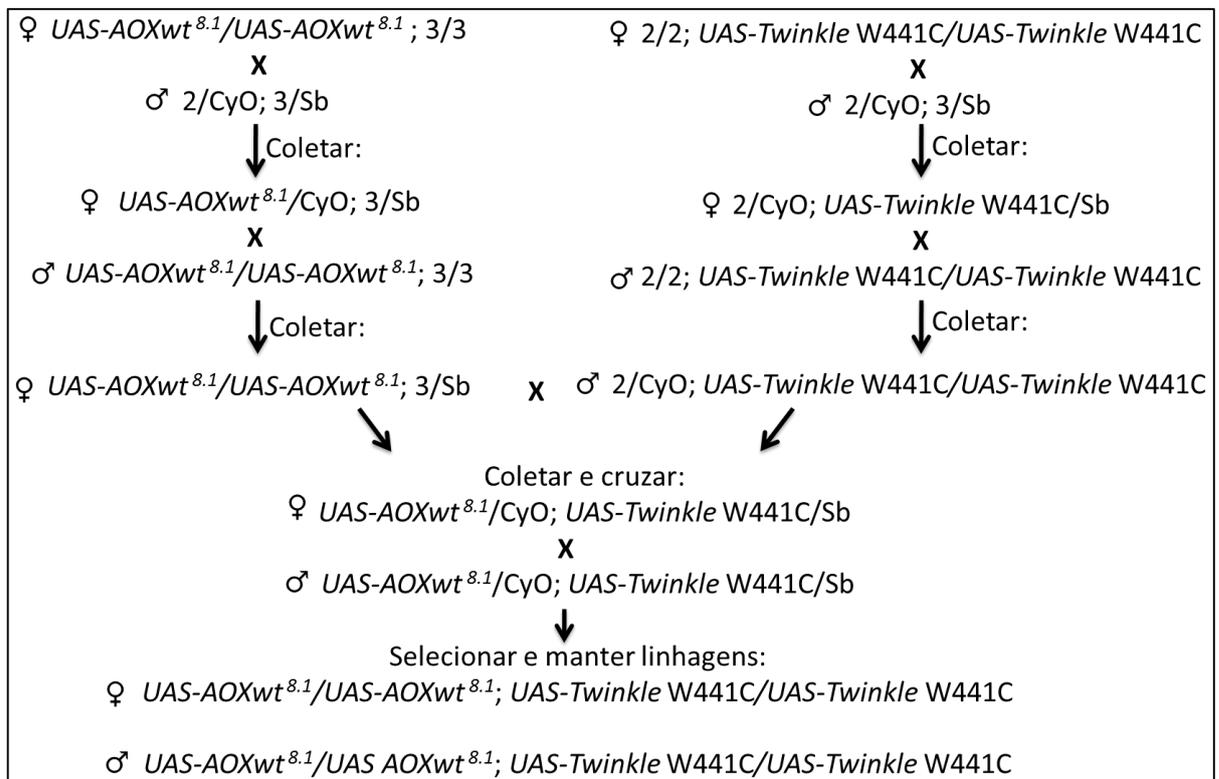
WAGNER, A. M. et al. Regulation of thermogenesis in flowering Araceae: The role of the alternative oxidase. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1777, p. 993-1000, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005272808000881?via%3Dihub>> Acesso em: 16 dezembro 2016.

ZEVIANI, M.; DONATO, D. S. Mitochondrial disorders. **Brain**, Oxford, v. 127, n. 5, p. 2153-2172, 2004. DOI: 10.1097/WCO.0b013e3282ef58cd.

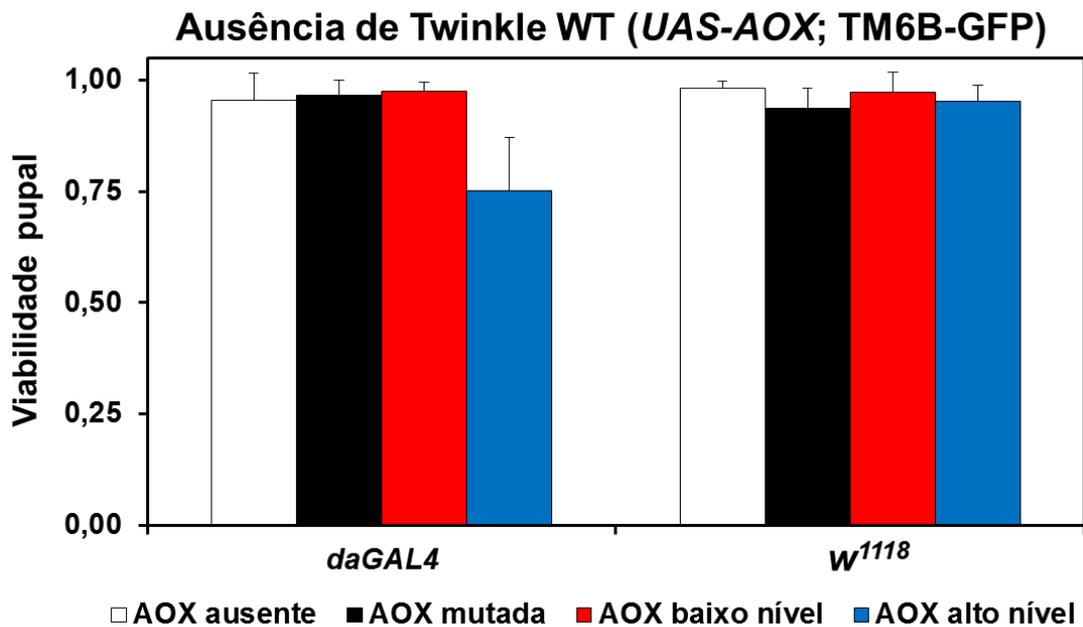
ZIEBARTH, T. D. et al. Dynamic effects of cofactors and DNA on the oligomeric state of human mitochondrial DNA helicase. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 285, n. 19, p. 14639-14647, 2010. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/285/19/14639.long>>. Acesso em: 15 março 2016.

## APÊNDICE

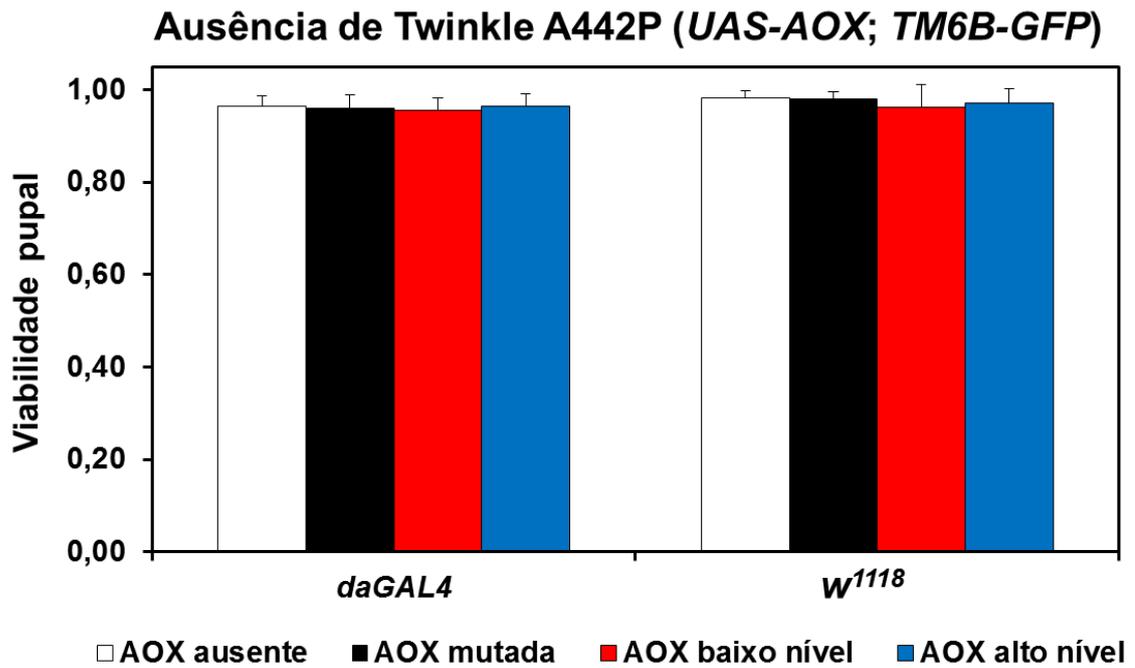
APÊNDICE A – Construção das linhagens *UAS-AOX*; *UAS-Twinkle*. Esquema mostrando cruzamentos realizados utilizando cromossomos balanceadores para construção das linhagens contendo um transgene da AOX no segundo cromossomo de *D. melanogaster*, e um transgene da Twinkle no terceiro cromossomo. CyO e Sb (TM3, Sb) representam balanceadores dos cromossomos 2 e 3, respectivamente. Foi utilizado o mesmo raciocínio para os cruzamentos envolvendo as linhagens *UAS-AOX<sup>F6</sup>*, *UAS-AOXmut<sup>2nd</sup>*, *UAS-empty<sup>2nd</sup>* e *UAS-Twinkle WT*, *UAS-Twinkle A442P* e *UAS-Twinkle K388A* (Tabela 1).



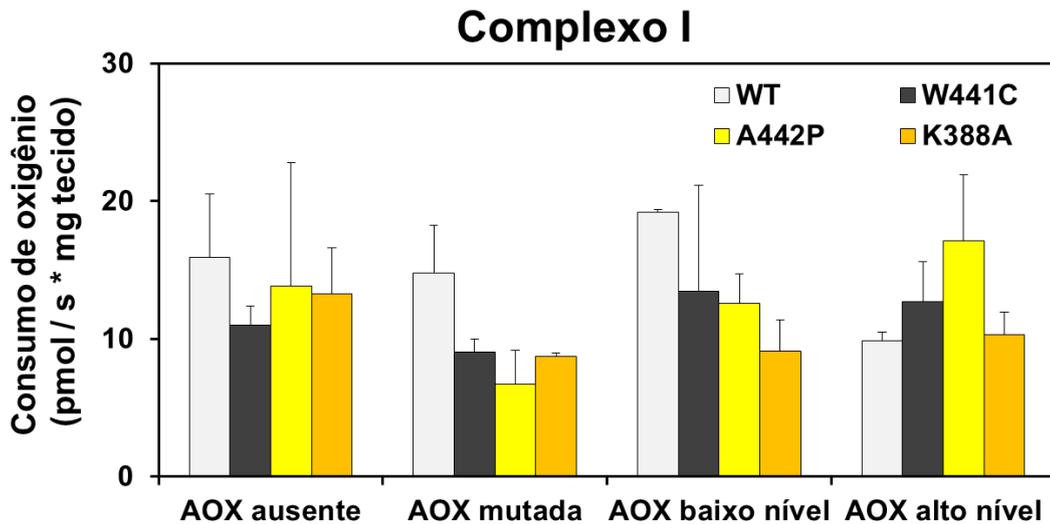
APÊNDICE B – Viabilidade pupal em linhagens que não possuem o transgene da Twinkle WT, mas carregam o transgene da AOX. À esquerda, encontram-se as linhagens provenientes de cruzamentos com machos *daGAL4* expressando apenas uma das diferentes versões da AOX e o balanceador TM6B-GFP. Nota-se que mesmo na ausência da Twinkle WT, também houve uma queda significativa na viabilidade das linhagens que expressam AOX em altos níveis (via *UAS-AOX<sup>F6</sup>*) assim como na Figura 10A. À direita, estão as linhagens provenientes de cruzamentos controle com machos *w<sup>1118</sup>*. AOX ausente, AOX mutada, AOX em baixo nível e AOX em alto nível correspondem, respectivamente, aos genótipos: *UAS-empty<sup>2nd</sup>*; *UAS-AOXmut<sup>2nd</sup>*; *UAS-AOXwt<sup>8.1</sup>*; *UAS-AOX<sup>F6</sup>*.



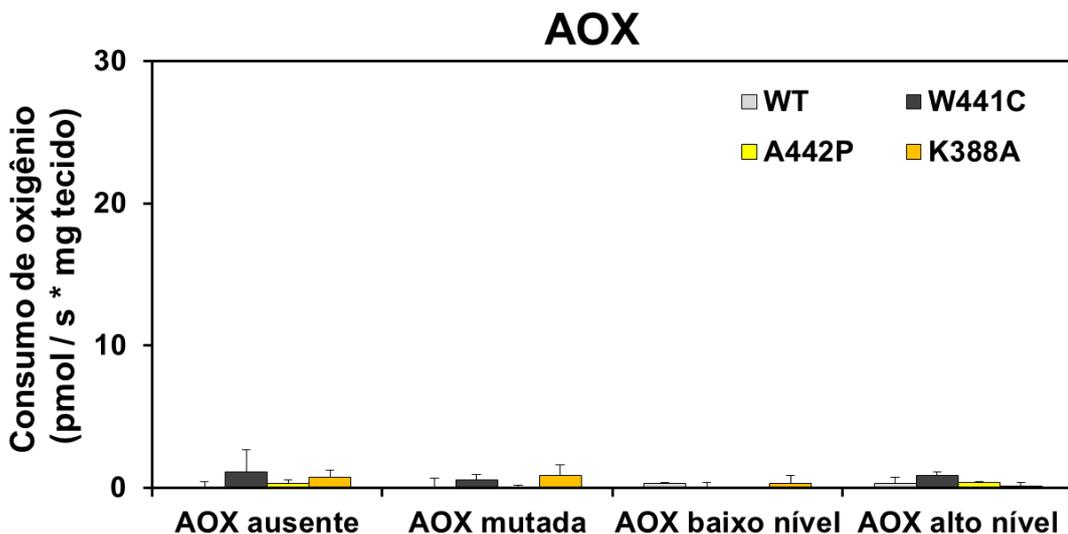
APÊNDICE C – Viabilidade pupal não é prejudicada em linhagens que não possuem o transgene da Twinkle mutante A442P, mas carregam o transgene da AOX. À esquerda, encontram-se as linhagens provenientes de cruzamentos com machos *daGAL4* expressando apenas uma das diferentes versões da AOX e o balanceador *TM6B-GFP*, ao invés da mutação A442P. À direita, estão as linhagens provenientes de cruzamentos controle com machos *w<sup>1118</sup>*. AOX ausente, AOX mutada, AOX em baixo nível e AOX em alto nível correspondem, respectivamente, aos genótipos: *UAS-empty<sup>2nd</sup>*; *UAS-AOXmut<sup>2nd</sup>*; *UAS-AOXwt<sup>8.1</sup>*; *UAS-AOX<sup>F6</sup>*.



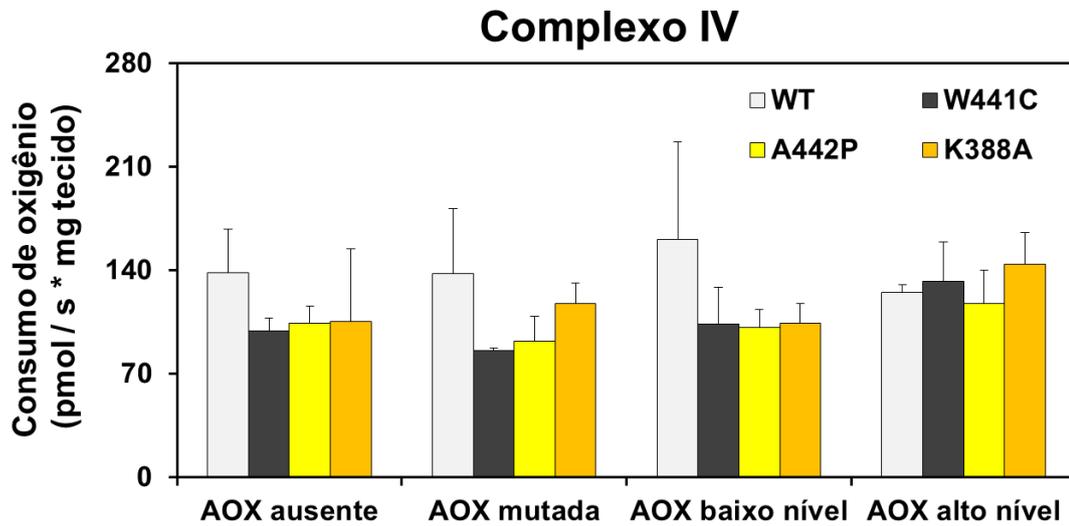
APÊNDICE D – Respiração mitocondrial relacionada ao CI em larvas L3 provenientes de cruzamentos com machos controle  $w^{1118}$ . A respiração foi calculada como o consumo médio de oxigênio após a adição de piruvato, prolina, malato e ADP, seguido por inibição com antimicina A e rotenona. AOX ausente, AOX mutada, AOX em baixo nível e AOX em alto nível correspondem, respectivamente, aos genótipos:  $UAS-empty^{2nd}$ ;  $UAS-AOXmut^{2nd}$ ;  $UAS-AOXwt^{8.1}$ ;  $UAS-AOX^{F6}$  combinados às diferentes formas de Twinkle indicadas na imagem.



APÊNDICE E – AOX apresenta atividade nula em larvas L3 de linhagens provenientes de cruzamentos controle com machos  $w^{1118}$ . Os valores foram calculados como o consumo médio de oxigênio após a adição de piruvato, prolina, malato, ADP e antimicina A, seguido por inibição com propil-galato e rotenona. AOX ausente, AOX mutada, AOX em baixo nível e AOX em alto nível correspondem, respectivamente, aos genótipos:  $UAS-empty^{2nd}$ ;  $UAS-AOXmut^{2nd}$ ;  $UAS-AOXwt^{8.1}$ ;  $UAS-AOX^{F6}$  combinados às diferentes formas de Twinkle indicadas na imagem.



APÊNDICE F – Atividade do CIV em larvas L3, provenientes de cruzamentos com machos controle  $w^{1118}$ , após inibição dos complexos I, III e da AOX. Os valores foram calculados como o consumo médio de oxigênio após a adição de TMPD e ascorbado, seguido por inibição por cianeto de potássio. AOX ausente, AOX mutada, AOX em baixo nível e AOX em alto nível correspondem, respectivamente, aos genótipos:  $UAS-empty^{2nd}$ ;  $UAS-AOXmut^{2nd}$ ;  $UAS-AOXwt^{8.1}$ ;  $UAS-AOX^{F6}$  combinados às diferentes formas de Twinkle indicadas na imagem.





UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de São José do Rio Preto

## TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 25/07/2017

*Ana Paula Campos Rodrigues*  
Assinatura do autor